



Memoria del 46.º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

La subunidad ζ de *Paracoccus denitrificans* es una uñeta-trinquete o inhibidor unidireccional del nanomotor F_1F_0 -ATPasa.

The ζ subunit of *Paracoccus denitrificans* is a unidirectional pawl-ratchet inhibitor of the F_1F_0 -ATPase nanomotor.

García Trejo, José de Jesús^{1*}

1. Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM

*Correspondencia. Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM, Edificio E Circuito escolar s/n Col. Ciudad Universitaria, Coyoacán, CDMX, CP 04510 Tel. +52 (55) 5622-3899, jjgartre@unam.mx

Resumen

El sentido de la vida ya no solo lo dicta la dirección de 5' a 3' de la ADN polimerasa, sino también el de las manecillas del reloj, dado que así gira el rotor del nanomotor F_1F_0 -ATP sintasa (visto desde el canal de protones F_0 a la parte catalítica F_1), para sintetizar la mayoría del ATP en todos los seres vivos. Esta rotación sintética la impulsa la energía del gradiente de protones de mitocondrias, cloroplastos y bacterias, el cual se colapsa en anoxia, isquemia, anaerobiosis, desacoplamiento, o en la oscuridad en organismos fotosintéticos, y así la enzima tiende a girar “de reversa” en contra de las manecillas del reloj como F_1F_0 -ATPasa para consumir al ATP celular de manera letal. Varios inhibidores naturales de la enzima bloquean la actividad “reversa” de F_1F_0 -ATPasa, y nuestro grupo descubrió el inhibidor presente en *Paracoccus denitrificans* y demás α -proteobacterias denominándolo subunidad ζ . Recientemente resolvimos su función, estructura y mecanismo inhibitorio. La subunidad ζ resultó ser un inhibidor unidireccional tipo uñeta-trinquete (o matraca) pues bloquea la rotación “reversa” contra las manecillas del reloj de la F_1F_0 -ATPasa sin afectar el giro “hacia delante” en el sentido de las manecillas del reloj de F_1F_0 -ATP sintasa. Este mecanismo unidireccional lo comparten otros inhibidores naturales de la enzima (ϵ bacteriana e IF_1 mitocondrial) y tiene aplicaciones importantes en el diseño de nuevos antibióticos.

Abstract

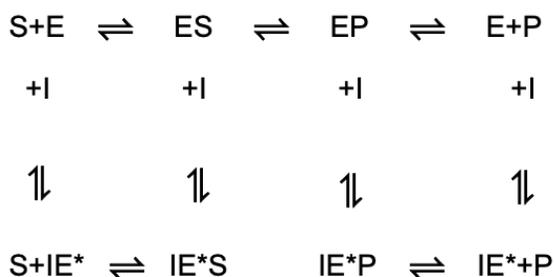
The sense of life is not only dictated by the direction from 5' to 3' of DNA polymerase anymore, but it is also clock-wise, since the rotor of the F_1F_0 -ATP synthase nanomotor rotates like this (viewed from the proton channel F_0 to the catalytic part F_1) to synthesize most of the ATP in all living beings. This synthetic rotation is driven by the energy of the proton gradient of mitochondria, chloroplasts and bacteria, which collapses in anoxia, ischemia, anaerobiosis, uncoupling, or in the dark in photosynthetic organisms, where the enzyme tends to rotate counter-clockwise as F_1F_0 -ATPase and to consume the cellular ATP in a lethal manner. Several natural inhibitors of the enzyme block the reverse activity of F_0F_1 -ATPase, and our group discovered the one present in *Paracoccus denitrificans* and related α -proteobacteria naming it as the ζ subunit. Recently, we resolved its function, structure, and inhibitory mechanism. The ζ subunit turned out to be a unidirectional inhibitor working as a pawl-ratchet, i.e. blocking the “reverse” counter-clockwise rotation of the F_1F_0 -ATPase without affecting the “forward” clockwise turnover of the F_1F_0 -ATP synthase. This unidirectional mechanism is shared by the other natural inhibitors of the enzyme (bacterial ϵ and mitochondrial IF_1), and has important applications in the design of new antibiotics.

Palabras clave: ATP sintasa, subunidad ζ , unidireccional, ñeta, matraca. *Key words:* ATP synthase, ζ subunit, unidirectional, pawl, ratchet.

Introducción

Inhibidores enzimáticos bidireccionales

De acuerdo con una inolvidable conversación con el Dr. Armando Gómez Puyou, en teoría no debería haber inhibidores enzimáticos unidireccionales, debido a que las enzimas son catalizadores biológicos que aceleran una reacción química en ambos sentidos, tanto de reactivos a productos como viceversa; por lo tanto, cualquier inhibidor enzimático debería ser bidireccional, es decir inactivar a la enzima en ambos sentidos de la reacción. Esto se ilustra en el siguiente diagrama cinético (esquema 1): la enzima (E) puede unir sustrato (S) o producto (P) y catalizar la reacción en ambos sentidos, hacia “adelante” de S a P (\rightarrow) o hacia “atrás” de P a S (\leftarrow) de manera reversible (\rightleftharpoons). Si la enzima une un inhibidor bidireccional (I), que en este caso es no competitivo y total, las uniones de I, S y P a la enzima son independientes y no interfieren entre sí. Dado que el inhibidor es total, éste lleva a la enzima a una forma inactiva (E*) incapaz de catalizar. La enzima se queda detenida catalíticamente tanto en la reacción hacia “adelante” (\rightarrow), como en la reacción “de reversa” (\leftarrow).



Esquema 1. Inhibición bidireccional total no competitiva de una enzima. La enzima (E) cataliza la reacción en ambos sentidos de S a P y de P a S. Cuando se une un inhibidor no-competitivo total (I), éste no interfiere con la unión de S y P, y lleva a la enzima a una forma inactiva (E*), y los complejos IE*S e IE*P, son incapaces de inter-convertirse entre sí. La reacción no es catalizada en ningún sentido (\rightarrow ni \leftarrow) y el inhibidor (I) es bidireccional, por ello no hay flechas (\rightleftharpoons) en la parte central e inferior del esquema.

Con el paso de los años, hemos aprendido que esta premisa de que las enzimas deben tener sólo inhibidores unidireccionales se cumple en la mayoría de los casos, sin embargo en la naturaleza siempre

hay excepciones, y además de algunos sustratos, productos, o reguladores alostéricos de enzimas escalares que funcionan como inhibidores unidireccionales aparentes, una excepción muy importante podría ser el nanomotor que le da energía a la vida: la ATP sintasa, la cual no es una enzima común, pues funciona por un mecanismo rotacional muy finamente regulado, inicialmente propuesto por el Dr. Paul D. Boyer, gracias al cual le otorgaron el premio Nobel de Química 1997 [1]. Dado que esta enzima es un nanomotor, podría ser el primer caso cuyos inhibidores naturales funcionen como verdaderos inhibidores unidireccionales. En este artículo se revisará cómo nuestros datos recientes con una nueva subunidad ζ inhibitora que descubrimos en *Paracoccus denitrificans* y demás α -proteobacterias, indican que efectivamente la ATP sintasa tiene inhibidores naturales unidireccionales.

Mecanismo rotacional y control del nanomotor ATP sintasa

En este nanomotor el rotor central gira en el sentido “a Favor de las Manecillas del Reloj” (FMR) impulsado por el gradiente y flujo de protones (o iones sodio) a través del canal transmembranal F_o , para acoplar esta rotación a la síntesis del ATP a partir de ADP y P_i en la parte F_1 del estator [1]. Es por esto que el sentido de la vida ya no sólo es el de la ADN polimerasa de 5 a 3', sino también el de las manecillas del reloj o FMR de la ATP sintasa, que es el nanomotor de la vida. De manera inversa en el sentido “Contrario a las Manecillas del Reloj” (CMR), el giro del rotor es impulsado por la unión e hidrólisis del ATP en la parte F_1 -ATPasa, el cual se acopla al bombeo de protones a través del canal F_o (ver Fig. 1). Esta rotación “reversa”, representa un consumo desfavorable del ATP celular el cual tiende a ocurrir durante la pérdida parcial o total del gradiente de protones (durante la anoxia o anaerobiosis en mitocondrias y bacterias, o en la oscuridad en organismos fotosintéticos), por lo tanto esta actividad “reversa” de F_1F_o -ATPasa es bloqueada en mitocondrias y cloroplastos por sistemas muy estrictos de control: por la proteína inhibitora mitocondrial (IF_1) y por un puente disulfuro susceptible de control redox en cloroplastos. En el caso de los procariontes se pensaba que únicamente la subunidad ϵ funcionaba como inhibidor (revisado en [2-5]). Sin embargo, recientemente descubrimos una novedosa proteína

inhibidora en *Paracoccus denitrificans* y demás α -proteobacterias que denominamos subunidad ζ [6-8]. Esta proteína surgió evolutivamente dado que la subunidad ϵ de las α -proteobacterias perdió su capacidad inhibitoria, así que esta función se transfirió a la subunidad ζ , la cual es una proteína accesoria y externa al operón ATP. En el camino encontramos que la subunidad ζ funciona de manera similar a la IF₁ mitocondrial, mimetizando su mecanismo de unión y de inhibición [9] pero en la F₁-ATPasa de *P. denitrificans* y en el resto de las α -proteobacterias, aunque con una estructura diferente a las de ϵ e IF₁ [8,10]. El modelo experimental de la subunidad ζ ha resultado muy útil para resolver preguntas funcionales y estructurales de los distintos inhibidores dado que mimetiza a la IF₁, y además permite construir mutantes para analizar el mecanismo y la función de estos inhibidores [5,11]. Al ser ζ una proteína monogénica en *P. denitrificans*, este modelo nos permitió construir una mutante nula Pd $\Delta\zeta$ que a diferencia de las previas mutantes Δ IF₁, esta sí tiene un efecto fenotípico severo respecto a la cepa silvestre, y demuestra por primera vez que estos inhibidores tienen un papel biológico muy importante en la conservación de la energía celular [11]. Además, gracias a la mutante Pd $\Delta\zeta$, pudimos responder la pregunta del mecanismo uni- o bidireccional de ζ , y descubrimos un modo mecánico de acción que se puede extender tanto a ϵ como a la IF₁ [4,5,11]. Finalmente, todo esto abre aplicaciones usando a la ATP sintasa y a la subunidad ζ como blanco para el diseño de nuevos antibióticos contra algunas bacterias patógenas, como las del género *Brucella*.

Inhibidores naturales de las F₁F₀-ATPasas

La proteína inhibidora mitocondrial: IF₁

Desde que aislaron a la IF₁ por primera vez, Pullman y Monroy [12] demostraron que esta proteína funciona como inhibidor unidireccional de las actividades de F₁-ATPasa y F₁F₀-ATPasa, sin efecto alguno en la actividad de F₁F₀-ATP sintasa [12] y que la IF₁ tiene mayor efecto inhibitorio a pH relativamente ácido entre 7.5 y 6.0, mientras que a pH \approx 8.0 no tiene efecto inhibitorio [12]. Esto ya implica cierta unidireccionalidad de la IF₁ *in vivo* dado que la síntesis del ATP requiere forzosamente la presencia del gradiente de protones en condiciones energizadas donde la matriz mitocondrial se alcaliniza y la IF₁ así desprotonada no debe de ejercer inhibición de la actividad de ATP sintasa.

El sitio de unión inhibitorio de la IF₁ en la F₁-ATPasa mitocondrial se resolvió inicialmente por

entrecruzamientos químicos con el extremo C-terminal de la subunidad β [13]. Posteriormente nuestro laboratorio demostró que la IF₁ interactúa con γ para detener el giro del rotor central del nanomotor después de entrar por la interfaz catalítica $\alpha\epsilon/\beta\epsilon$ [14].

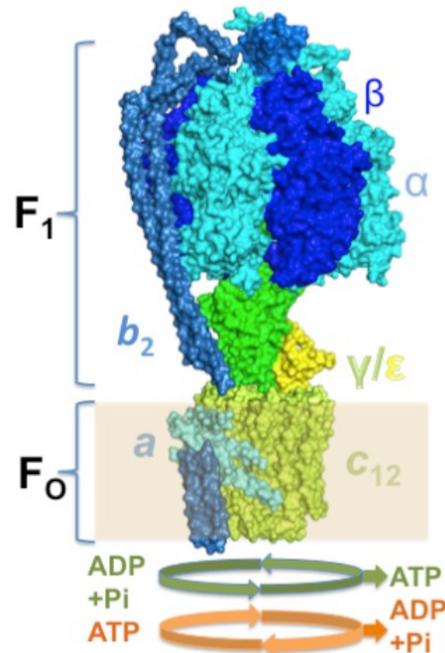


Figura 1. Estructura y rotación de la ATP sintasa. En tonos de verde se muestran las subunidades del Rotor ($\gamma/\epsilon/c_{12}$), y en azules las del estator ($\alpha_3/\beta_3/b_2/a$). El rotor gira en sentido “horario” o FMR para sintetizar al ATP (flecha verde, visto de F₀ a F₁), y en sentido reverso “anti-horario” (flecha naranja, CMR) para hidrolizarlo. El gradiente de protones (no mostrado) impulsa la rotación FMR para sintetizar ATP y si este gradiente se pierde en anaerobiosis, anoxia, o desacoplamiento, se favorece la rotación CMR de hidrólisis del ATP. Se muestra la ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans* sin su inhibidor natural ζ . Modificado de Ref. [11], ver texto.

Esto se combinó con la posterior estructura cristalina del complejo F₁-IF₁ [15] para concluir que la IF₁ entra por la interfaz $\alpha\epsilon/\beta\epsilon$ como lo propusimos [14], y que el rotor da dos tercios de giro de 120° para que finalmente la IF₁ se quede atorada en la interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$ donde frena completamente la rotación de γ [2,15]. Este mecanismo de entrada/unión/rotación se asocia además a una transición de intrínsecamente desordenado a α -hélice del extremo N-terminal de la IF₁, el cual denominamos mecanismo ERAHL por sus siglas en inglés “Entrance/Rotation/AlphaHelix/Locking” [4,5] (ver Fig. 6). En su posición inhibitoria final, la IF₁ impide el giro de la enzima en el sentido CMR, o actividad de F₁-ATPasa (Fig. 2C). Algunos investigadores proponen que la IF₁ también inhibe el giro de la enzima en el sentido FMR de ATP sintasa

con implicaciones en el cambio de metabolismo respiratorio a glucolítico en el cáncer [16,17]. Sin embargo, en estos trabajos no han medido directamente la síntesis de ATP, sino la acumulación del ATP celular, el cual puede no sólo provenir de la ATP sintasa; por lo tanto resulta ahora necesario redefinir si la IF₁ es capaz de inhibir la actividad de F₁F₀-ATP sintasa mitocondrial *in vivo*, dado que en caso contrario, la disminución del ATP celular que se obtiene al modular la expresión de la IF₁ [16] se debe buscar en otros efectos diferentes a la inhibición de la F₁F₀-ATP sintasa.

La proteína inhibidora en algunas bacterias: la subunidad ϵ

El papel principal de ϵ es estructural, y es una subunidad esencial del complejo F₁F₀ desde bacterias hasta mitocondrias. Esta subunidad conecta a γ con el anillo de subunidades c para que el giro del anillo impulsado por el flujo de protones se transmita de γ a los cambios conformacionales de las interfaces catalíticas α/β (Figs. 1 y 2A). Si se remueve ϵ genéticamente en *Escherichia coli*, la F₁ se disocia de F₀, y esto genera un fenotipo inviable dado que la EcF₁-ATPasa soluble en el citoplasma consume el ATP celular [18]. El dominio C-terminal de ϵ es el que contiene la función inhibitoria de la EcF₁F₀-ATPasa [19].

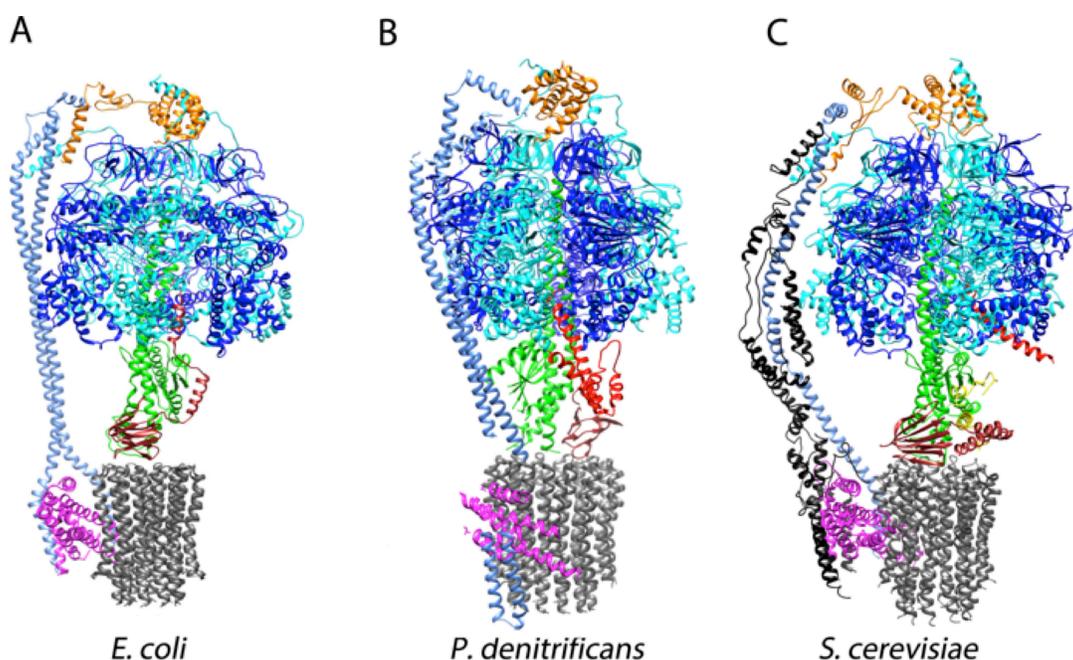


Figura 2. Inhibidores naturales de las ATP sintasas. El código de colores es similar a la Figura 1, con α_3/β_3 de F₁ en cyan/azul y b_2/a de F₀ en azul/rosa. En gris el anillo c_{12} y en naranja δ . (A) ATP sintasa de *E. coli*, ϵ inhibitoria se muestra extendida en rojo enredada con γ (verde) en la interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$. (B) la subunidad ζ de la ATP sintasa de *P. denitrificans*, se muestra unida a la interfaz catalítica $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$, bloqueando la rotación de γ (verde). (C) el N-terminal inhibitorio de IF₁ se muestra en rojo insertado en la interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$. Modificado de Ref. [5].

Este dominio se estructura como una horquilla de dos α -hélices compactas que interactúan con el dominio N-terminal globular en la ϵ aislada [20], que pueden extenderse y enredarse con la subunidad γ para detener su rotación [21-24] (Figs. 1,2A, y 3). Algunos grupos sostienen que ϵ bloquea tanto la actividad de F₁F₀-ATPasa como la de F₁F₀-ATP sintasa [25,26], sin embargo, los grupos de los Dres. Roderick A. Capaldi y Masasuke Yoshida, demostraron que ϵ funciona como inhibidor unidireccional de la actividad de EcF₁F₀-ATPasa aún cuando ϵ está entrecruzada en su forma extendida a γ

en la ATP sintasa de *E. coli* [27,28]. Dada la actual controversia entre el mecanismo unidireccional o bidireccional de ϵ , al igual que con la IF₁ mitocondrial, al parecer también es necesario volver a revisar el efecto de ϵ en la rotación FMR de la F₁F₀-ATP sintasa además de su conocido efecto inhibitorio en el giro CMR de F₁F₀-ATPasa. Resultados recientes de crio-microscopía electrónica de la ATP sintasa de *E. coli* [30] y del termófilo PS3 [26] sustentan el mecanismo unidireccional de ϵ , dado que la rotación permisible *in silico* de la enzima

es sólo en dirección FMR hacia la síntesis del ATP (Fig. 3B).

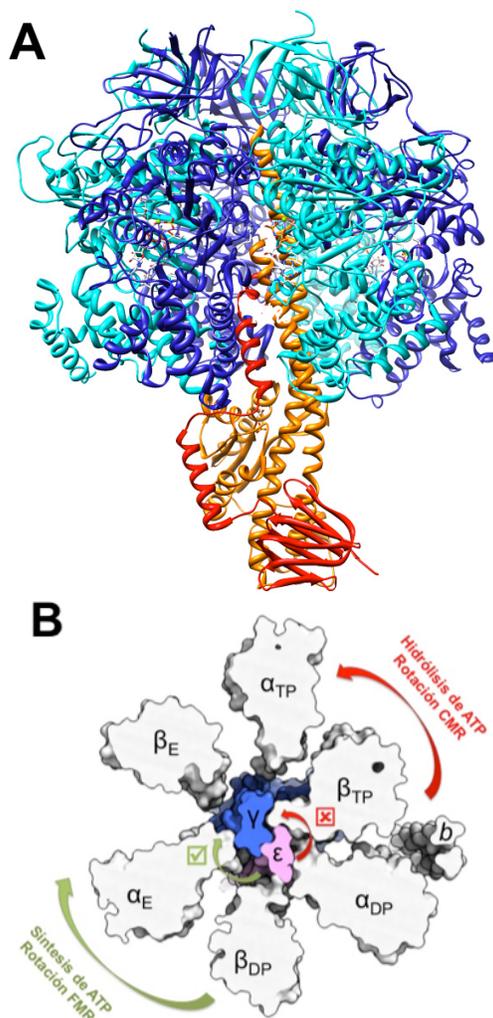


Figura 3. Posible mecanismo de trinquete o matraca de la subunidad ϵ para inhibir la actividad de EcF₁F_o-ATPasa. (A) Vista lateral en listones de la EcF₁. Se muestra ϵ extendida en rojo con las dos α -hélices de su dominio C-terminal extendidas a lo largo de γ en naranja; α/β en cian/azul (PDB 3OAA). (B) Vista “inferior” de F_o a F₁ en superficie de un corte transversal de la PS3F₁F_o obtenida por criomicroscopía electrónica. La ϵ extendida (rosa) permite el giro de γ (azul) FMR hacia la síntesis del ATP, pero inhibe la rotación CMR y la hidrólisis del ATP, dado de que el giro CMR induce que ϵ choque con α_{DP}/β_{TP} , mientras que el giro FMR es permitido dado que ϵ no choca con β_{DP} . Esto explica cómo es que ϵ funciona como un trinquete o matraca [27,39]. Modificado de Ref. [39].

La subunidad ζ de la ATP sintasa de Paracoccus denitrificans como nuevo inhibidor natural de la F₁F_o-ATPasa bacteriana

Anteriormente [6-8,10], descubrimos una nueva proteína inhibidora de la F₁F_o-ATPasa en la α -proteobacteria *P. denitrificans* que denominamos

subunidad ζ . Esta subunidad tiene una estructura global diferente tanto a ϵ como a la IF₁, y su ORF está conservado exclusivamente en la clase de las α -proteobacterias. Dado que de estas últimas es de donde surgieron las mitocondrias [29-31] y *P. denitrificans* es muy parecida a estas últimas [32], este modelo de estudio es de particular interés evolutivo. Además, la ATP sintasa de *P. denitrificans* fue la primera descrita cinéticamente como una ATP sintasa unidireccional [33,34], con una actividad “reversa” de F₁F_o-ATPasa prácticamente nula [33,34], mientras que sus homólogas de *E. coli* o mitocondrias son F-ATPasas y F-ATP sintasas bidireccionales [35-38]. Esto nos hizo preguntarnos si la subunidad ζ participa o no en el mecanismo del nanomotor F₁F_o de *P. denitrificans* que lo hace girar de manera preferente en la dirección FMR como ATP sintasa.

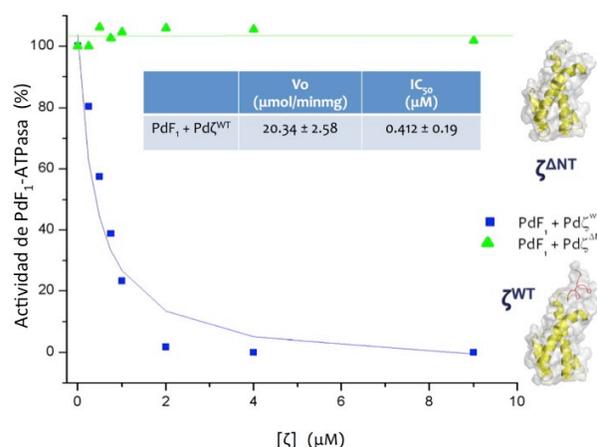


Figura 4. El extremo N-terminal de ζ contiene el dominio inhibitorio. Se grafica la actividad de PdF₁-ATPasa contra la [ζ] en μ M. La actividad control (100%) es V₀ (20.34 μ Mol/minXmg). La ζ ^{WT} inhibe progresivamente a cero la actividad de PdF₁-ATPasa (■), mientras que la mutante trunca ζ ^{ANT} (▲) no inhibe a la PdF₁-ATPasa aunque se añada en exceso. El dominio NT removido en ζ ^{ANT} se muestra en rojo en ζ ^{WT} a la derecha. Modificado de Ref. [8]

Para responder esta pregunta la M.C. Fernanda de la Rosa Morales aisló por primera vez tanto a la F₁-ATPasa como a la F₁F_o-ATPasa funcionales de *P. denitrificans*, descubriendo a la subunidad ζ que coincidentemente co-migraba con la IF₁ mitocondrial en geles desnaturizantes de policacrilamida [6,7]. Este resultado nos permitió hipotetizar que ζ podría ser una nueva proteína inhibidora no detectada en preparaciones preliminares de la F₁-ATPasa de *P. denitrificans* [40]. Después de que junto con los Dres. Mariel Zarco Zavala y Edgar Morales Ríos demostramos que efectivamente ζ inhibe totalmente las actividades de PdF₁ y PdF₁F_o-ATPasas [7,8,10] encontramos que sus estructuras primaria y terciaria

completas [8,10] eran diferentes a ϵ y a la IF₁. Sin embargo, un rasgo que me saltó desde un principio a la vista era que los extremos N-terminales de ζ e IF₁ guardan cierta similitud [6,8] aunque el resto de ambas proteínas son completamente diferentes [8]. Esta similitud entre los N-terminales de ζ e IF₁ era una hipótesis personal dado que la identidad es relativamente baja, pero resultó ser correcta (Fig. 5).

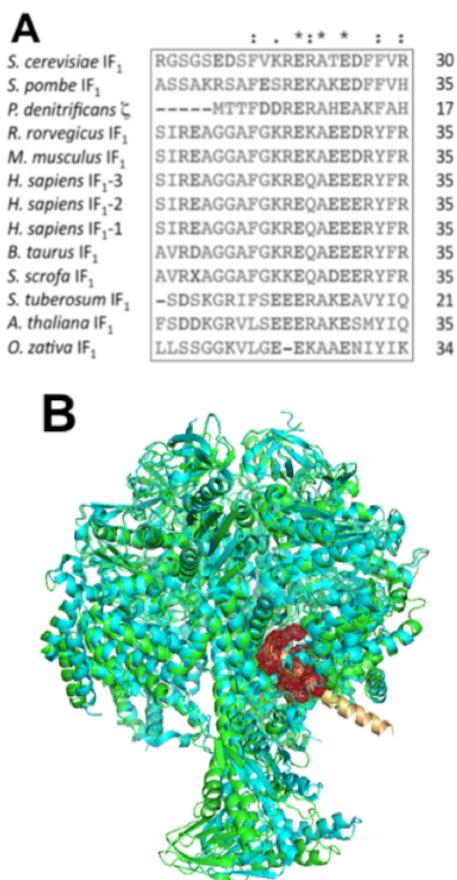


Figura 5. Alineamientos de los dominios N-terminales de Pd ζ e IF₁. A) Alineamiento de la estructura primaria de los N-terminales de Pd ζ y las IF₁s mitocondriales (rectángulo); modificado del material suplementario de la ref. [8]. B) Alineamiento estructural en 3D del dominio inhibitorio N-terminal de ζ (rojo) con la IF₁ mitocondrial (beige) unida a la interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$ del complejo F₁-IF₁. En verde se muestra el modelo de la PdF₁ y en cyan el complejo MF₁-IF₁. Modificado de refs. [4,6,8,9]. Para corroborar estos alineamientos estructurales *in silico*, se comprobó la competencia entre la Pd ζ y la IF₁ para inhibir a la PdF₁-ATPasa *in vitro*, ver detalles en Ref. [9].

Encontramos además que los dominios N-terminales de todos los ORFs de ζ son los más conservados, mientras que los sectores central y C-terminal de ζ son mucho más variables [8]. Además, demostramos en colaboración con el Dr. Kurt Wüthich que el extremo N-terminal de ζ es intrínsecamente desordenado y muy móvil, siendo

éste un dominio IDPr (Intrinsically Disordered Protein Region) [8,11]. La fuerte conservación y la gran movilidad del extremo N-terminal de ζ me condujeron a hipotetizar que era en este extremo N-terminal donde debía estar el dominio inhibitorio de ζ . Para resolver esto, la Dra. Mariel Zarco-Zavala construyó una mutante Pd $\zeta^{\Delta NT}$ carente de los primeros 14 aminoácidos del extremo N-terminal [8]. Por reconstitución homóloga con la mutante trunca (Pd $\zeta^{\Delta NT}$) en la PdF₁-ATPasa, y heteróloga con otra mutante trunca de *Jannaschia sp* (Js $\zeta^{\Delta NT}$) carente de los primeros 19 aminoácidos, demostramos que al remover el N-terminal de ζ se perdió por completo el efecto inhibitorio [8] (Fig. 4). Esto aunado a controles que corroboraron que ambas proteínas truncas mantuvieron la estructura terciaria de la Pd ζ^{WT} silvestre, demostró que el extremo N-terminal de ζ contiene el dominio inhibitorio, y que éste inhibe la rotación de γ dado que el aducto ζ - γ observado con la Pd ζ^{WT} , se pierde en la mutante Pd $\zeta^{\Delta NT}$ [8].

Una vez demostrado que ζ inhibe la rotación de γ con su N-terminal inhibitorio, nos concentramos en definir el sitio de unión de ζ en la PdF₁-ATPasa. Por invitación del Dr. John E. Walker a colaborar se intentó cristalizar tanto a la PdF₁ como el complejo PdF₁F₀ completo, sin embargo con esta colaboración sólo publicamos la estructura de un par α/β de la F₁-ATPasa de *P. denitrificans*, sin γ , δ , ϵ , y ζ [41]. Por tanto, dado que el sitio de ζ no se resolvió en este cristal, construí un modelo por homología de la PdF₁ para buscar por *docking* el sitio de unión de ζ , usando como molde la F₁-ATPasa mitocondrial [9]. Ya que los N-terminales de ζ e IF₁ se alinean en estructura primaria [6,8] (Fig. 5A) y teniendo el modelo de la PdF₁, probé si se podrían alinear en estructura terciaria usando de molde al complejo F₁-IF₁. El alineamiento estructural entre ambos N-terminales fue exitoso (Fig. 5B), gracias a lo cual descubrí *in silico* que ζ se une en la misma interfaz catalítica ($\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$) y en teoría en la misma forma de α -hélice que la IF₁ mitocondrial [9] (Fig. 5). Sin tener acceso a la eventual estructura ni a las coordenadas cristalográficas del complejo PdF₁F₀- ζ , todos nuestros datos nos condujeron a proponer que ζ también debería de pasar por una transición de IDPr a α -hélice con un mecanismo ERAHL (Fig. 6) similar al de la IF₁, dado que la unión de ζ también depende de algunas vueltas catalíticas de F₁-ATPasa, como la IF₁ [7,8].

Esto lo corroboré con experimentos de competencia entre ζ e IF₁ para inhibir a la PdF₁-ATPasa de *P. denitrificans* [9]. En resumen, los resultados de modelado, *docking*, y competencia ζ vs

IF₁ demostraron que la Pd ζ se une en el mismo sitio que la IF₁, pero en la interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$ de la PdF₁-ATPasa [9]. Aunque las primeras pruebas de cristalización del complejo PdF₁F₀- ζ las realizamos en colaboración con John E. Walker [42], ellos enviaron la estructura del complejo la PdF₁F₀- ζ en octubre del 2015 [43]. Aunque nuestro modelo PdF₁- ζ apareció en línea en noviembre del 2015, lo enviamos a publicar desde agosto del mismo año [9], antes de la liberación de las coordenadas del complejo PdF₁F₀- ζ (PDB 5DN6) en octubre; gracias a esto nuestro modelo PdF₁- ζ no perdió validez.

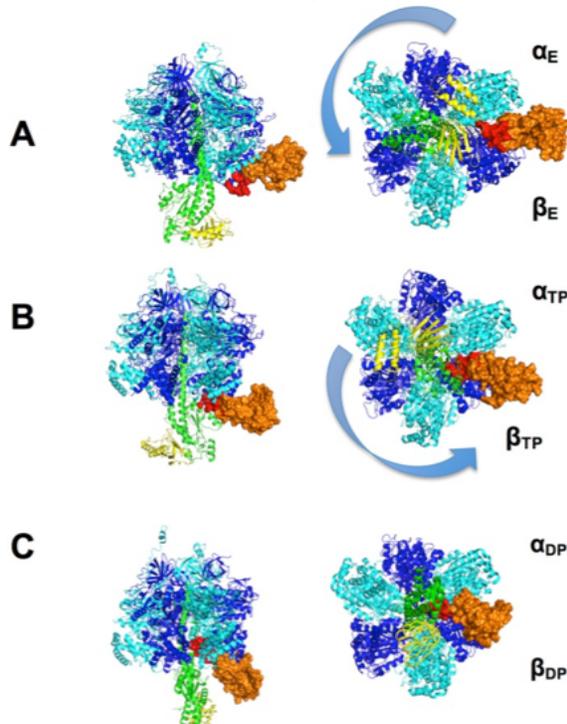


Figura 6. Mecanismo de unión acoplado a la rotación ERAHL de las subunidades ζ e IF₁ a la F₁-ATPasa. La subunidad ζ de *P. denitrificans* se muestra en superficie naranja y el N-terminal inhibitorio en rojo. α/β en azul/cyan, γ/ϵ en verde/amarillo. (A) Entrada del N-terminal inhibitorio de ζ por la interfaz abierta α_E/β_E acoplada a la rotación CMR de γ/ϵ impulsada por la unión de MgATP (no mostrado). (B) Giro de 120° de γ/ϵ acoplada a la unión de un segundo MgATP (no mostrado). (C) Anclaje final de ζ en la interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$ que bloquea la rotación CMR al contactar a la subunidad γ con su N-terminal. Este mecanismo también aplica para la IF₁ mitocondrial dado que ζ e IF₁ se unen al mismo sitio de sus respectivas F₁-ATPasas. Modificado de Referencias. [2,9].

El cristal del complejo PdF₁F₀- ζ resolvió únicamente los extremos N- y C-terminales de ζ unida a la PdF₁F₀-ATP sintasa y confirmó nuestra predicción [9] de que el N-terminal inhibitorio de ζ se une a la PdF₁ en la interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$ de manera idéntica a la IF₁ mitocondrial en forma de α -hélice [43]. Debido a que la estructura cristalina carece del dominio globular de ζ , éste lo modelamos por alineamientos del dominio globular de la ζ resuelta

por RMN (PDB 2LL0), con el N-terminal de ζ de la estructura cristalina (PDB 5DN6), mostrando que el primero se ancla a la subunidad β_{DP} [11] (Fig. 7). Aunque esta aproximación no es cristalográfica, el modelado por alineamiento estructural se puede considerar correcto en el modelo final del complejo PdF₁F₀- ζ [11], dado que el dominio globular de ζ es rígido mostrando poca movilidad en solución (PDB 2LL0) y además hemos observado que es resistente a la proteólisis limitada con tripsina [8,9]

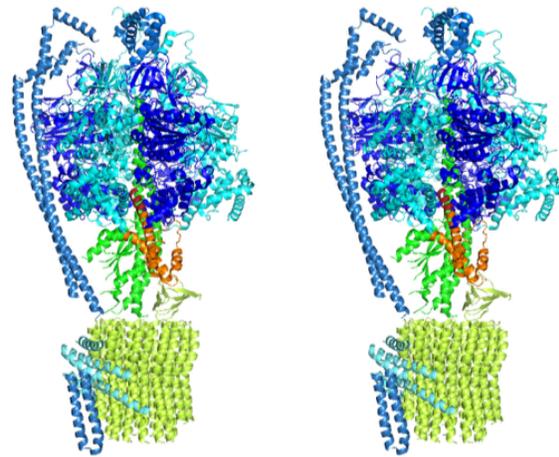


Figura 7. Estructura 3D del complejo PdF₁F₀- ζ . Modelo estereoscópico en listones del complejo PdF₁F₀- ζ , con ζ en naranja. El α -hélice N-terminal inhibitoria de ζ se muestra en rojo insertada en la interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$ deteniendo la rotación de γ . El dominio globular (naranja) se ancla a β (azul) con el asa entre las α -hélices 2-3. Rotor en tonos verde/amarillo, y estator en azules. Modificado de Ref. [11]

Función biológica de las subunidades ζ , ϵ y de IF₁ como inhibidores de la F₁F₀-ATPasa in vivo

Una pregunta no resuelta de los tres inhibidores naturales de las F₁F₀-ATPasas, es su verdadero papel o función biológica *in vivo*, dado que sus efectos inhibitorios se han demostrado *in vitro*. Como se discutió, las mutantes *knockout* no se pueden realizar con ϵ dado que es una subunidad esencial del rotor. Por otro lado, las mutantes Δ IF₁ se han construido en mitocondrias de levaduras, nemátodos y ratones *knockout*. En los tres casos la remoción de la IF₁ no tiene un efecto severo en el crecimiento, viabilidad, o reproducción de ninguna especie [44-47], aun cuando se construya una triple mutante en levaduras (Δ INH: Δ STF1: Δ STF2) removiendo a la IF₁ y a sus dos genes estabilizadores (STF1 y STF2) [48-50].

Dadas estas complicaciones de las mutantes Δ IF₁, construimos una mutante nula $\Delta\zeta$ en *P. denitrificans* ya que ζ es monogénica y no tiene subunidades accesorias para que se una a la PdF₁F₀-ATP sintasa

in vivo. La otra ventaja es que *P. denitrificans* es estrictamente respiratoria, incapaz de fermentar y por tanto depende estrictamente del ATP proveniente de la ATP sintasa en medio respiratorio [51]. Por lo tanto, la hipótesis de trabajo era que en medio estrictamente respiratorio (medio de succinato) la mutante nula (Pd $\Delta\zeta$) debería de crecer más despacio ya que su concentración intracelular de ATP debía ser menor que la de la cepa silvestre. Esta mutante nula la construimos de manera estratégica al reemplazar completamente por recombinación homóloga el gen de ζ con un *cassette* de resistencia a kanamicina por medio de un plásmido suicida, por lo cual se pierde por completo el gen ζ silvestre, y la resistencia a kanamicina nos permite seleccionar las cepas Pd $\Delta\zeta$ recombinantes [11]. Esta mutante $\Delta\zeta$ es estricta a diferencia de las previas ΔIF_1 donde sólo se interrumpieron los genes de IF_1 sin removerlos por completo [44-47]. Antes de caracterizar fenotípicamente a la mutante Pd $\Delta\zeta$, confirmamos su correcta construcción por secuenciación, y por PCR, donde como era de esperarse la mutante Pd $\Delta\zeta$ no amplificó al gen; y por western-blot anti-Pd ζ se corroboró la ausencia total de la proteína ζ en la mutante Pd $\Delta\zeta$ [11]. Finalmente, un control importante es hacer una mutante Pd $\Delta\zeta$ complementada con el gen ζ recombinante expresándose en *trans*. Esta cepa denominada Pd $\Delta\zeta$ + ζ debe revertir los posibles efectos de la cepa mutante Pd $\Delta\zeta$.

Una vez hechos todos los controles necesarios, se procedió a hacer las curvas de crecimiento de las tres cepas PdWT, Pd $\Delta\zeta$ y Pd $\Delta\zeta$ + ζ , tanto en medio rico LB como en medio mínimo de succinato. Esta construcción la realizó el Dr. Francisco Mendoza Hoffmann para su tesis doctoral en mi laboratorio [52], en colaboración con el Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM. Un experimento crucial, fue medir continuamente el crecimiento de las tres cepas PdWT, Pd $\Delta\zeta$, y Pd $\Delta\zeta$ + ζ por 48 horas, con controles de resistencia a kanamicina.

Finalmente, en medio rico LB el resultado fue inicialmente similar a lo encontrado anteriormente con las mutantes ΔIF_1 dado que la cepa Pd $\Delta\zeta$ creció igual que la cepa silvestre PdWT. Sin embargo, lo novedoso y más emocionante fue que en el medio respiratorio de succinato la cepa mutante Pd $\Delta\zeta$ no había crecido prácticamente nada, mientras que la cepa silvestre ya estaba en la fase log de crecimiento en las primeras 12 hrs (Fig. 8). Además, la cepa Pd $\Delta\zeta$ + ζ recuperó su crecimiento de manera casi idéntica a la cepa silvestre (Fig. 8), es decir la expresión en *trans* de la ζ recombinante “curó” los

efectos de la mutante nula, y esto complementó a la mutante (además de nuestra felicidad). La cepa mutante logró crecer con un tiempo de duplicación de más del triple (> 36 horas) respecto a la cepa silvestre (\approx 12 horas, Fig. 8B) [11]. De acuerdo con la hipótesis de trabajo, la ausencia de ζ debe aumentar la actividad de F_1F_0 -ATPasa, y esto consumir más del ATP celular en la mutante Pd $\Delta\zeta$ que en la cepa silvestre en medio respiratorio. Esto lo corroboramos con medidas de las actividades de F_1 -ATPasa y de F_1F_0 -ATPasa, esta última acoplada al bombeo de protones, por métodos bioquímicos, de citometría de flujo, y determinaciones de la concentración de ATP celular por bioluminiscencia [11]. Encontramos que efectivamente, las actividades de Pd F_1F_0 -ATPasa y de Pd F_1 -ATPasa aumentaron de 2-6 veces en las enzimas aisladas de la cepa Pd $\Delta\zeta$ respecto a las de la cepa silvestre PdWT [11]. Además, la actividad aumentada de Pd F_1F_0 -ATPasa produjo un mayor bombeo de protones tanto en vesículas de membrana invertidas como en células de *P. denitrificans* completas, el cual se revirtió al reconstituir la ζ recombinante en las membranas invertidas o en las células completas [11]. Finalmente, en coincidencia con los demás resultados, encontramos que, en medio de succinato, la concentración de ATP celular ([ATP]) disminuyó a la mitad en la mutante Pd $\Delta\zeta$, y ésta se recuperó en la mutante complementada con ζ recombinante (Fig. 8C). Asimismo, en medio rico LB, la [ATP] celular fue igual en todas las cepas, lo cual concuerda con el crecimiento similar de las tres cepas (PdWT, Pd $\Delta\zeta$ y Pd $\Delta\zeta$ + ζ) en dicho medio [11]. En resumen, todos los resultados concordaron para demostrar que el papel biológico de ζ es el de prevenir el consumo desfavorable del ATP celular por la F_1F_0 -ATPasa y mejorar el crecimiento bacteriano en medio respiratorio.

Estos resultados conforman la primera vez que una mutante nula de un inhibidor natural de la F_1F_0 -ATPasa tiene un efecto severo en el crecimiento y metabolismo *in vivo* [11]. Como se mencionó, las mutantes ΔIF_1 previas no tuvieron un efecto fenotípico claro respecto a las cepas silvestres, por lo tanto la subunidad ζ se posiciona como un modelo experimental útil no sólo en α -proteobacterias, sino que su papel biológico y mecanismo se pueden extender a todos los inhibidores naturales de la enzima (ϵ , ζ e IF_1).

La función biológica de los inhibidores naturales de las F_1F_0 -ATPasas es entonces la de prevenir el consumo fútil de ATP por estos nanomotores, no sólo en condiciones de bajo gradiente de protones como la anaerobiosis o el desacoplamiento, sino en

condiciones respiratorias donde la mayoría del ATP proviene de la ATP sintasa [4,5,11].

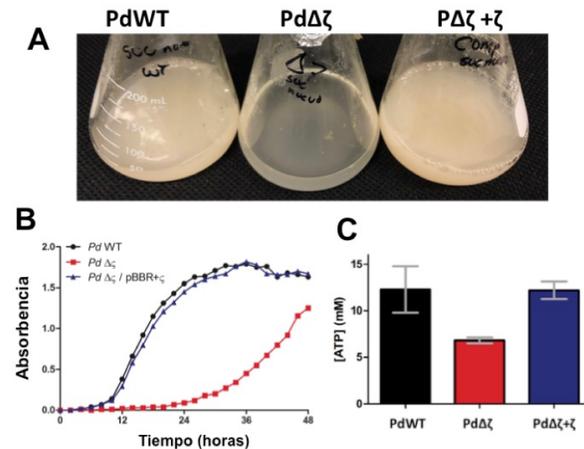


Figura 8. La mutante PdΔζ pierde [ATP] y crecimiento en medio respiratorio. A) y B) Crecimiento de las cepas silvestre (PdWT, negro), mutante nula (PdΔζ, rojo) y mutante complementada (PdΔζ+Δζ, azul) en medio con succinato. C) [ATP] celular en medio con succinato medido en las mismas cepas a una absorbancia de 1.0 aproximadamente a la mitad de la fase log. PdWT, negro; PdΔζ, rojo; PdΔζ+Δζ, azul. La mutante nula pierde crecimiento y [ATP], y la complementación con ζ recombinante en un plásmido de expresión regulada recupera el crecimiento y la [ATP]. B) y C) Modificados de Ref. [11].

Mecanismo de uñeta-trinquete o matraca de las subunidades ε, ζ e IF₁ como inhibidores unidireccionales de las F₁F₀-ATPasas

Por otro lado, además de ayudar a resolver el papel biológico de ζ, la mutante Δζ fue muy útil para determinar si ζ era un inhibidor unidireccional o bidireccional. La mutante PdΔζ nos permitió preparar membranas invertidas carentes de ζ, capaces de respirar y generar el gradiente de protones para impulsar el giro FMR hacia la síntesis del ATP por este nanomotor. Antes de ensayar el efecto de la reconstitución de la ζ recombinante sobre la actividad de F₁F₀-ATP sintasa de la cepa PdΔζ, verificamos que la remoción total de ζ no afectó para nada la velocidad de síntesis de ATP de las membranas invertidas aisladas de las cepas PdWT y PdΔζ [11]. En contraste, la velocidad de F₁F₀-ATPasa aumentó ≈ 2 veces en las membranas de la cepa PdΔζ respecto a la cepa silvestre PdWT debido a la ausencia de ζ [11]. Esto sugirió que efectivamente la subunidad ζ es un inhibidor unidireccional de la actividad de PdF₁F₀-ATPasa sin efecto en la de PdF₁F₀-ATP sintasa. Sin embargo, la confirmación más concreta de este mecanismo unidireccional fue por la reconstitución de un exceso de ζ en condiciones donde inhibió por completo la actividad de PdF₁F₀-ATPasa, mientras que la de F₁F₀-ATP sintasa no se afectó en lo

absoluto (Fig. 9B) [11]. Con estos resultados demostramos que la subunidad ζ es un inhibidor unidireccional de la rotación CMR de la actividad de F₁F₀-ATPasa que no tiene ningún efecto en la rotación de FMR de la actividad de F₁F₀-ATP sintasa [11].

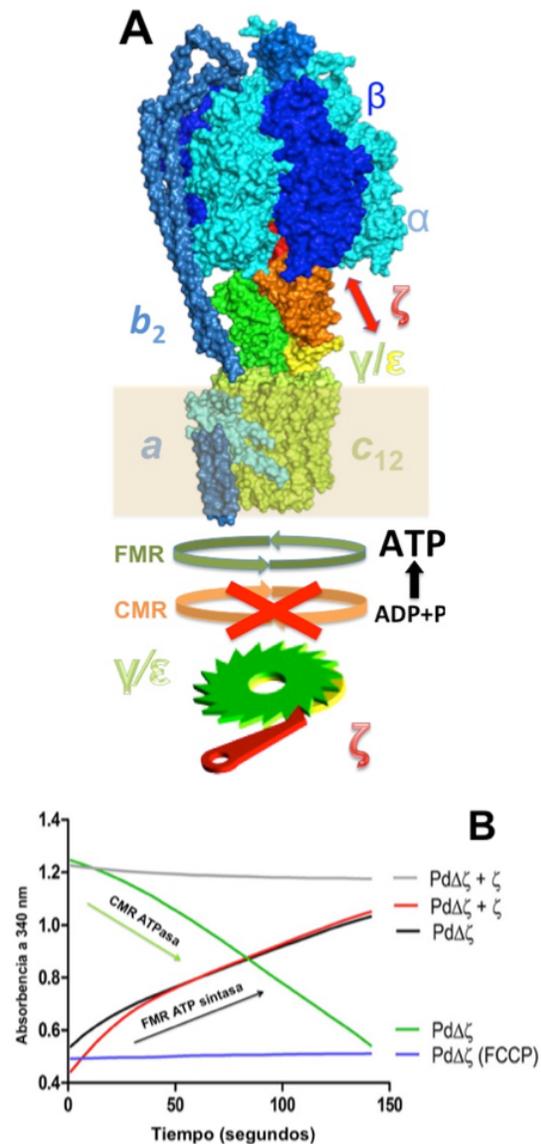


Figura 9. Inhibición unidireccional tipo uñeta-trinquete de ζ sobre la PdF₁F₀-ATPasa. A) ζ (rojo/naranja) impide el giro del rotor γ/ε/c₁₂ (verde/amarillo) en el sentido CMR-ATPasa (trazo gris en B)), y permite la rotación en el sentido FMR (trazo rojo en B)). Abajo, ζ como uñeta en rojo, γ/ε como trinquete. ζ puede o no liberarse (flecha roja reversible) para permitir la síntesis de ATP. B) la pendiente positiva es rotación FMR de ATP sintasa y la negativa es CMR de ATPasa. Trazos verde y negro sin ζ, azul desacoplado. Modificado de [4,9,11].

Cabe mencionar que la Dra. Judy Hirst con ayuda de parte del grupo del Dr. John E. Walker, han

obtenido una mutante múltiple Pd Δ Hyd Δ ζ similar; sin embargo, en ésta removieron 8 genes de dos operones de hidrogenasas, además del gen de ζ [53]. Aunque sus resultados aparecieron en línea sólo un día después a los nuestros [9,53], su mutante múltiple no muestra efecto alguno en el crecimiento respiratorio en succinato, sin embargo sus resultados no son concluyentes debido a posibles compensaciones entre las múltiples mutaciones (ver referencias [4,5,11]), además de que sus actividades de PdF₁-ATPasa son de 5-20 veces menores a las nuestras [4,5,11,53]. En resumen, nuestra construcción Pd Δ ζ es la única mutante nula limpia y concluyente que demuestra el papel de ζ como inhibidor unidireccional de la PdF₁F₀-ATPasa *in vivo*. Esta importante función de ζ abre la pauta para usar a la F₁F₀-ATP sintasa como blanco para diseñar nuevos antimicrobianos contra α -proteobacterias patógenas, entre las cuales el género *Brucella* es el más accesible experimentalmente, de manera similar a la bedaquilina, ya en uso contra la ATP sintasa de *Mycobacterium tuberculosis* [54].

El mecanismo unidireccional de inhibición de ζ se explica estructuralmente por un modelo de ñeta-trinquete o matraca, en el cual la interacción del dominio N-terminal de ζ con γ bloquea selectivamente el giro del rotor en el sentido CMR de F₁F₀-ATPasa, pero permite el giro en el sentido FMR de F₁F₀-ATP sintasa (Fig. 9). El término *trinquete* o *matraca* fue propuesto por primera vez para ϵ dada su inhibición unidireccional de la EcF₁F₀-ATPasa [27], y nosotros lo extendemos a *ñeta-trinquete* dado que ζ formaría la ñeta que impide el giro de γ cuya superficie irregular formaría el trinquete o matraca (Fig. 9A) [4,5,9,11]. Esta inhibición unidireccional puede ocurrir de dos maneras posibles: A) Una ñeta-trinquete *mecánica* similar a un desarmador con trinquete, o al juguete de madera llamado matraca, donde la ñeta permite el giro en un solo sentido, en este caso FMR para la síntesis del ATP, pero nunca se separa del rotor; o B) Una ñeta-trinquete *conformacional* donde la ñeta (ζ en este caso) se disocia parcial o totalmente del rotor-trinquete por acción del gradiente de protones y/o la energía de unión de los sustratos de la síntesis del ATP (ADP + Pi). En este caso, la salida de ζ permite el giro FMR de síntesis de ATP (Fig. 9A). ¿Cómo discernir entre ambas posibilidades? En estudios iniciales nuestros y de otros con esta ATP sintasa de *P. denitrificans* [36-38], hemos demostrado que el gradiente de protones y la proteólisis limitada activan a la PdF₁F₀-ATPasa. Esto sugiere que el mecanismo de inhibición de ζ es probablemente el de una ñeta-trinquete conformacional aplicable a la IF₁ mitocondrial donde se han visto resultados similares

[37]. Por otro lado, ϵ debe funcionar como un trinquete mecánico para permitir la rotación FMR de ATP sintasa dado que de ϵ permanece extendida y enredada con γ durante la síntesis del ATP [27], y por otro lado ϵ también funciona como ñeta-trinquete conformacional al compactarse y disociarse de γ para dejar de inhibir la rotación CMR de F₁F₀-ATPasa [39,55]. Actualmente estamos por demostrar si la subunidad ζ y/o la IF₁ se liberan parcial o totalmente de la enzima en presencia del gradiente de protones impulsando a la ATP sintasa para confirmar si funcionan como ñetas-trinquetes mecánicas o conformacionales.

Epílogo

Fuera de algunos sustratos, productos o reguladores alostéricos enzimáticos, no hay inhibidores reportados como unidireccionales de enzimas escalares, pero hemos constatado que sí hay al menos un inhibidor unidireccional ζ del nanomotor F₁F₀-ATPasa. Hemos contestado porqué la ATP sintasa de *P. denitrificans* es unidireccional, esto se debe a que su inhibidor natural ζ , es también un inhibidor unidireccional tipo ñeta-trinquete de la rotación CMR y actividad de PdF₁F₀-ATPasa, que no interfiere con la rotación FMR de la F₁F₀-ATP sintasa. Aunque falta revisar la inhibición unidireccional de ϵ y la IF₁, ζ es el único inhibidor unidireccional demostrado entre los tres inhibidores naturales de esta enzima. Dado que ζ , ϵ e IF₁ se unen en el mismo sitio e interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$ de sus F₁-ATPasas, nuestra hipótesis es que todos los inhibidores naturales de la F₁F₀-ATPasa actúan como ñetas-trinquete, explicando porqué favorecen la rotación del nanomotor en el sentido de la producción de ATP; esto conlleva un aumento en la [ATP] celular y en la vitalidad de todos los seres vivos. Estos hallazgos tienen implicaciones y aplicaciones en microbiología y diseño de nuevos antibióticos contra la F-ATPasa de α -proteobacterias patógenas como las del género *Brucella*.

Dedicatoria

A la memoria de mi madre, la Sra. María Concepción García Ramírez, quien siendo nuestra tía nos adoptó y sacrificó su vida por mis hermanos y por mí, dado el deceso de mi mamá biológica (Carmen Trejo Benítez). Gracias mamá Concepción por enseñarme los mejores valores y principios, de trabajo fuerte y honestidad, y a disfrutar el arte y la ciencia, lo mejor de mí es gracias a tí. Y también a la memoria de mi tía María del Carmen García Ramírez, y de mi sobrino Aarón Moreno García, víctima de cáncer terminal, brillante estudiante de

ingeniería, excelente persona, joven guerrero de la vida. Mi mamá, mi tía y mi sobrino siguen y seguirán vivos en nuestros valores, principios, y corazones.

Referencias

- Boyer, P. D. (1997) The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* **66**, 717-749
- García-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
- García-Trejo, J. J., Zarco-Zavala, M., and Morales-Rios, E. (2012) Estructura y mecanismo de la nueva subunidad inhibitoria ζ del nanomotor F1F0-ATP sintasa de las α -proteobacterias en *Paracoccus denitrificans*. *Mensaje Bioquímico* **37**, 106-126
- Zarco-Zavala, M., Mendoza-Hoffmann, F., and García-Trejo, J. J. (2018) Unidirectional regulation of the F1F0-ATP synthase nanomotor by the zeta pawl-ratchet inhibitor protein of *Paracoccus denitrificans* and related alpha-proteobacteria. *Biochim Biophys Acta* **1859**, 762-774
- Mendoza-Hoffmann, F., Zarco-Zavala, M., Ortega, R., and García-Trejo, J. J. (2018) Control of rotation of the F1F0-ATP synthase nanomotor by an inhibitory alpha-helix from unfolded epsilon or intrinsically disordered zeta and IF1 proteins. *J Bioenerg Biomembr* **50**, 403-424
- de la Rosa-Morales, F. (2005) "Composición de subunidades y Mecanismo de Regulación de la F1F0-ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans*". Masters (Maestría en Ciencias Biológicas) Experimental Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.)
- Morales-Rios, E., de la Rosa-Morales, F., Mendoza-Hernandez, G., Rodríguez-Zavala, J. S., Celis, H., Zarco-Zavala, M., and García-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
- Zarco-Zavala, M., Morales-Rios, E., Mendoza-Hernandez, G., Ramirez-Silva, L., Perez-Hernandez, G., and García-Trejo, J. J. (2014) The zeta subunit of the F1F0-ATP synthase of alpha-proteobacteria controls rotation of the nanomotor with a different structure. *FASEB J* **28**, 2146-2157
- García-Trejo, J. J., Zarco-Zavala, M., Mendoza-Hoffmann, F., Hernandez-Luna, E., Ortega, R., and Mendoza-Hernandez, G. (2016) The Inhibitory Mechanism of the zeta Subunit of the F1F0-ATPase Nanomotor of *Paracoccus denitrificans* and Related alpha-Proteobacteria. *J Biol Chem* **291**, 538-546
- Zarco-Zavala, M., Morales-Rios, E., Serrano-Navarro, P., Wüthrich, K.Š., Mendoza-Hernández, G., Ramirez-Silva, L., 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. *Biochimica et Biophysica Acta* **1827**, 60
- Mendoza-Hofmann, F., Pérez-Oseguera, A., Cevallos, M.A., Zarco-Zavala, M., Ortega, R., Peña-Segura, C., Espinoza-Simón, E., Uribe-Carvajal, S., and García-Trejo, J.J. (2018) The Biological Role of the ζ Subunit as Unidirectional Inhibitor of the F1F0-ATPase of *Paracoccus denitrificans*. *Cell Reports* **22**, 1067-1078
- Pullman, M. E., and Monroy, G. C. (1963) A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *J Biol Chem* **238**, 3762-3769
- Jackson, P. J., and Harris, D. A. (1988) The mitochondrial ATP synthase inhibitor protein binds near the C-terminus of the F1 beta-subunit. *FEBS Lett* **229**, 224-228
- Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., García, 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
- 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
- García-Bermudez, J., and Cuezva, J. M. (2016) The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1): A master regulator of energy metabolism and of cell survival. *Biochim Biophys Acta* **1857**, 1167-1182
- García-Bermudez, J., Sanchez-Arago, M., Soldevilla, B., Del Arco, A., Nuevo-Tapióles, C., and Cuezva, J. M. (2015) PKA Phosphorylates the ATPase Inhibitory Factor 1 and Inactivates Its Capacity to Bind and Inhibit the Mitochondrial H(+)-ATP Synthase. *Cell Rep* **12**, 2143-2155
- Klionsky, D. J., Brusilow, W. S., and Simoni, R. D. (1984) In vivo evidence for the role of the epsilon subunit as an inhibitor of the proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **160**, 1055-1060
- Capaldi, R. A., and Schulenberg, B. (2000) The epsilon subunit of bacterial and chloroplast F(1)F(0) ATPases. Structure, arrangement, and role of the epsilon subunit in energy coupling within the complex. *Biochim Biophys Acta* **1458**, 263-269
- Wilkens, S., and Capaldi, R. A. (1998) Solution structure of the epsilon subunit of the F1-ATPase from *Escherichia coli* and interactions of this subunit with beta subunits in the complex. *J Biol Chem* **273**, 26645-26651
- Rodgers, A. J., and Wilce, M. C. (2000) Structure of the gamma-epsilon complex of ATP synthase. *Nat Struct Biol* **7**, 1051-1054
- Hausrath, A. C., Capaldi, R. A., and Matthews, B. W. (2001) The conformation of the epsilon- and gamma-subunits within the *Escherichia coli* F(1) ATPase. *J Biol Chem* **276**, 47227-47232
- Cingolani, G., and Duncan, T. M. (2011) Structure of the ATP synthase catalytic complex (F1) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 701-707
- Shirakihara, Y., Shiratori, A., Tanikawa, H., Nakasako, M., Yoshida, M., and Suzuki, T. (2015) Structure of a thermophilic F1-ATPase inhibited by an epsilon-subunit: deeper insight into the epsilon-inhibition mechanism. *FEBS J* **282**, 2895-2913
- 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
- Masaïke, T., Suzuki, T., Tsunoda, S. P., Konno, H., and Yoshida, M. (2006) Probing conformations of the beta subunit of FoF1-ATP synthase in catalysis. *Biochem Biophys Res Commun* **342**, 800-807
- 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

28. Suzuki, T., Murakami, T., Iino, R., Suzuki, J., Ono, S., Shirakihara, Y., and Yoshida, M. (2003) F0F1-ATPase/synthase is geared to the synthesis mode by conformational rearrangement of epsilon subunit in response to proton motive force and ADP/ATP balance. *J Biol Chem* **278**, 46840-46846
29. Margulis, L., and Chapman, M. J. (1998) Endosymbioses: cyclical and permanent in evolution. *Trends Microbiol* **6**, 342-345; discussion 345-346
30. Ku, C., Nelson-Sathi, S., Roettger, M., Sousa, F. L., Lockhart, P. J., Bryant, D., Hazkani-Covo, E., McInerney, J. O., Landan, G., and Martin, W. F. (2015) Endosymbiotic origin and differential loss of eukaryotic genes. *Nature* **524**, 427-432
31. John, P., and Whatley, F. R. (1975) Paracoccus denitrificans and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature* **254**, 495-498
32. John, P. (1987) Paracoccus as a Free-Living Mitochondrion. *Ann Ny Acad Sci* **503**, 140-150
33. 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
34. 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
35. Zharova, T. V., and Vinogradov, A. D. (2003) Proton-translocating ATP-synthase of Paracoccus denitrificans: ATP-hydrolytic activity. *Biochemistry (Mosc)* **68**, 1101-1108
36. 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
37. Pacheco-Moises, F., Garcia, J. J., Rodriguez-Zavala, J. S., and Moreno-Sanchez, R. (2000) Sulfite and membrane energization induce two different active states of the Paracoccus denitrificans F0F1-ATPase. *Eur J Biochem* **267**, 993-1000
38. Pacheco-Moises, F., Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., and Garcia, J. J. (2002) Sulfite inhibits the F1F0-ATP synthase and activates the F1F0-ATPase of Paracoccus denitrificans. *J Bioenerg Biomembr* **34**, 269-278
39. Guo, H., Suzuki, T., and Rubinstein, J. L. (2019) Structure of a bacterial ATP synthase. *Elife* **8**
40. Harris, D. A., John, P., and Radda, G. K. (1977) Tightly bound nucleotides of the energy-transducing ATPase, and their role in oxidative phosphorylation. I. The Paracoccus denitrificans system. *Biochim Biophys Acta* **459**, 546-559
41. Morales-Rios, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., Garcia-Trejo, J. J., and Walker, J. E. (2015) Structure of a catalytic dimer of the alpha- and beta-subunits of the F-ATPase from Paracoccus denitrificans at 2.3 Å resolution. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* **71**, 1309-1317
42. Morales-Rios, E. (2011) *Clonación, sobre-expresión, purificación y caracterización de las subunidades épsilon y de 11KDa presentes en la ATP sintasa de Paracoccus denitrificans*. Doctorado. PhD Experimental, Doctorado., Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.
43. Morales-Rios, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2015) Structure of ATP synthase from Paracoccus denitrificans determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 13231-13236
44. Lu, Y. M., Miyazawa, K., Yamaguchi, K., Nowaki, K., Iwatsuki, H., Wakamatsu, Y., Ichikawa, N., and Hashimoto, T. (2001) Deletion of mitochondrial ATPase inhibitor in the yeast Saccharomyces cerevisiae decreased cellular and mitochondrial ATP levels under non-nutritional conditions and induced a respiration-deficient cell-type. *J Biochem* **130**, 873-878
45. Nakamura, J., Fujikawa, M., and Yoshida, M. (2013) IF1, a natural inhibitor of mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice. *Biosci Rep* **33**
46. Dienhart, M., Pfeiffer, K., Schagger, H., and Stuart, R. A. (2002) Formation of the yeast F1F0-ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, Inh1. *J Biol Chem* **277**, 39289-39295
47. Fernandez-Cardenas, L. P., Villanueva-Chimal, E., Salinas, L. S., Jose-Nunez, C., Tuena de Gomez Puyou, M., and Navarro, R. E. (2017) Caenorhabditis elegans ATPase inhibitor factor 1 (IF1) MAI-2 preserves the mitochondrial membrane potential (Deltaψ) and is important to induce germ cell apoptosis. *PLoS One* **12**, e0181984
48. Hashimoto, T., Yoshida, Y., and Tagawa, K. (1983) Binding properties of an intrinsic ATPase inhibitor and occurrence in yeast mitochondria of a protein factor which stabilizes and facilitates the binding of the inhibitor to F1F0-ATPase. *J Biochem* **94**, 715-720
49. Hashimoto, T., Yoshida, Y., and Tagawa, K. (1987) Binding properties of 9K protein to F1-ATPase: a counterpart ligand to the ATPase inhibitor. *J Biochem* **102**, 685-692
50. Hashimoto, T., Yoshida, Y., and Tagawa, K. (1990) Simultaneous bindings of ATPase inhibitor and 9K protein to F1F0-ATPase in the presence of 15K protein in yeast mitochondria. *J Biochem* **108**, 17-20
51. John, P., and Whatley, F. R. (1977) The bioenergetics of Paracoccus denitrificans. *Biochim Biophys Acta* **463**, 129-153
52. Mendoza-Hoffmann, F. (2018) *Rol biológico de la subunidad ζ como un inhibidor unidireccional de la F1Fo-ATPasa de Paracoccus denitrificans* Doctorado (PhD) Doctoral. Experimental, Universidad Nacional Autónoma de México
53. Varghese, F., Blaza, J. N., Jones, A. J. Y., Jarman, O. D., and Hirst, J. (2018) Deleting the IF1-like zeta subunit from Paracoccus denitrificans ATP synthase is not sufficient to activate ATP hydrolysis. *Open Biol* **8**
54. Bald, D., Villellas, C., Lu, P., and Koul, A. (2017) Targeting Energy Metabolism in Mycobacterium tuberculosis, a New Paradigm in Antimycobacterial Drug Discovery. *MBio* **8**
55. Sobti, M., Smits, C., Wong, A. S., Ishmukhametov, R., Stock, D., Sandin, S., and Stewart, A. G. (2016) Cryo-EM structures of the autoinhibited E. coli ATP synthase in three rotational states. *Elife* **5**



DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO

Es Medalla Gabino Barreda, Licenciado, Maestro y Doctor en Investigación Biomédica Básica por la UNAM, como alumno de los Dres. Marietta Tuena Sangri y Armando Gómez-Puyou del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Realizó tres estancias en el extranjero, una 1ª posdoctoral y una 2ª de investigación con el Dr. Roderick A. Capaldi de la Universidad de Oregon, USA, y una tercera en el Royal Free Hospital de Londres, UK con el Dr. Jan W. Taanman. Fue repatriado al Instituto Nacional de Cardiología y actualmente es Profesor-Investigador Titular en la Facultad de Química de la UNAM.

Es miembro continuo del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) de candidato a Investigador Nivel-II. Su campo de investigación es la estructura, función, disfunción, regulación, y evolución del nano-motor que le da la energía vital del ATP a todas las formas de vida: la ATP sintasa.

Sus contribuciones más importantes son: 1) resolución de la fuente de energía para la rotación del nanomotor en la unión de ADP y ATP; 2) primera resolución en 2D y 3D de la estructura dimérica de la ATP sintasa que le da forma a las crestas mitocondriales; y 3) descubrimiento de la subunidad ζ y resolución de su mecanismo

unidireccional de uñeta-trinquete como nuevo inhibidor natural de la F_1F_0 -ATPasa en *Paracoccus denitrificans* y demás α -proteobacterias. Con estos proyectos ha colaborado con el Dr. Stephan Wilkens y con dos Premios Nobel de Química, el Dr. Kurt Wüthrich y el Dr. John E. Walker.

Recibió la Medalla Dr. José Laguna por la Sociedad Mexicana de Bioquímica, de la cual es miembro, y el 3er lugar del premio PROFOPI otorgado por el IMPI (Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial) y la UNAM, por su primera patente.

El Dr. García Trejo ha publicado mas de 40 artículos internacionales, la mayoría como primer autor o autor correspondiente con ≈ 1000 citas en las mejores revistas incluyendo: *Cell Reports*; *P.N.A.S. USA*; *American Journal of Human Genetics (AJHM)*, *Journal of Biological Chemistry (JBC)*, *Biochemistry (USA)*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes (JOB)*, *Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)*, etc, siendo revisor de las últimas 5 y de *Nature Communications (USA)*; *FEMS Microbiology*, *Frontiers* etc.

El Dr. García Trejo es conferencista invitado a la Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil; Universidad de la Plata, Argentina; Universidad de Miami, Florida, USA; Instituto de Biología Molecular e Celular (IBMC), Porto, Portugal; a la Universidad de Tokio, Japón; AnalytiX Conferences, en Japón y USA; y las European Bioenergetics Conferences (EBEC, Italia y Hungría).

Es autor de un libro internacional, 5 artículos nacionales, 2 de divulgación, y tutor principal de 5 tesis doctorales, 2 de maestría y 3 de licenciatura.

Realiza una intensa labor docente impartiendo Fisiología Microbiana (licenciatura) y Bioquímica (posgrado): ahora Bioenergética, y antes Termodinámica de Proteínas y Cinética Enzimática.