



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL SECTOR F_1 DE LA F_1F_0 -ATP
SINTASA MITOCONDRIAL DEL ALGA INCOLORA *POLYTOMELLA SP.*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

OSTOLGA CHAVARRÍA MARCOS.

TUTOR

DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN
(INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. GEORGINA GARZA RAMOS MARTÍNEZ
(FACULTAD DE MEDICINA)

DRA. MARIETTA TUENA SANGRI
(INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR)

CIUDAD UNIVERSITARIA CD. MX. MARZO 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Ostolga Chavarría Marcos
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día **23 de noviembre** del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro en Ciencias**, con la réplica de la tesis **"Purificación y caracterización del sector F1 de la F1F0-ATP sintasa mitocondrial del alga incolora *Polytomella sp.*"**, dirigida por el/la Dr(a). **González Halphen Diego**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Daniel Alejandro Fernández Velasco
VOCAL	Rosa Laura Camarena Mejía
VOCAL	Ruy Pérez Montfort
VOCAL	Sobeida Sánchez Nieto
SECRETARIO	María Soledad Funes Argüello

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 23 de noviembre de 2020



Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez
Coordinadora

HONORABLE JURADO

PRESIDENTE: Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco.

SECRETARIO: Dra. María Soledad Funes Argüello.

VOCAL: Dra. Rosa Laura Camarena Mejía.

VOCAL: Dra. Sobeida Sánchez Nieto.

VOCAL: Dr. Ruy Pérez Montfort.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 324 Norte del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Diego González Halphen.

Este trabajo contó con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico DGAPA-UNAM, México, (donativo PAPIIT IN209220) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, México (donativos 239219 y 279125).

Marcos Ostolga Chavarría es estudiante del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y recibió una beca para estudios de posgrado por parte del CONACyT (México) (número de CVU 710287).

Se agradece el apoyo técnico de la QPB Miriam Vázquez Acevedo en el desarrollo del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, al Instituto de Fisiología Celular y principalmente al Dr. Diego González Halphen por darme la oportunidad de realizar mi formación de estudios de posgrado en su laboratorio, por sus consejos y correcciones, por tenerme paciencia, apoyarme y guiar mi camino hacia la investigación.

A la QPB. Miriam Vázquez Acevedo, por la calidez con que me recibió, por su entusiasmo y siempre estar dispuesta a ayudar a cualquiera que lo necesite, sea propio o extraño (del laboratorio o algún vecino). Además de cumplir múltiples tareas en el laboratorio, que hacen que el motor siga caminando; al señor Alfredo, quien siempre está cuidando que el laboratorio este al 100 %, y al igual que Miriam, siempre está dispuesto a ayudar a propios y extraños; ¡definitivamente sin ustedes, nada funcionaría igual!

A mis compañeros, Jose Luis, Emma, Felipe, Vania y Cristopher por el tiempo pasado en el laboratorio, las pláticas, las risas, anécdotas y consejos, a los académicos del posgrado que siempre se interesan por el contenido de los cursos, para seguir formando investigadores de calidad en el país; y a todos aquellos con los que he compartido las aulas en este arduo camino, no cabe duda de que el IFC, es una gran familia y ahora me siento agradecido por formar parte de ella.

Al Dr. Hector Miranda Astudillo por el apoyo mostrado, los consejos, y la ayuda no solo a la hora de discutir resultados, sino también para llevar a cabo algunos experimentos que forman parte de este proyecto, por la revisión del manuscrito de tesis y por los comentarios acertadamente aportados.

A los miembros del Honorable Jurado por la revisión del manuscrito de tesis y sus valiosas correcciones y sugerencias.

A todos, ¡**Muchas gracias!**

DEDICATORIAS

A la memoria de mi Bisabuela Ana María Bravo Segura; por haberme educado y darme todo el amor y el cariño que un niño puede pedir.

A la memoria de mi Madre, Maribel Chavarría Méndez, por darme la vida y enseñarme que no importa las adversidades a las que uno se enfrenta, se pueden superar si uno se lo propone.

A mi Abuelo José Chavarría Bravo; por todo el apoyo dado a lo largo del camino y por confiar en mí en momentos difíciles.

A Dana Stephani Arana Hidalgo, con mucho amor y cariño por apoyarme y ayudarme a ser mejor persona cada día, además de estar conmigo en momentos buenos y malos.

A mi padre José Luis Ostolga Mercado; por ser mi ejemplo de esfuerzo y superación.

Y por último, pero no menos importante a todas aquellas personas que me han ayudado de una manera desinteresada y de buena voluntad, sería imposible nombrarlos a todos, pero doy gracias infinitas por toda la ayuda brindada a lo largo del camino.

"El peor error es no hacer nada por pensar que es poco lo que se puede hacer"

Edmund Burke

"El científico encuentra su recompensa en lo que Henri Poincare llama el placer de la comprensión, y no en las posibilidades de aplicación que cualquier descubrimiento pueda conllevar"

Albert Einstein

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Origen y función de la mitocondria	1
1.2. Cadena transportadora de electrones (CTE)	7
1.3. Complejo V y síntesis de ATP	14
1.4. F ₁ -ATPasa mitocondrial	19
1.5. El alga incolora <i>Polytomella sp.</i>	20
2. Justificación.....	30
3. Hipótesis.....	31
4. Objetivos Generales.	31
5. Objetivos Particulares.	32
6. Diseño experimental.....	33
7. Metodología.	34
7.1. Cultivo de <i>Polytomella sp.</i>	34
7.2. Extracción de las células del alga <i>Polytomella sp.</i>	34
7.3. Obtención de Mitocondrias.....	34
7.4. Purificación de F ₁ F ₀ -ATP sintasa.....	35
7.5. Liberación de F ₁ mediante tratamiento con detergente y calor.....	36
7.6. Obtención de partículas submitocondriales	36
7.7. Liberación de F ₁ mediante tratamiento con cloroformo	36
7.8. Electroforesis azul nativa (BN-PAGE) y en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	37
7.9. Ensayo de actividad en gel para la ATP sintasa ¡Error! Marcador no definido.	
7.10. Ensayo de hidrólisis de ATP por espectrofotometría.....	37
8. Resultados	39
8.1. Análisis estructural de los modelos de F ₁ -ATPasas de diferentes especies unidos a sus inhibidores.	39
8.2. Inhibidores de la hidrólisis de ATP en <i>B. taurus</i> y en el α -proteobacteria <i>P. denitrificans</i>	40
8.3. Alineamiento de secuencia de los péptidos inhibidores de la hidrólisis de ATP. .	41
8.4. Extensión de la región N-terminal de la subunidad δ de la ATP sintasa de <i>Polytomella sp.</i>	42

8.5.	Análisis de estructural y alineamiento de secuencias entre la subunidad δ de <i>Polytomella sp.</i> y la subunidad ϵ <i>E. coli</i> .	48
8.6.	Purificación de la ATP sintasa mitocondrial del alga <i>Polytomella sp.</i>	49
8.7.	Liberación del sector F_1 mediante tratamiento con detergente y calor.	51
8.8.	Purificación del sector F_1 -ATP sintasa liberado de la ATP sintasa mitocondrial aislada.	52
8.9.	Extracción de SMP del alga incolora <i>Polytomella sp.</i>	53
8.10.	Calidad de las SMP generadas por sonicación.	54
8.11.	Liberación de F_1 a partir de SMP mediante tratamiento con cloroformo.	55
8.12.	Purificación del sector F_1 liberado a partir de SMP.	57
8.13.	Comparación del sector F_1 liberado por ambos diseños experimentales contra el sector F_1 liberado solo por tratamiento con calor.	58
8.14.	Rendimiento de la F_1 liberada mediante dos estrategias experimentales.	59
9.	Discusión	61
10.	Conclusión	73
11.	Bibliografía	74

RESUMEN

La ATP sintasa es una enzima ubicua que está altamente conservada desde bacterias hasta organismos superiores. Su estructura básicamente está compuesta por dos regiones bien definidas: el sector catalítico F_1 que cuenta con las subunidades (β , α , γ , δ , ϵ), y el sector F_0 que se encuentra embebido en la Membrana Interna Mitocondrial, formado por un anillo de subunidades c y una subunidad a , que forma dos semicanales por donde los protones son translocados desde el espacio intermembranal hacia la matriz mitocondrial. Ambos sectores se encuentran conectados por una serie de proteínas que forman una estructura denominada brazo periférico, la cual funciona como un estator cuando se lleva a cabo la catálisis rotacional de la enzima.

A pesar de que esta enzima se encuentra altamente conservada en estructura y función, existen una serie de ATP sintasas que presentan características únicas que las hacen interesantes para su estudio. Entre ellas se encuentra la enzima del alga clorofícea incolora *Polytomella sp.*, la cual presenta características distintivas que no se han encontrado en las enzimas de otras especies que no pertenecen a este linaje de algas. Una de las principales diferencias se encuentra en las proteínas que forman parte del brazo periférico, las cuales no comparten un origen evolutivo con las proteínas que forman la misma estructura en la enzima de otras especies. Además, las subunidades α y las subunidades β que forman el núcleo catalítico, presentan extensiones en las regiones N-terminal y C-terminal respectivamente, que contribuyen a la alta estabilidad de la enzima.

En este trabajo se realizó la purificación del sector F_1 , donde reside el núcleo catalítico de la enzima, para dilucidar algunos aspectos relacionados con el control de la actividad de ATPasa.

ABSTRACT

ATP synthase is a ubiquitous enzyme that is highly conserved from bacteria to higher organisms. Its structure is basically composed of two well-defined regions: the F₁ catalytic sector that has the subunits (β , α , γ , δ , ϵ), and the F_O sector that is embedded in the Mitochondrial Inner Membrane, formed by a ring of c subunits and an a subunit, which forms two semi-channel through which protons are translocated from the intermembrane space to the mitochondrial matrix. Both sectors are connected by a series of proteins that form a structure called the peripheral arm, which functions as a stator when the rotational catalysis of the enzyme is carried out.

Despite that this enzyme is highly conserved in structure and function, there are a series of ATP synthases that exhibit unique characteristics that make them interesting for study. Among these is the enzyme of the colorless alga *Polytomella sp.* that belongs to the group of chlorophyte algae, which has distinctive characteristics that have not been found in the enzyme of other species. One of the main differences is found in the proteins that are part of the peripheral arm, which do not share an evolutionary origin with the proteins that form the same structure in the enzyme of other species. In addition, the α subunits and the β subunits that form the catalytic nucleus present extensions in the N-terminal and C-terminal regions respectively, which contribute to the high stability of the enzyme.

This work aims to purify the F₁ sector where the catalytic nucleus of the enzyme resides, to elucidate aspects related to the control of ATPase activity, which remain unclear.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema general de la teoría endosimbiótica propuesta originalmente por Lynn Margulis	1
Figura 2 Esquema clásico de una mitocondria	6
Figura 3 Cadena transportadora de electrones	7
Figura 4 Flujo de electrones a través del complejo I mitocondrial (NADH deshidrogenasa)	8
Figura 5 Flujo de electrones a través del complejo II mitocondrial (succinato deshidrogenasa) ..	10
Figura 6 Flujo de electrones (ciclo de la ubiquinona)	11
Figura 7 Flujo de electrones a través del complejo IV mitocondrial	12
Figura 8 Organización supramolecular de los complejos respiratorios	14
Figura 9 Estructura de la F_1F_0 -ATP sintasa de bacterias y la F_1F_0 -ATP sintasa de bovino	16
Figura 10 Catálisis rotacional y mecanismo de unión	18
Figura 11 Experimentos que demuestra la catálisis rotacional	20
Figura 12 Fotografía tomada por microscopía óptica (izquierda) y esquema (derecha) de <i>Polytomella</i> sp.	21
Figura 13 Microscopía electrónica del complejo V mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp. y <i>S. cerevisiae</i> aislado por centrifugación en gradiente de sacarosa.	23
Figura 14 Modelo estructural de la ATP sintasa de <i>Polytomella</i> sp., (acceso PDB: 6RE0)	27
Figura 15 Estrategias para liberar el sector F1 de la ATP sintasa mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp.	33
Figura 16 Sistema de regeneración de ATP empleado para evaluar la actividad hidrolítica de la enzima	38
Figura 17 . Proteínas inhibitorias de la hidrólisis de ATP en bacterias	40
Figura 18 Proteínas inhibitorias de la hidrólisis de ATP, que no pertenecen al complejo enzimático	41
Figura 19 Alineamiento de secuencias de los inhibidores de la hidrólisis de ATP	42
Figura 20 Superposición de estructuras de las ATP sintasas de <i>Polytomella</i> sp. y <i>B. taurus</i>	43
Figura 21 Análisis de alineamiento de secuencias mediante BLAST de los primeros 75 residuos de aminoácidos de la región N-terminal de la subunidad δ de <i>Polytomella</i> sp.	44
Figura 22 Alineamiento de la subunidad δ de la ATP sintasa mitocondrial de organismos pertenecientes al género de algas verdes	45
Figura 23 Alineamiento de la subunidad δ de la ATP sintasa mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp. contra la misma subunidad en otras especies	46
Figura 24 Alineamiento de la subunidad δ de la ATP sintasa mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp. contra la misma subunidad en otras especies de plantas	47
Figura 25 Análisis de estructural y alineamiento de secuencias entre la subunidad δ de <i>Polytomella</i> sp. y la subunidad ϵ <i>E. coli</i>	48
Figura 26 Purificación de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp.	50
Figura 27 Liberación del sector F_1 de la enzima F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial de <i>Polytomella</i> sp.	51
Figura 28 Cromatografía de exclusión molecular del sector F_1 liberado de la F_1F_0 -ATP sintasa purificada	52
Figura 29 Esquema resumido del protocolo de extracción de SMP y liberación del sector F_1 -ATPasa por cloroformo	54

Figura 30 Consumo de oxígeno de SMP de <i>Polytomella</i> sp.	55
Figura 31 Liberación de F_1 a partir de SMP de <i>Polytomella</i> sp.	56
Figura 32. Cromatografía de exclusión molecular del sector F_1 liberado a partir de SMP.	57
Figura 33 Comparación de tres preparaciones de F_1-ATPasa de <i>Polytomella</i> sp.	58
Figura 34 Tabla de Rendimiento de la F_1 liberada mediante dos estrategias experimentales.....	60

ABREVIATURAS

$\Delta\psi$ Potencial transmembrana

ATP Adenosín trifosfato

BN-PAGE Electroforesis en geles de poliacrilamida azul nativa

CoQ Ubiquinona

CoQH₂ Ubiquinol

Cryo-EM Criomicroscopía electrónica

CTE Cadena transportadora de electrones

FADH₂ Dinucleótido de Flavina-Adenina (Reducido)

LDH Lactato deshidrogenasa

MEM Membrana externa mitocondrial

MIM Membrana interna mitocondrial

NADH Dinucleótido de nicotinamida y adenina

OXPHOS Fosforilación oxidativa

PEP Fosfoenol piruvato

PK Piruvato cinasa

ROS Especies Reactivas de Oxígeno

SDS-PAGE Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida

SMP Partículas submitocondriales

TDOC Taurodesoxicolato de sodio

1. Introducción

1.1. Origen y función de la mitocondria

Las mitocondrias son organelos celulares que por años han despertado el interés de varios grupos de investigación; ya sea por lo intrigante de su origen o por su particular y compleja red de funciones, este organelo no ha pasado desapercibido en la historia de las ciencias biológicas. Gracias al entusiasmo y esfuerzo de muchos investigadores ahora conocemos varios detalles moleculares de estos compartimentos celulares.

Uno de los aspectos más interesantes de la mitocondria es su origen; desde hace tiempo está ampliamente aceptado que las mitocondrias son el resultado de un evento único de endosimbiosis, como lo postuló Lynn Margulis en 1967 (Sagan, 1967) (Figura 1). Las mitocondrias son descendientes de un organismo de vida libre que fue engullido por una célula huésped sin ser destruido (Lang et al., 1999). Hoy sabemos que probablemente uno de estos organismos de vida libre era un ancestro de las α -proteobacterias actuales, ya que estudios filogenéticos han demostrado que las mitocondrias se encuentran relacionadas con parásitos intracelulares como *Rickettsia*, *Ehrlichia* y *Anaplasma* (Wang y Wu, 2015).

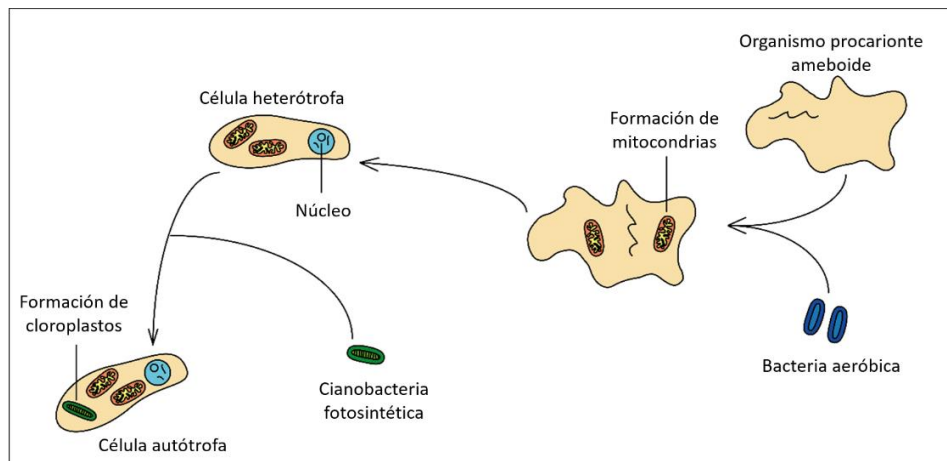


Figura 1 Esquema general de la teoría endosimbiótica propuesta originalmente por Lynn Margulis

En dicha teoría se postula que las mitocondrias se originaron hace unos 2500 millones de años, a partir de una bacteria anaeróbica que estableció una relación simbiótica permanente con un eucariota anaeróbico primitivo. La adquisición de las mitocondrias constituye una etapa fundamental para los eucariotas, ya que otorga la capacidad de realizar la respiración aeróbica. Los cloroplastos se adquirieron más tarde, hace entre 1000 y 1200 millones de años, a partir de algunos eucariotas que fagocitaron bacterias fotosintéticas y estableció una relación simbiótica con ellas; para posteriormente dar paso a diversos grupos de importancia biológica. (modificado de LORENZO CORCHÓN, A../"La teoría endosimbiótica"/. Asturnatura.com [en línea] Núm. 510, [consultado el 25/06/2020].

Sin embargo, a pesar de que varios estudios respaldan la hipótesis de que las proto-mitocondrias se originaron a partir de *Rickettsia* y sus parientes, esta idea ha sido puesta en duda al presentar ciertos inconvenientes. Por ejemplo, en términos bioenergéticos todos los *Rickettsiales* han perdido elementos del metabolismo de nitrógeno, el cual aún se encuentra presente en mitocondrias de algunos organismos eucariontes como los hongos.

En un estudio de Degli Esposti y colaboradores, se hizo una propuesta alternativa donde se postula a otro grupo de α -proteobacterias denominadas metilotróficas que viven en fuentes de carbono simple como el metano o el metanol y que originalmente no habían sido tomadas en cuenta para los estudios del origen endosimbiótico de las mitocondrias (Degli Esposti et al., 2014). En este trabajo, el enfoque aplicado para rastrear a los parientes de las mitocondrias ancestrales (proto-mitocondrias) se basó en reconstruir mediante análisis genómico comparativo los sistemas bioenergéticos que son comunes entre mitocondrias y bacterias. Sin embargo, este trabajo excluyó a muchas bacterias que previamente se habían propuesto como ancestros mitocondriales, por lo tanto, generó controversia en los campos de la evolución, la microbiología y la bioenergética. Debido a esto, sólo unos meses después el mismo grupo de trabajo presentó información adicional donde se apoya la hipótesis de que las bacterias metilotróficas son los parientes más cercanos a las mitocondrias (Degli Esposti, 2014). Como resultado de ambos trabajos ahora se considera a las bacterias metilotróficas como buenos candidatos para ser los antepasados mitocondriales por las siguientes razones:

- Son organismos evolutivamente antiguos; el linaje de las α -proteobacterias ocupa una posición central dentro del *Phylum* de las proteobacterias, ya que se originaron después de la separación de los linajes predominantemente anaeróbicos γ y ϵ pero antes de la división de los linajes α y β predominantemente anaeróbicos facultativos.
- Están relacionadas con organismos autótrofos que forman simbioses permanentes con animales invertebrados que viven en hábitats de aguas profundas.
- Tienen una cadena respiratoria bioenergéticamente eficiente, incluso en concentraciones bajas de oxígeno; vale la pena recordar que la evolución de las proto-mitocondrias y las primeras células eucariotas se produjo cuando los niveles de oxígeno todavía eran muy bajos en los océanos.

- Cuentan con invaginaciones de la membrana interna las cuales se asemejan a las crestas mitocondriales y son igualmente necesarias para expandir la superficie membranal que aloja a los complejos respiratorios que proporcionan energía.

A pesar de esta nueva propuesta, debemos tener en cuenta que aún no sabemos exactamente quién fue el ancestro proto-mitocondrial, por lo tanto, responder la pregunta de ¿cómo? y ¿cuándo? llegaron las mitocondrias, es uno de los mayores retos que rodea al origen de los eucariontes.

Como se mencionó anteriormente la teoría endosimbiótica propuesta por Linn Margulis está ampliamente aceptada entre la comunidad científica, sin embargo, la propuesta original ha ido cambiando a lo largo de años y ha llevado a algunos grupos de investigación a proponer hipótesis alternativas que toman en cuenta información actual acerca de los microorganismos y los nichos ecológicos que pudieron estar involucrados en el proceso de eucariogénesis.

Entre los modelos propuestos para explicar la eucariogénesis destacan: la hipótesis del hidrogeno propuesta por Martin y Müller (Martin and Müller, 1998) y la hipótesis de la sintrofia propuesta por López-García (Moreira y Lopez-Garcia, 1998). La hipótesis del hidrogeno plantea que los eucariontes surgieron a través de una asociación metabólica entre una α -proteobacteria que genera hidrogeno y dióxido de carbono como productos y un arquea metanogénica en un ambiente anaeróbico rico en hidrógeno y dióxido de carbono (Martin y Müller, 1998). Otro trabajo publicado el mismo año que el trabajo de Martin y Müller (Vellai et al., 1998), también proponía que una α -proteobacteria habría sido engullida por una arquea estableciendo una relación endosimbiótica, sin embargo, lo novedoso de la hipótesis del hidrógeno es que brindaba una explicación plausible del proceso de endosimbiosis en términos metabólicos, apoyando la idea de que este evento fue clave para el origen de los primeros eucariontes (teoría big bang o mitocondria temprana).

Por otro lado, la hipótesis de la sintrofia se basa igualmente en consideraciones metabólicas, pero en ella se especula que los microorganismos involucrados en el proceso de eucariogénesis fueron una δ -proteobacteria (como el hospedero) y una arqueobacteria metanogénica (como endosimbionte) los cuales habrían establecido una endosimbiosis primaria.

Posteriormente, el ancestro mitocondrial (una α -proteobacteria) habría sido engullida como un endosimbionte secundario anaeróbico, lo que apoyaría la idea del origen de la mitocondria tardía (Moreira y Lopez-Garcia, 1998).

A pesar de que en la hipótesis del hidrogeno se plantea a las α -proteobacterias como endosimbionte primario y en la hipótesis de la sintrofia se plantea como un endosimbionte secundario, ambas hipótesis están de acuerdo que el ancestro mitocondrial fue un organismo anaerobio (López-García y Moreira, 1999). Lo cual contradice la teoría endosimbiótica clásica en la que se asumía que el ancestro de la mitocondria era un organismo aerobio eficiente (Sagan, 1967).

Con el reciente descubrimiento de un grupo de arqueas complejas que pertenecen al superfilo Asgard se han impuesto nuevas limitaciones a los modelos antes mencionados, ya que ahora se deben considerar el potencial metabólico de estas arqueas para esclarecer el verdadero papel que desempeñaron durante la eucariogénesis (Eme et al., 2017).

Recientemente se propuso una visión actualizada de la hipótesis de la sintrofia que difiere en la interacción metabólica propuesta en un principio (López-García y Moreira, 2020). La hipótesis original de la sintrofia se basa en la transferencia de hidrógeno entre un ancestro reductor de sulfato (δ -proteobacteria), con una arquea metanogénica que emplea el hidrógeno derivado de la fermentación para la metanogénesis (hipótesis de sintrofia HM) (López-García y Moreira, 1999). Por otro lado, la versión actualizada de esta hipótesis involucra la transferencia inespecífica de hidrógeno y sulfuro, la cual podría ocurrir en un ambiente con transición redox como el que se cree se encontraba en la tierra primitiva. En esta variante de la hipótesis original denominada sintrofia HS se plantea la idea de una simbiosis entre una arquea primitiva del phylum Asgard liberadora de hidrógeno capaz de degradar pequeños compuestos orgánicos incluidos ácidos grasos, alcanos y compuestos aromáticos para su crecimiento (como el huésped que daría origen al núcleo) y una δ -proteobacteria capaz de captar hidrogeno o equivalentes reductores para la reducción de sulfuro (como el hospedero). En este modelo el ancestro mitocondrial (α -bacteriano) sería un organismo aerobio facultativo capaz de oxidar sulfuro, con lo cual se establecería una asociación metabólica entre estos tres microorganismos (López-García y Moreira, 2020).

Independientemente de cuál fue el organismo ancestral que engulló a las proto-mitocondrias sin destruirlas (una arquea o una δ -proteobacteria), existe evidencia que refuerza el postulado de la teoría endosimbiótica y la sigue haciendo válida. Por ejemplo, organelos celulares que tuvieron este origen como mitocondrias y cloroplastos, cuentan con un genoma propio. Si bien es cierto que la mayor parte de los genes que codifican para la red de proteínas mitocondriales han migrado al genoma nuclear del huésped (Priesnitz y Becker, 2018), existen componentes proteicos indispensables para el correcto funcionamiento celular que aún están codificadas en el genoma mitocondrial y que se sintetizan dentro de la misma mitocondria. Entre ellos, se encuentran los genes de muchas de las subunidades de la cadena transportadora de electrones (CTE) y de la ATP sintasa, además de 22 RNAs de transferencia y 2 RNAs ribosomales, lo que demuestra que en algún momento este organelo celular contaba con la maquinaria necesaria para llevar a cabo sus funciones de manera independiente (Friedman y Nunnari, 2014).

Otra evidencia que apoya la idea de que las mitocondrias fueron organismos de vida libre, es la composición bioquímica de sus membranas; la membrana externa mitocondrial (MEM) está compuesta por fosfolípidos característicos de membranas plasmáticas de organismos eucariontes. Por otro lado, la composición lipídica de la membrana interna mitocondrial (MIM) se asemeja más a la de una membrana bacteriana. Una de las características distintivas de la MIM es que se encuentra ampliamente plegada en invaginaciones de sí misma llamadas crestas mitocondriales, que generan una mayor superficie para poder alojar una gran cantidad de complejos membranales que participan en la fosforilación oxidativa (Alberts et al., 2002).

El hecho de que estas membranas delimiten tres compartimentos celulares bien definidos: 1) el citosol, 2) el espacio intermembranal y 3) la matriz mitocondrial, ofrece a este organelo la capacidad de llevar a cabo un gran número de funciones y procesos muy específicos y de manera altamente eficiente (Figura 2) (García-Bermúdez y Cuezva, 2016).

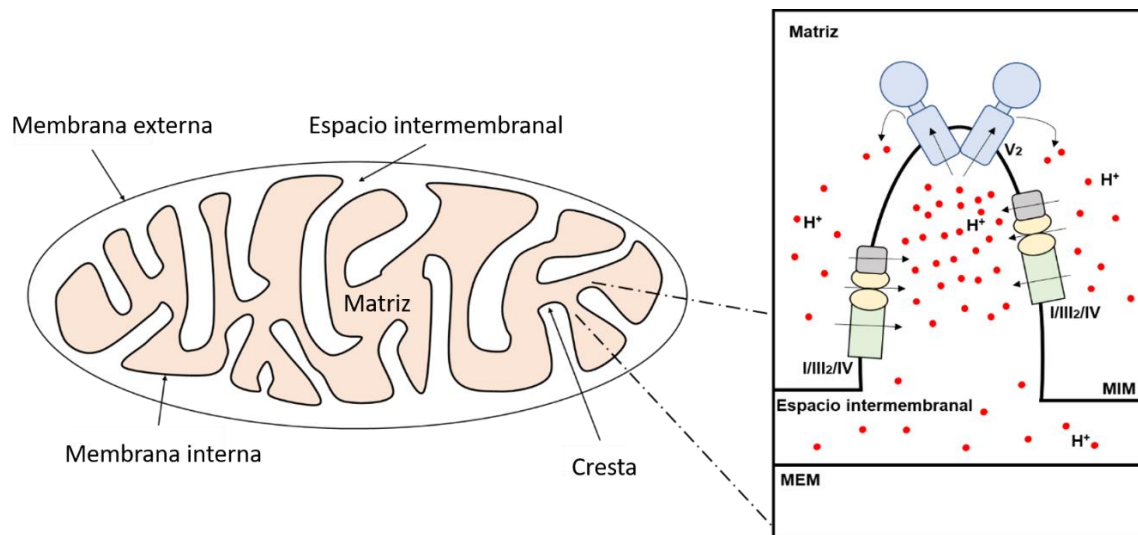


Figura 2 Esquema clásico de una mitocondria

La mitocondria es un organelo celular que cuenta con dos membranas resultado de su origen endosimbiótico, la membrana externa mitocondrial (MEM) que delimita el contacto con el citosol y la membrana interna (MIM) la cual tiene la característica de encontrarse altamente plegada formando invaginaciones denominadas crestas mitocondriales donde residen la mayor parte de los complejos respiratorios y la ATP sintasa. Además este organelo cuenta con un espacio intermembranal y una matriz mitocondrial donde se llevan a cabo procesos específicos. La compartimentalización de estas regiones permite a este organelo llevar a cabo múltiples funciones de manera altamente eficiente.

La mitocondria es uno de los organelos más versátiles dentro de las células eucariontes, ya que cumple diversas funciones que tienen que ver principalmente con el metabolismo celular. A *grosso modo*, la fosforilación oxidativa (OXPHOS) involucra la transferencia de electrones a través de distintos complejos multiproteicos, tres de estos complejos (I, III y IV) acoplan la energía de flujo de electrones con un bombeo de protones a través de la MIM hacia el espacio intermembranal, generando un gradiente electroquímico que es utilizado por el complejo V o ATP sintasa para llevar a cabo la síntesis de ATP (Mitchell, 1961).

Aunque la síntesis de ATP se mencione como la función primordial de la mitocondria (Berg et al., 2002; Boreikaite et al., 2019; Lodish et al., 2000), este organelo también está implicado en varios procesos celulares, que incluyen el metabolismo de lípidos y aminoácidos, el desencadenamiento de la apoptosis (muerte celular programada) (Green and Kroemer, 2004), la regulación homeostática de iones de Ca^{2+} (Giorgi et al., 2012), la síntesis de cofactores indispensables de algunas proteínas como centros Fe-S (Stehling et al., 2014) y la generación fisiológica y patológica de especies reactivas de oxígeno ROS (Murphy, 2009).

1.2. Cadena transportadora de electrones (CTE)

El transporte de electrones a través de los complejos mitocondriales y la síntesis de ATP, son dos procesos metabólicos acoplados que en su conjunto se conocen como Fosforilación Oxidativa (OXPHOS) (Mitchell, 1961). Ambos procesos se llevan a cabo en la MIM. Como se mencionó anteriormente, la primera parte de este proceso involucra complejos macromoleculares compuestos por diversas subunidades de proteínas, estos complejos son capaces de transferir electrones provenientes de la oxidación de sustratos como el NADH y el FADH₂, empleando al oxígeno molecular (O₂) como el aceptor final de electrones formando moléculas de agua (H₂O) a través del complejo IV (Murphy, 2009).

Los complejos respiratorios, en conjunto con dos acarreadores móviles de electrones (la ubiquinona y el citocromo *c*) componen el sistema de la CTE. Tres de estos complejos, (complejo I, III y IV), además de llevar a cabo el transporte de electrones, participan en el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, generando el potencial transmembranal necesario para impulsar la producción de ATP por el complejo V (Figura 3).

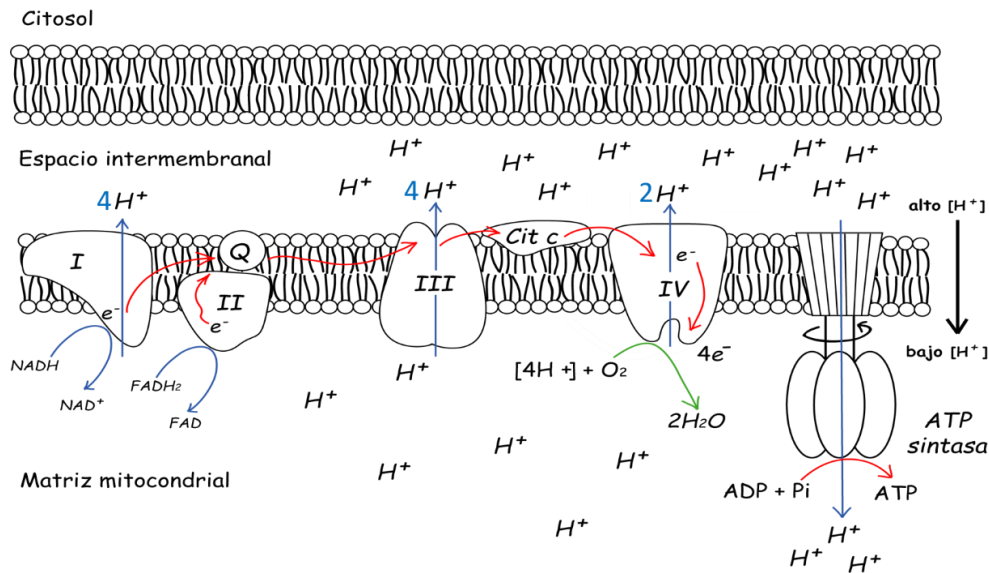


Figura 3 Cadena transportadora de electrones

La cadena transportadora conduce los electrones provenientes de la oxidación de sustratos como el NADH y el FADH₂ a través de distintos complejos macromoleculares denominados complejos mitocondriales: complejo I o NADH deshidrogenasa, complejo II o succinato deshidrogenasa, complejo III o quinol: citocromo *c* oxidoreductasa y complejo IV o citocromo *c* oxidasa, tres de estos complejos complejo I, II y IV acoplan el flujo de electrones con un bombeo de protones hacia el espacio intermembranal, creando un gradiente electroquímico el cual es empleado por el complejo V (ATP sintasa) para llevar a cabo la síntesis de ATP.

1.2.1. Complejo I (NADH: Ubiquinona deshidrogenasa)

El complejo I mitocondrial (NADH: ubiquinona oxidorreductasa) desempeña un papel central en el metabolismo celular. Este complejo enzimático transporta los electrones desde el NADH a la ubiquinona (CoQ), por lo tanto, representa uno de los primeros puntos de entrada para los electrones en la cadena respiratoria. En cada ciclo catalítico se emplean dos electrones para reducir la ubiquinona (CoQ) a ubiquinol (CoQH₂), al tiempo que cuatro protones son translocados a través del complejo y liberados hacia el espacio intermembranal. La reacción generalizada catalizada por este complejo es la siguiente:

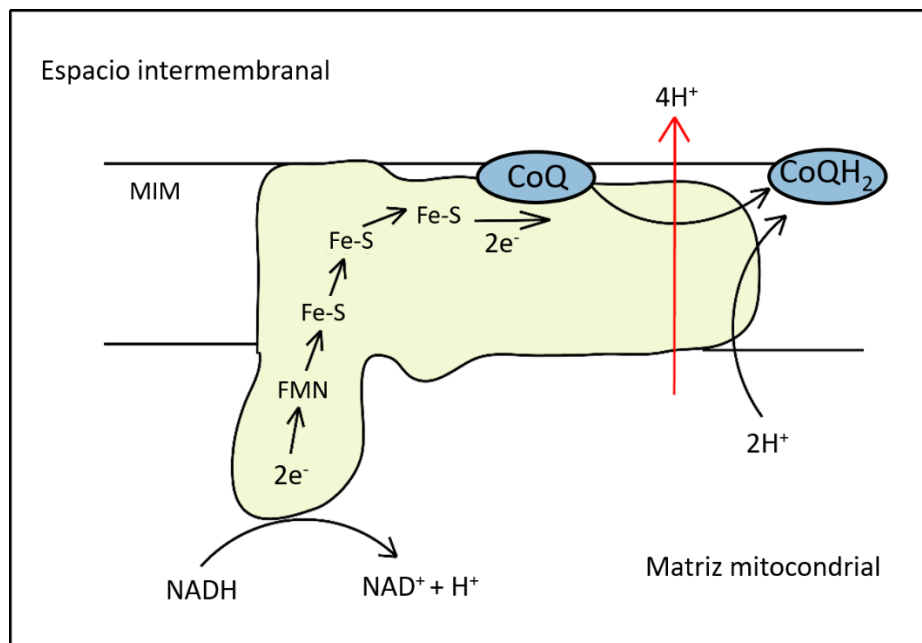


Figura 4 Flujo de electrones a través del complejo I mitocondrial (NADH deshidrogenasa)

Los electrones provenientes de la oxidación del NADH pasan a través de distintos centros Fe-S que se encuentran dentro del complejo I para finalmente reducir a la ubiquinona (CoQ) a ubiquinol (CoQH₂) al mismo tiempo que 4 protones (H⁺) son translocados (bombeados) desde la matriz al espacio intermembranal.

El gradiente de protones generado por este complejo mitocondrial contribuye con $\approx 40\%$ de la fuerza protón-motriz que se emplea para la síntesis de ATP y otros procesos como la importación y exportación de proteínas y metabolitos (Priesnitz y Becker, 2018). Este complejo enzimático es el más grande de la CTE y está compuesto por al menos 45 subunidades. Estudios de cristalografía de rayos X del complejo I mitocondrial de *Bos taurus*, revelaron que éste adopta una forma de “L” y consta de dos dominios; el brazo hidrofóbico que se encuentra anclado a la MIM y el brazo soluble que sobresale hacia la matriz mitocondrial (Figura 4). Los componentes centrales de éste complejo se encuentran conservados desde bacterias hasta organismos superiores y se componen principalmente de 14 subunidades que forman el núcleo catalítico (Zhao et al., 2019)

1.2.2. Complejo II (succinato deshidrogenasa)

El complejo II (succinato deshidrogenasa) es el complejo más pequeño de la CTE, formado solamente por 4 subunidades; esta enzima oxida una molécula de succinato a fumarato, como parte del ciclo de Krebs que ocurre en el medio acuoso de la matriz mitocondrial. A pesar de que este es el único complejo que no contribuye con el bombeo de protones hacia el espacio intermembranal, es parte integral del sistema, ya que los 2 electrones liberados durante la catálisis de succinato a fumarato son transferidos a un dinucleótido de flavina y adenina (FAD) para reducirlo a FADH₂. Esta molécula a su vez cederá los electrones a un portador Fe-S y este último a la CoQ reduciéndola hasta CoQH₂ (Figura 5).

Por lo tanto, esta enzima aporta equivalentes reductores combinando dos procesos metabólicos muy importantes, ya que al reducir la poza de quinonas, este complejo alimenta a los complejos (III y IV) río abajo en la cadena respiratoria, los cuales sí contribuyen a la formación del gradiente electroquímico.

La reacción que cataliza el complejo II es la siguiente:



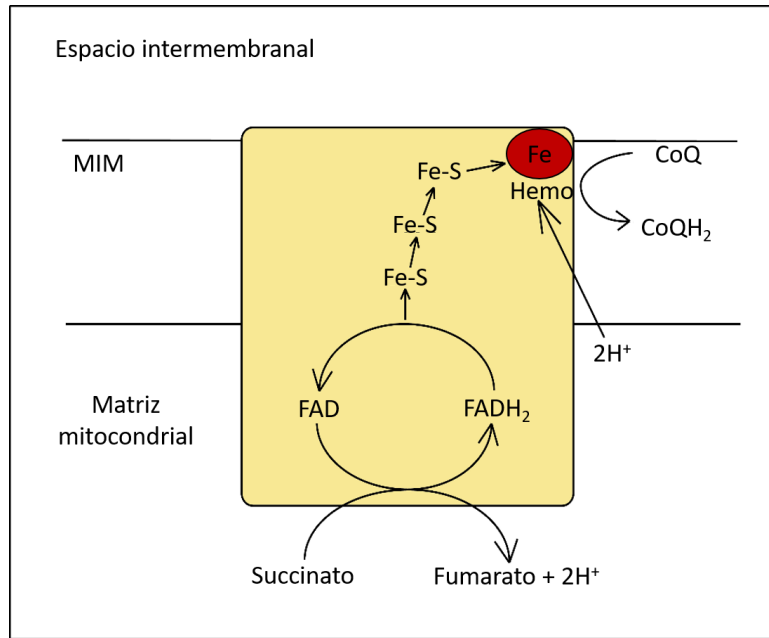


Figura 5 Flujo de electrones a través del complejo II mitocondrial (succinato deshidrogenasa)

Esta enzima se encuentra unida a la membrana interna mitocondrial e interviene tanto en ciclo de Krebs como en la CTE ya que contienen una molécula de FAD unida covalentemente. La molécula FAD funciona como aceptor de electrones, sin embargo, al no poder desplazarse del complejo enzimático debe ser oxidada nuevamente. El FADH₂ cede los hidrógenos a la ubiquinona (CoQ) para reducirla a ubiquinol (CoQH₂), el cual difunde en la membrana lipídica hasta alcanzar el siguiente complejo enzimático de la CTE.

1.2.3. Complejo III (Q-citocromo *c* oxidorreductasa)

El complejo III (Quinol: citocromo *c* oxidorreductasa o citocromo *bc*₁) cataliza la transferencia de electrones desde el CoQH₂ hasta el citocromo *c*, este complejo es un homodímero obligado formado por 11 subunidades en cada monómero. El proceso de transferencia de electrones se lleva a cabo a través del llamado ciclo Q o ciclo de la ubiquinona, que comprende dos rondas de reacciones de oxidoreducción: en la primera ronda, el CoQH₂ se une al complejo III y en una reacción concertada se reduce un centro Fe-S de la proteína de Rieske y el grupo hemo *b_L* del citocromo *b*. Este proceso está acoplado con el bombeo de 2 protones hacia el espacio intermembranal. Posteriormente, uno de los electrones es transferido desde la proteína Rieske al citocromo *c*₁ para después ser donado al citocromo *c* soluble, quien a su vez llevará el electrón hasta el complejo IV (Figura 6).

Por otro lado, el electrón del grupo hemo b_L es transferido hacia grupo hemo b_H que reducirá a una CoQ para formar semiubiquinona ($\text{CoQ}^{\cdot-}$), al tiempo que capta un protón de la matriz mitocondrial. Para completar el ciclo, un segundo ubiquinol se une al citocromo b y los pasos anteriormente mencionados se repiten, con la diferencia de que el segundo electrón del grupo hemo b_H es aceptado por la $\text{CoQ}^{\cdot-}$ para reducirse completamente a CoQH_2 , al tiempo que se capta un protón más desde la matriz (Lodish et al., 2000).

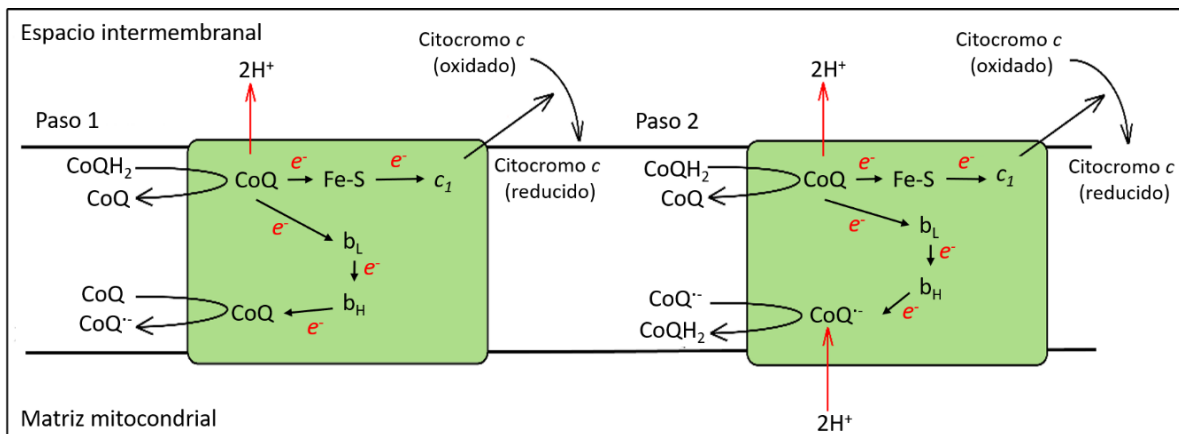


Figura 6 Flujo de electrones (ciclo de la ubiquinona)

El ciclo de la ubiquinona o ciclo Q permite la transferencia de electrones desde la CoQH_2 al citocromo c . Una vez que el ubiquinol (CoQH_2) se ha unido al complejo III, se oxida de forma divergente donando un electrón a la proteína Rieske Fe-S y otro al grupo hemo b_L . Después de adquirir un electrón la proteína Fe-S se desplaza acercándose a la subunidad citocromo c_1 y posteriormente el electrón es transferido a una molécula de citocromo c oxidado el cual puede difundir libremente por la MIM para hacer contacto con el complejo IV. Por otro lado, el electrón que fue transferido al grupo hemo b_L se usa para reducir al grupo hemo b_H que a su vez emplea el electrón para reducir parcialmente a una molécula de ubiquinona en semiubiquinona (Paso 1). Debido a que la semiubiquinona es inestable, la reacción aún no se puede considerar terminada, por lo que un segundo ciclo Q es necesario, con la segunda transferencia de electrones que recorren el mismo camino para reducir la ubiquinona a ubiquinol (Paso 2).

1.2.4. Complejo IV (citocromo c oxidasa)

El complejo IV (citocromo c oxidasa) es el receptor final de electrones en la cadena respiratoria y el encargado de reducir el oxígeno molecular (O_2) en agua (H_2O). Este complejo es parte de las oxidasas hemo-cobre y probablemente es la enzima mejor caracterizada de los tres complejos mitocondriales que bombean protones.

La citocromo *c* oxidasa consta de 13 subunidades diferentes en mamíferos, dos de las cuales contienen centros redox activos, un centro binuclear de cobre (Cu_A), un grupo hemo *a* y un grupo hemo a_3 . Las subunidades COX-I, COX-II y COX-III están codificadas en el DNA mitocondrial y conforman el núcleo catalítico de la enzima.

La subunidad COX-I contiene tres de los cuatro cofactores, el hemo *a*, el hemo a_3 y el Cu_B ; este último transfiere los electrones al O_2 (Figura 7). El complejo enzimático citocromo *c* oxidasa emplea la energía redox para bombear un protón por cada electrón transferido quedando la reacción general de este complejo de la siguiente manera:

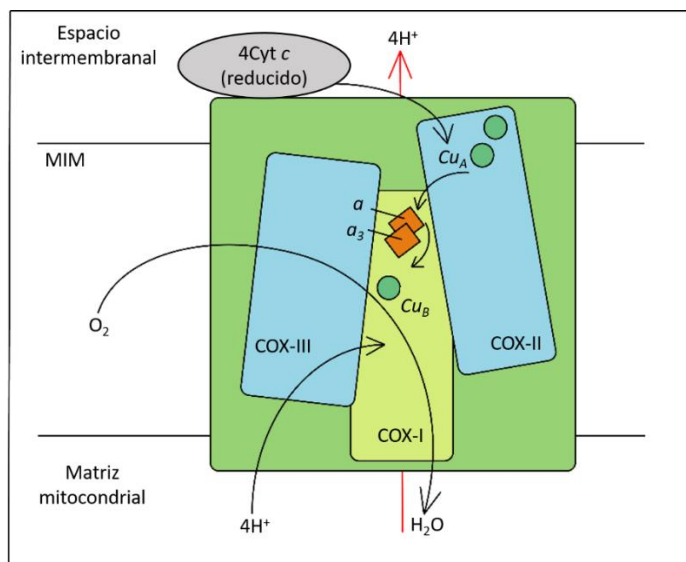
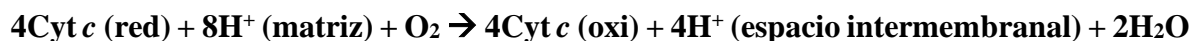


Figura 7 Flujo de electrones a través del complejo IV mitocondrial

La transferencia de electrones comienza cuando una molécula de citocromo *c* reducido dona un electrón a un centro binuclear Cu_A . Posteriormente los electrones pasan a través del hemo *a* al centro $Fe-Cu$ (a_3-Cu_B). Este proceso se lleva a cabo cuatro veces, ya que se requiere un total de cuatro electrones transferidos al oxígeno para reducirlo a agua, al tiempo que se consumen cuatro protones como sustrato desde la matriz y se bombean cuatro protones más desde la matriz al espacio intermembranal.

1.2.5. Organización supramolecular de la CTE.

La organización supramolecular de los complejos respiratorios en la MIM ha sido debatida por décadas y anteriormente existían dos modelos que pretendían explicarla: el modelo fluido y el modelo sólido. En el modelo de “estado fluido” los componentes de la cadena respiratoria (complejos I-IV) pueden moverse libremente en la MIM, y la transferencia de electrones se produce gracias a colisiones que ocurren aleatoriamente entre los diferentes complejos. En este modelo tanto la ubiquinona como el citocromo *c* ayudarían a transferir los electrones entre los diferentes complejos (Rich, 1984). El hecho de que todos los complejos respiratorios puedan ser purificados activos a partir de membranas mitocondriales aisladas, apoya este modelo (Hatefi, 1985) (Hackenbrock et al., 1986).

En el modelo de “estado sólido”, se propone una organización de la CTE en la que los complejos I, III y IV se encuentran asociados formando supercomplejos que muestran diferentes estequiometrías (Lenaz, 2001; Lenaz y Genova, 2007). Esta organización implica un transporte de electrones más eficiente reduciendo la fuga de electrones y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). La asociación de complejos individuales en una estructura supramolecular capaz de transferir electrones desde el NADH hasta el O₂ es conocido como respirosoma, y su existencia se apoya en observaciones experimentales que no pueden ser explicadas por el otro modelo (el modelo fluido) (Dudkina et al., 2005; Schägger y Pfeiffer, 2000; Stroh et al., 2004)

Mediante la solubilización con detergentes suaves como la digitonina y la implementación de técnica de electroforesis en geles azules nativos (BN-PAGE), se demostró la existencia de estas interacciones entre complejos, ya que con esta técnica pueden ser visualizados como agrupaciones macromoleculares de alto peso molecular (Schägger et al., 1994; Stroh et al., 2004). Análisis mediante centrifugación en gradientes de sacarosa, y estudios de microscopía electrónica tinción negativa (EM) corroboraron la formación de estos supercomplejos respiratorios y demostraron que tienen una estructura definida, formada por asociaciones del complejo I, un dímero de complejo III y una o varias copias del complejo IV (I/III₂/IV_n) (Dudkina et al., 2006; Schägger y Pfeiffer, 2000).

En los últimos años se ha propuesto un nuevo modelo de la CTE que concilia ambos modelos (el modelo fluido y el modelo sólido); dando paso al llamado “modelo de plasticidad” (Figura 8), el cual postula que la organización de los complejos es dinámica y depende de las necesidades energéticas celulares (Acín-Pérez et al., 2008). Esto se ha podido corroborar experimentalmente, demostrando que los complejos pueden asociarse de muy diversas formas para regular la homeostasis del metabolismo bioenergético (Acín-Pérez y Enriquez, 2014).

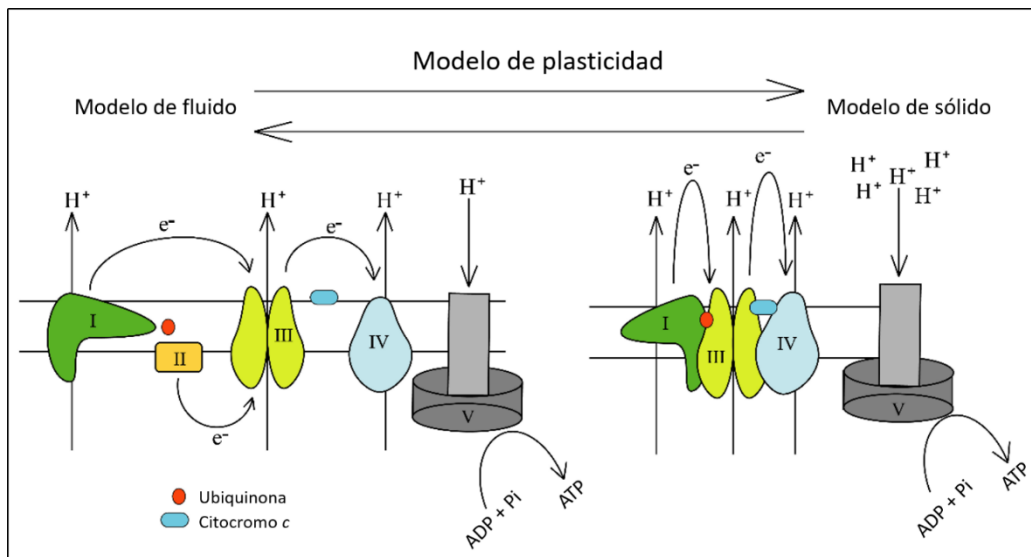


Figura 8 Organización supramolecular de los complejos respiratorios

Los modelos fluido y sólido de la membrana interna mitocondrial representan manifestaciones extremas de una red dinámica más compleja, el llamado modelo de plasticidad, en los que los diversos complejos respiratorios pueden coexistir entre las formas libres o asociadas entre sí en una misma membrana, el flujo de esta dinámica dependerá de cambios en las necesidades metabólicas o condiciones ambientales que afecten la bioenergética celular.

1.3. Complejo V y síntesis de ATP

1.3.1. Teoría quimiosmótica.

En 1961 Peter Mitchell postuló la teoría quimiosmótica en la que se establece que la transferencia de electrones proveniente de la oxidación de sustratos y la síntesis de ATP están acoplados (Mitchell, 1961).

Esta hipótesis afirma que “el diferencial de la actividad electroquímica del hidrógeno y los iones hidroxilo a través de la membrana generada por el transporte de electrones, provoca la translocación específica de los iones hidroxilo e hidrógeno desde el centro activo del llamado sistema ATPasa, lo que deshidrata efectivamente $ADP + P$ ” (Mitchell, 1961).

Esta hipótesis fue pionera en la investigación sobre el acoplamiento del transporte de electrones durante la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP en la década de los 60's (Mitchell, 1961). Básicamente, cuando estos dos procesos se encuentran acoplados, (la transferencia de electrones y el bombeo de protones a través de la MIM) se produce una Fuerza Protón Motriz, la cual se forma por la generación de un gradiente electroquímico que consta de dos componentes; el componente eléctrico ($\Delta\psi$) causado por una diferencia de carga a través de la membrana lipídica y un gradiente químico (ΔpH) derivado de aumento en la concentración de protones en el espacio intermembranal y su concomitante disminución en la matriz mitocondrial.

La energía electroquímica creada a través de la diferencia en la concentración de protones y la separación de la carga a través de la membrana interna mitocondrial impulsa la síntesis de ATP a medida que los protones fluyen de regreso a la matriz a través del canal específico (F_0) de la ATP sintasa. El transporte activo de protones a través de la membrana es transformado en energía mecánica por la región F_1 de la enzima para promover la liberación del ATP recién sintetizado en este complejo.

1.3.2. Estructura de la ATP sintasa

Todas las ATP sintasas están construidas de una manera similar, constan de un dominio hidrofóbico membranal involucrado en la translocación de protones, conocido con el nombre de F_0 y un dominio catalítico hidrofílico denominado F_1 que se encuentra orientado hacia la matriz mitocondrial, encargado de llevar a cabo la síntesis y/o hidrólisis de ATP (Guo y Rubinstein, 2018).

Ambos sectores se encuentran conectados por un grupo de proteínas que forman una estructura denominada brazo periférico, la cual funciona como estator durante la catálisis rotacional de la enzima.

La ATP sintasa ha sido estudiada durante muchos años y dos de las mejor caracterizadas tanto en su estructura como en su función es la enzima bacteriana de *Escherichia coli* y la enzima del bovino *B. taurus* (Bason et al., 2011; Guo et al., 2019).

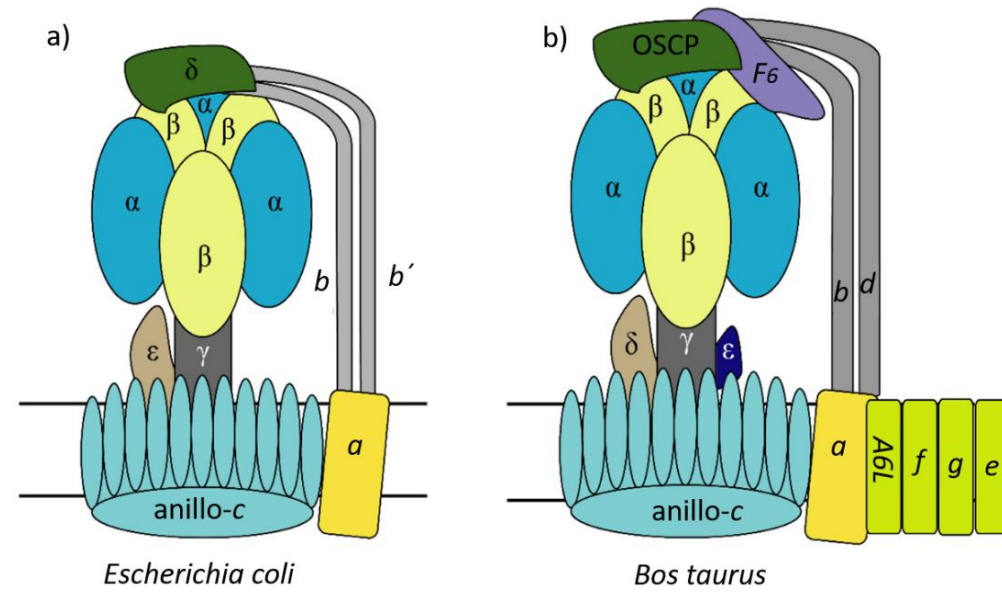


Figura 9 Estructura de la F₁F₀-ATP sintasa de bacterias y la F₁F₀-ATP sintasa de bovino

La ATP sintasa de la bacteria *E. coli* consta de las 8 subunidades mínimas necesarias para que la enzima pueda llevar a cabo su función. En mamíferos como *B. taurus* la enzima es muy similar, sin embargo, cuenta con subunidades adicionales que desempeñan diversos roles como brindarle estabilidad a la enzima o ayudar en su dimerización.

El sector F₁ también conocido como F₁-ATPasa (por su capacidad de hidrolizar ATP) consta de cinco subunidades diferentes con la siguiente estequiometría α_3 , β_3 , γ_1 , δ_1 y ϵ_1 (Figura 9) (Leslie y Walker, 2000), donde las subunidades γ , δ y ϵ en eucariontes y la subunidades γ y ϵ en bacterias forman el tallo central (o el eje del rotor) y las subunidades α_3 , β_3 forman un anillo hexamérico con una cavidad central donde se inserta la subunidad γ que une los dos sectores de la enzima (F₀ y F₁). Por otro lado, el sitio catalítico se encuentra en la interfaz de las subunidades α y β , pero solo la subunidad β participa en el síntesis y/o hidrólisis de ATP (Neupane et al., 2019).

En general la región F₁ se encuentra bastante conservada, por otro lado, la región F₀ muestra una composición que varía significativamente entre especies. En bacterias F₀ está formada por tres diferentes subunidades con la siguiente estequiometría $a/b_2/c_{9-15}$ (Guo y Rubinstein, 2018).

En cambio, en mitocondrias la región F_0 de la ATP sintasa es significativamente más complicada que la de bacteria o cloroplasto. Además del anillo de subunidades c y de la subunidad a existen subunidades adicionales que están involucradas en otros procesos como la dimerización de la enzima (e , f , g y $A6L$), la formación del brazo periférico (b , d y F_6) o péptidos que están involucrados en la regulación de la actividad de la enzima (IF1) (Kühlbrandt, 2019).

1.3.3. Mecanismo de acción de la F_1F_0 -ATP sintasa

La síntesis de ATP es la reacción química más extendida dentro del mundo biológico (Neupane et al., 2019). En 1993 Paul Boyer propuso un esquema catalítico simple comúnmente conocido como mecanismo de cambio de unión, en el cual se describen las distintas afinidades por nucleótidos que puede adoptar la subunidad β y el rol que juegan cada una de las tres conformaciones durante la síntesis de ATP (Boyer, 1993).

Como se mencionó con anterioridad el sector F_1 de la ATP sintasa está formado por un ensamble de tres subunidades α y tres subunidades β que rodean a la subunidad central γ (Abrahams et al., 1994). Debido a la disposición de la región N-terminal de la subunidad γ dentro del núcleo catalítico, se produce una asimetría que hace que los contactos con las subunidades varíen durante la rotación induciendo diferentes interacciones en cada una de ellas. Por lo tanto, producto de la rotación de γ cada una de las subunidades β pasa por los diferentes estados de unión, síntesis y liberación de nucleótidos (β_{DP} , β_{TP} y β_E respectivamente) (Boyer, 2002).

Cada uno de los sitios catalíticos pasa por las tres diferentes conformaciones durante una rotación completa de 360° (Neupane et al., 2019). La subunidad β_E tiene una afinidad por nucleótidos muy baja o nula, al pasar a la conformación β_{DP} debido a la rotación de γ 120° adquiere una mayor afinidad por sus ligandos (ADP-Mg y Pi). Posteriormente, otro cambio conformacional inducido por la rotación de γ 120° , lleva a la subunidad β de la conformación β_{DP} a la conformación β_{TP} , donde el ADP-Mg y el Pi son condensados para formar ATP. Finalmente, otra rotación de 120° de la subunidad γ lleva a la subunidad β de nuevo a la conformación β_E donde el ATP recién sintetizado es capaz de liberarse (Boyer, 1993).

Por lo tanto, los cambios conformacionales secuenciales facilitan la unión, el cambio químico y la liberación tanto de los sustratos como de los productos (Boyer, 1993, 2002).

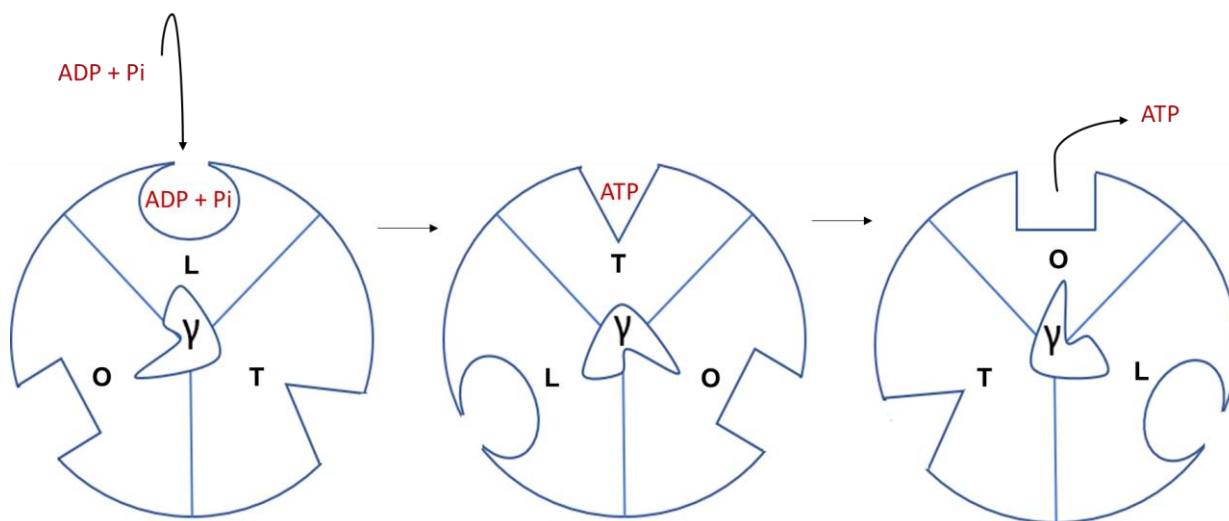


Figura 10 Catálisis rotacional y mecanismo de unión

Las subunidades β de F_1 pueden presentar tres conformaciones diferentes que posee distintas afinidades por los nucleótidos: La conformación β_E (O) tiene afinidad nula por los nucleótidos; la conformación β_{DP} (L) posee poca afinidad y los nucleótidos pueden quedar retenidos (unión y retención de ADP y Pi), la conformación β_{TP} (T) tiene alta afinidad, es en esta última conformación donde se lleva a cabo la síntesis de ATP. La rotación de la subunidad γ que gira 120° en el sentido contrario a las manecillas del reloj (mirando desde la matriz), interconvierte las tres formas de la subunidad β .

Dada la importancia de esta enzima en la producción de energía, no es de extrañar que su actividad deba estar finamente regulada para poder adaptarse a las necesidades energéticas de la célula. Existen varios mecanismos conocidos para inhibir la actividad hidrolítica de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial.

Uno de los mecanismo que se encuentra mejor conservado en todas las ATP sintasas es la inactivación por ADP-Mg, un aumento en la concentración de este sustrato inhibe de manera no competitiva a la enzima (Lapashina y Feniouk, 2018). La regulación de la ATP sintasa también puede darse a nivel de la expresión de proteínas, principalmente de aquellas subunidades que están relacionadas con la catálisis de la enzima, por ejemplo, se ha reportado que en la línea celular humana K562 de leucemia mieloide crónica, la hipermetilación del gen ATP5B que codifica para la subunidad β limita la expresión de la enzima y por lo tanto, la función de la misma se ve comprometida (Li et al., 2010).

La ATP sintasa además de llevar a cabo su función canónica, que es la de sintetizar ATP, tiene la capacidad de realizar la reacción opuesta en condiciones de estrés. Cuando el potencial de membrana se ve abatido, puede funcionar como una bomba de protones al hidrolizar ATP (Zarco-Zavala et al., 2018). Dada la necesidad de prevenir la hidrólisis excesiva de ATP en condiciones desfavorables para la mitocondria como podría ser un estado de hipoxia, existen proteínas que inhiben la hidrólisis de ATP. Dichos inhibidores naturales se encuentran presentes en las ATP sintasas de organismo tan diversos como las bacterias y los mamíferos (Guo et al., 2019; Pullman y Monroy, 1963; Zarco-Zavala et al., 2018). En algunos casos, como en las bacterias *E. coli* y *Bacillus sp.*, el inhibidor de las ATP sintasas, es una subunidad del mismo complejo multiproteico (Guo et al., 2019). En otros, como sucede en levaduras y mamíferos, la proteína inhibitoria de la hidrólisis de ATP se encuentra de manera independiente al complejo y es reclutada solamente cuando se necesita. Sin embargo, independientemente de si el péptido inhibidor es extrínseco o intrínseco a la enzima, todas esas proteínas son capaces de interactuar con el núcleo catalítico bloqueando su actividad (Neupane et al., 2019).

1.4. F₁-ATPasa mitocondrial

Como se mencionó anteriormente, todas las ATP sintasas conocidas hasta ahora se encuentran conformadas de una región hidrofóbica y una región hidrofílica. Debido a la dificultad que representa la purificación de enzimas integrales de membrana, los investigadores han recurrido a separar la enzima para su estudio individual, estrategia que ha dado buenos resultados.

Con la purificación de la F₁-ATPasa, fue posible realizar experimentos de partícula única con los que se demostró que esta enzima actúa como un nanomotor (Noji et al., 1997). Estudios bioquímicos y estructurales habían sugerido que la subunidad γ rota dentro del núcleo catalítico de la ATP sintasa (Abrahams et al., 1994; Aggeler y Capaldi, 1996; Gogol et al., 1990). Sin embargo, el estudio definitivo que permitió observar directamente el movimiento rotatorio de la enzima, fue el acoplamiento de un filamento de actina fluorescente a la subunidad γ mientras el núcleo catalítico fue fijado a una plataforma de cristal (Noji et al., 1997). Así pudo observarse directamente la rotación del filamento de actina por microscopía de fluorescencia.

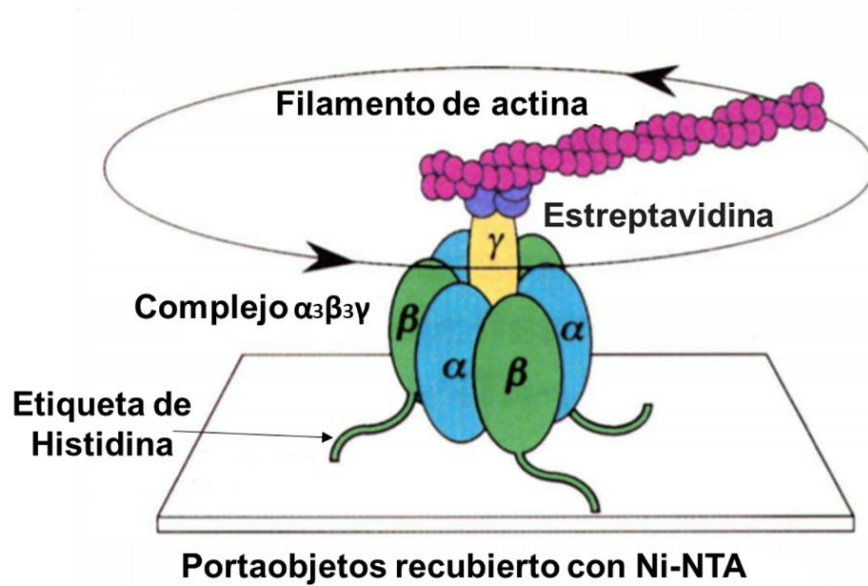


Figura 11 Experimentos que demuestran la catálisis rotacional

Sistema usado para la observación de la rotación de la subunidad γ dentro del subcomplejo ($\alpha_3\beta_3\gamma$) previamente purificado. Las subunidades β contienen una etiqueta de histidina que fija al subcomplejo a una matriz de cristal, por otro lado, la subunidad γ fue acoplada a un filamento de actina que emite fluorescencia. Imagen modificada de Noji et al., 1997.

Estos experimentos no se habrían llevado a cabo sin una buena preparación de la enzima, lo que resalta la importancia de las técnicas de clonación y purificación de proteínas para su posterior estudio y caracterización, demostrando que este enfoque bioquímico sigue siendo útil en la investigación de frontera básica y aplicada.

1.5. El alga incolora *Polytomella sp.*

El alga incolora *Polytomella sp.* es un organismo no fotosintético que pertenece al grupo de algas verdes (algas clorofíceas) y se ubica dentro del clado *Reinhardtinia* de los *Chlamydomonadales* al igual que el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Smith et al., 2010) que es uno de los principales organismos fotosintéticos que comenzó a ser caracterizado desde hace varios años (Little et al., 1951). Las *Polytomellas* son organismos flagelados heterótrofos de vida libre que habitan en charcos de agua dulce (Figura 12).

Polytomella sp. es relativamente fácil de crecer en el laboratorio, ya que puede emplear varios compuestos como fuentes de carbono, incluidos ácidos orgánicos pequeños (piruvato, acetato, succinato y butirato), alcoholes (etanol y butanol) y monosacáridos como el gliceraldehído. En nuestro laboratorio hemos empleado el acetato como fuente de carbono para cultivar el alga con excelentes resultados (Miranda-Astudillo et al., 2018; Vázquez-Acevedo et al., 2006; Villavicencio-Queijeiro et al., 2009).

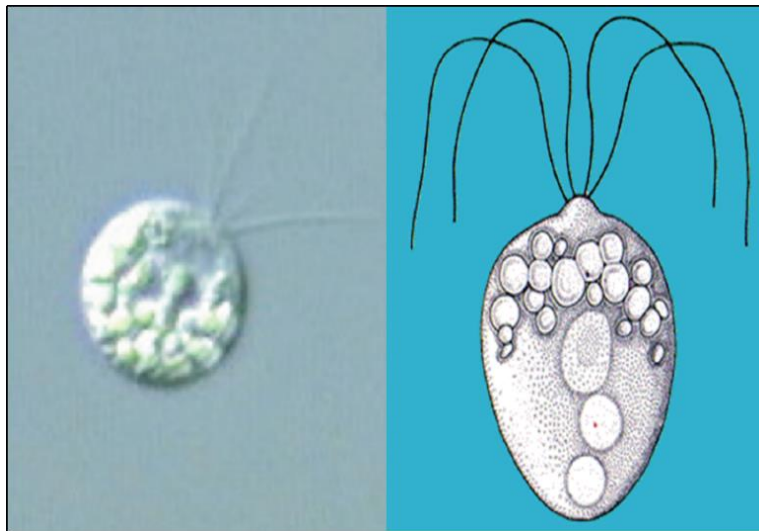


Figura 12 Fotografía tomada por microscopía óptica (izquierda) y esquema (derecha) de *Polytomella sp.*

Imágenes tomadas de: <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB4/PCD2840/htmls/90.html> y <http://polytomella.ifc.unam.mx/> respectivamente.

1.5.1. *Polytomella sp.* como modelo de estudio

Dentro del estudio de las ciencias biológicas, a lo largo de los años, se han empleado diversos organismos con el fin de responder preguntas particulares, desde el uso de microorganismos como bacterias y levaduras, hasta organismos más complejos como ratones y conejos.

El ser humano se ha encargado de caracterizar a muchos niveles a estos organismos, que se han denominado, modelos biológicos, a fin de aumentar la confiabilidad de sus resultados y poder así validar sus hipótesis.

A pesar de que existen organismos más fáciles de trabajar que otros, en cuanto a condiciones de crecimiento y costos de mantenimiento se refiere, no existe un estándar de oro que permita responder a todas las preguntas del mundo biológico empleando un único organismo como modelo de estudio, por lo cual es importante conocer las ventajas y limitaciones de éstos a la hora de plantear investigaciones.

Polytomella sp. tiene características particulares que la hacen atractiva, ya que ha demostrado ser útil para una amplia variedad de estudios relacionados con la pérdida evolutiva de la fotosíntesis, así como para el estudio de la genómica y la bioquímica mitocondrial (Figueroa-Martinez et al., 2015; Jiménez-Suárez et al., 2012; van Lis et al., 2005; Smith et al., 2010; Villavicencio-Queijeiro et al., 2009).

Por ejemplo, el hecho de que *Polytomella sp.* carezca de plástidos fotosintéticos y pared celular, permite obtener una fracción enriquecida de mitocondrias mediante métodos de rompimiento mecánico y centrifugación diferencial, como hemos podido corroborar en nuestro laboratorio (Miranda-Astudillo et al., 2014; Villavicencio-Queijeiro et al., 2009). De las mitocondrias así obtenidas se han podido purificar componentes de la CTE (Miranda-Astudillo et al., 2018), los cuales se observan estructuralmente intactos en micrografías electrónicas (Dudkina et al., 2006).

El hecho de que esta alga carezca de cloroplastos permite la purificación de proteínas de los complejos respiratorios mitocondriales sin la presencia de proteínas fotosintéticas contaminantes (van Lis et al., 2007). Incluso se ha podido purificar y caracterizar un respirosoma funcional (Miranda-Astudillo et al., 2018).

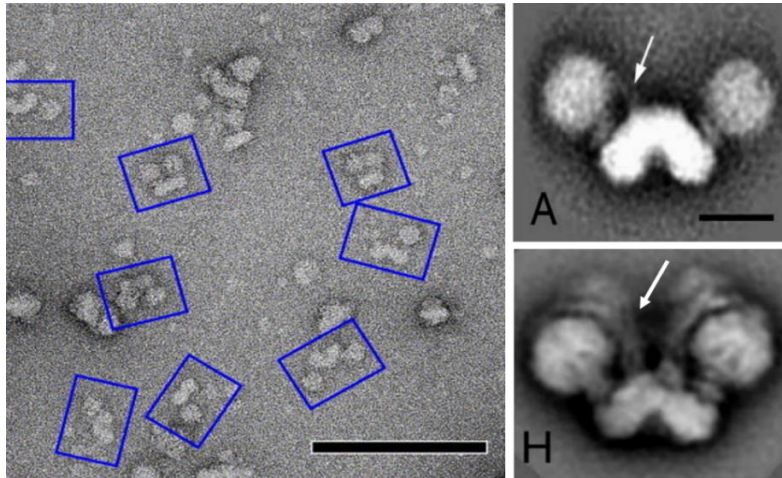


Figura 13 Microscopía electrónica del complejo V mitocondrial de *Polytomella sp.* y *S. cerevisiae* aislado por centrifugación en gradiente de sacarosa.

Los recuadros azules indican la presencia de dímeros de ATP sintasa. A) Complejo ATP sintasa dimérico purificado de *S. cerevisiae* obtenida por promedio de imágenes de partícula única. H) Dímero completo de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* Las flechas blancas se encuentran señalando al estator de la enzima, claramente se aprecia que la electrodensidad de esta estructura es mucho mayor para la enzima del alga. Modificado de Dudkina et al. 2006

1.5.2. Estructura de la ATP sintasa del alga incolora *Polytomella sp.*

La ATP sintasa del alga incolora *Polytomella sp.* es una enzima muy particular, ya que a pesar de que este complejo multiproteico está altamente conservado la enzima cuenta con estructuras divergentes, como la presencia de subunidades atípicas que forman parte del brazo periférico las cuales no comparten homología con las proteínas que forman la misma estructura en la enzima de otras especies (Lapaille et al., 2010).

En una de las primeras caracterizaciones bioquímicas de las subunidades que forman esta enzima se encontró que las subunidades α y β de la ATP sintasa de las algas *C. reinhardtii* y *Polytomella sp.* tienen una masa molecular ligeramente mayor (α 60.6 kDa y β 63 kDa) a la reportada para otras especies como bovino (α 59 kDa y β 56 kDa) (Atteia et al., 1997). Un análisis de alineamiento de secuencia reveló que este aumento en el peso molecular de la subunidad α y β se debe a la presencia de una extensión en la región N-terminal y C-terminal (respectivamente) de más o menos 15 residuos de aminoácidos para α y 60 residuos de aminoácidos para β lo que hace a esta subunidad 7-8 kDa más grande.

Además interesantemente estas extensiones en las subunidades α y β únicamente se encuentran presentes en el linaje de las algas clorofíceas (Atteia et al., 1997).

En un principio, la extensión de la región C-terminal de la subunidad β parecía un buen candidato para ser el inhibidor natural de la enzima ya que esta región mostraba cierta homología con la subunidad ϵ de la ATP sintasa de *E. coli*, la cual puede adoptar una conformación inhibitoria dentro del núcleo catalítico de la enzima bloqueando la rotación impidiendo la catálisis (Sielaff et al., 2018). Sin embargo, estudios posteriores de criomicroscopía electrónica (Cryo-EM) llevaron a proponer un modelo tridimensional donde la ubicación de estas extensiones se encuentra alrededor de la subunidad α adyacente (Murphy et al., 2019), lo que llevo a los autores a plantear la posibilidad de que las extensión en las regiones N-terminal y C-terminal de las subunidades α y β aumentan la estabilidad de la ATP sintasa mitocondrial de las algas clorofíceas, lo cual sería una ventaja bajo condiciones de estrés, como cuando *Polytomella sp.* se convierte en un quiste inactivo al encontrarse en ambientes pobres en nutrientes.

Debido a la que las ATP sintasas bacteriana y de cloroplasto se encuentran como monómeros funcionales en las membranas plasmáticas y de los tilacoides respectivamente, por muchos años se pensó que la unidad funcional de la enzima mitocondrial también era un monómero, ya que este complejo podía ser aislado de manera funcional principalmente de la enzima de bovino (Kühlbrandt, 2019). No obstante, en los años siguientes comenzó a aumentar la evidencia de que la ATP sintasa se encontraba en forma de dímeros en la membrana mitocondrial de varios organismos incluida la ATP sintasa de *Polytomella sp.*, (Dudkina et al., 2006).

Estudios de microscopía electrónica de tinción negativa confirmaron la presencia de una estructura dimérica de la enzima de *Polytomella sp.*, la cual cuenta con la presencia de dos brazos periféricos altamente robustos que no se encuentran presentes en los dímeros de ATP sintasa de otras especies (Figura 13) (Dudkina et al., 2006).

Por otro lado, análisis bioquímicos demostraron que la ATP sintasa de *Polytomella sp.* puede ser aislada como un dímero de 1600 kDa (Vázquez-Acevedo et al., 2006). Este complejo multiproteico está compuesto por 8 subunidades altamente conservadas (α , β , γ , δ , ϵ , *OSCP*, *a* y *c*) y 10 subunidades denominadas Asa1-10 (por sus siglas en inglés “Protein Associated with ATP synthase”) exclusivas de las algas clorofíceas, responsables de formar la estructura del brazo periférico las cuales difieren fuertemente de las proteínas que forman la misma estructura en la mayoría de los eucariontes (Murphy et al., 2019; Vázquez-Acevedo et al., 2006; Villavicencio-Queijeiro et al., 2009).

Estudios bioquímicos realizados con el fin de esclarecer el rol funcional del dímero frente al monómero de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* revelaron que la forma dimérica de la enzima es inusualmente estable ((Dudkina et al., 2006; Villavicencio-Queijeiro et al., 2009). La mayoría de las ATP sintasas pueden ser aisladas en dos formas diferentes: como un complejo monomérico de alrededor de 500 kDa y como un complejo dimérico de alrededor de 1000 kDa (Guo et al., 2019). Esto depende principalmente del tipo de detergente que se utilice durante la solubilización. Detergentes no iónicos como el Triton x-100, la digitonina o el dodecil maltósido preservan las interacciones que permiten mantener un dímero intacto.

En contraste, la ATP sintasa de *Polytomella sp.* se aprecia exclusivamente como un dímero en geles azules nativos independientemente del tipo de detergente no-iónico empleado para la solubilización (Dudkina et al., 2006).

Además de ser un complejo muy estable, la ATP sintasa dimérica de *Polytomella sp.*, ha demostrado ser una enzima altamente resistente. Ensayos de disociación de la enzima con el detergente taurodesoxicolato (TDOC), demostraron que una concentración de 3 % favorece la separación del dímero, logrando obtener una fracción enriquecida con el monómero de la enzima. Con este tratamiento se logró hacer un estudio comparativo de las dos especies de la ATP sintasa (Villavicencio-Queijeiro et al., 2009).

Ensayos de incubación con calor demostraron que la forma dimérica de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* resiste la disociación con calor al ser incubada a altas temperaturas, por otro lado el monómero de la enzima es mucho más lábil, dando como resultado el desensamblaje de la enzima a los pocos minutos de la incubación con calor (Villavicencio-Queijeiro et al., 2009).

De manera similar el dímero fue más estable que el monómero al resistir la incubación con quimiotripsina en una relación 1:100 *w/w* (proteasa/enzima) y al ser sometida a una alta presión hidrostática (Villavicencio-Queijeiro et al., 2009). Con estos ensayos se llegó a la conclusión de que la forma funcional de la enzima dentro de la mitocondria del alga *Polytomella sp.* es la forma dimérica. Trabajos posteriores demostraron que efectivamente la mayor parte de las ATP sintasas mitocondriales se encuentra en forma de dímero. El cual además, contribuye con la formación de las crestas de la MIM (Kühlbrandt, 2019).

Como se mencionó con anterioridad, estudios de microscopia electrónica revelaron la presencia de un brazo periférico altamente robusto en la enzima del alga y aunque se sabía por estudios bioquímicos quienes eran los péptidos responsables de la formación de esta compleja estructura, la disposición topológica de estas proteínas no se conocía, debido a que no existen proteínas homólogas que permitieran hacer una predicción de su arquitectura dentro de la enzima de *Polytomella sp.*

Para tratar de dar respuesta a esta interrogante, las subunidades Asa de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* se estudiaron utilizando una amplia variedad de enfoques bioquímicos para conocer las interacciones entre estas. Análisis de interacción proteína-proteína empleando proteínas recombinantes “*in vitro*” mediante la técnica de Far western blot (Sánchez-Vásquez et al., 2017), disociación de subcomplejos mediante tratamientos con detergente y calor (Vázquez-Acevedo et al., 2006; Villavicencio-Queijeiro et al., 2009), ensayos de interacción proteína-proteína mediante cromatografía de afinidad (Miranda-Astudillo et al., 2014) y ensayos de interacción de proteínas mediante el sistema de doble híbrido en levadura (Sánchez-Vásquez et al., 2017), llevaron a la predicción y posterior refinamiento de un modelo que explicaba la disposición topológica de los polipéptidos que forman el brazo periférico en la enzima del alga (Colina-Tenorio et al., 2018).

Finalmente en 2019 se logró resolver la estructura completa de la enzima de *Polytomella sp.* mediante Crio-EM a alta resolución (3.2 Å) donde se describe la distribución topológica de todas las subunidades de la ATP sintasa (Figura 14).

Este novedoso trabajo permitió dilucidar el mecanismo de transporte de protones a través de la subunidad *a* (que se encuentra formando dos semicanales) y el anillo de subunidades *c* pertenecientes al sector F₀, además identificó a las subunidades responsables de la dimerización de la enzima (describiendo la presencia de la subunidad Asa10 que había pasado desapercibida en otros estudios bioquímicos) (Murphy et al., 2019)

En la primera caracterización cinética de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* se encontró que la actividad en el sentido de la hidrólisis de la enzima aislada es muy baja (0.03 U/mg), comparada con la actividad hidrolítica de la ATP sintasa en otras especies como *B. taurus* (3.8-8.5 U/mg) o *E. coli* (9.8-12.9 U/mg). Sin embargo, dicha actividad puede aumentar (7-9 U/mg) al someter a la enzima a tratamientos con algunos detergentes no iónicos o al incubar a la enzima con altas temperaturas (Villavicencio-Queijeiro et al., 2015).

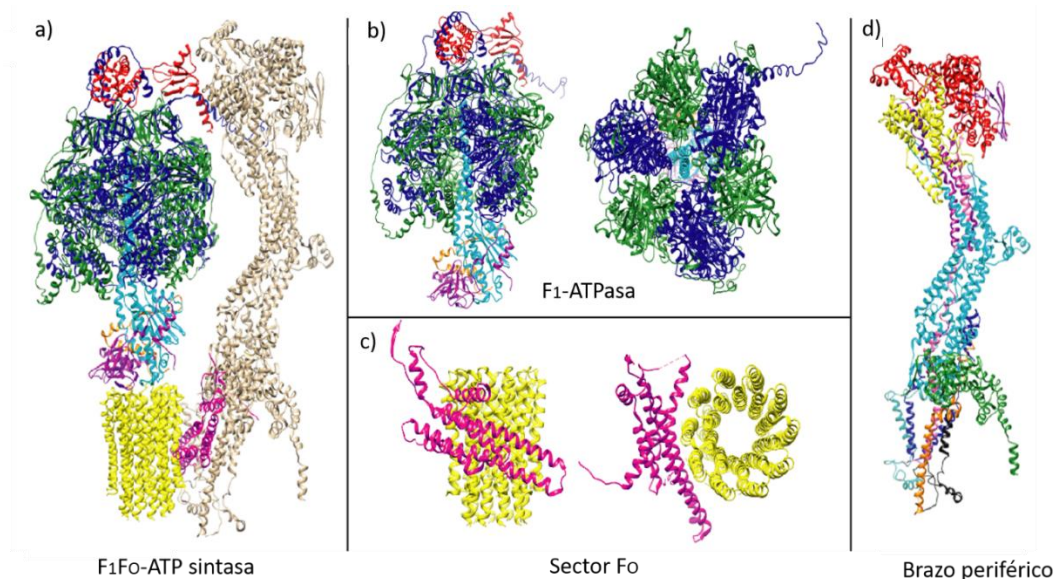


Figura 14 Modelo estructural de la ATP sintasa de *Polytomella sp.*, (acceso PDB: 6RE0)

(a) Monómero de la F₁F₀-ATP sintasa completa. Las subunidades que forman parte del brazo periférico se encuentran en color dorado, el anillo de subunidades *c* se encuentra en amarillo, la subunidad *a* que forma los semicanales de protones está en color magenta, la subunidad OSCP esta remarcada en rojo y las subunidades que se encuentran formando parte del sector catalítico F₁ se encuentran con los siguientes colores α (azul), β (verde), γ (cian) δ (morado) y ϵ (naranja). (b) Sector catalítico de la enzima donde se muestran las subunidades con el mismo código de colores que en la figura a. (c) sector F₀ de la enzima donde se muestra el anillo de subunidades *c* en amarillo y la subunidad *a* en magenta. (d) subunidades Asa que forman el brazo periférico de la enzima con el siguiente código de color: Asa1 (cian), Asa2 (rojo), Asa3 (verde claro), Asa4 (amarillo), Asa 5 (rosa), Asa6 (azul), Asa7 (morada), Asa8 (naranja), Asa9 (verde agua), Asa10 (negro).

Esta transición de un estado donde la enzima se encuentra inactiva a uno en el cual es capaz de hidrolizar ATP sugiere que puede estar siendo regulada tal y como ocurre en la ATP sintasa de otras especies (Neupane et al., 2019). Uno de los mecanismos de control que comparten todas las ATP sintasas es la inhibición por sustrato, en el caso de algunas bacterias como *Caldalkalibacillus thermarum* que presentan una actividad hidrolítica muy baja se ha atribuido a este mecanismo como el responsable de bloquear la rotación de la enzima impidiendo la hidrólisis de ATP (Lapashina and Feniouk, 2018). A pesar de que la inhibición por ADP ha sido reportada en todas las ATP sintasas este mecanismo de control no es el único con el que la enzima cuenta (Zarco-Zavala et al., 2018).

El aumento en la actividad hidrolítica de la ATP sintasa puede ser el resultado de una transición paulatina de un estado inactivo a una forma activa debido a cambios conformacionales tal y como ocurre en la ATP sintasa de *E. coli* donde la subunidad ϵ puede sufrir una transición de un estado contraído donde la enzima puede hidrolizar ATP a un estado extendido donde la región C-terminal de la enzima se inserta en el núcleo catalítico bloqueando la rotación (Guo et al., 2019).

Al medir la actividad hidrolítica de la ATP sintasa de *Polytomella sp.*, se observa un comportamiento cinético histerético (una fase inicial de hidrólisis de ATP lenta, seguida de una segunda fase lineal más rápida). El tiempo transcurrido (tiempo de retraso) entre la adición de la enzima y el inicio de la hidrólisis lineal de ATP disminuye a medida que la temperatura en el medio de ensayo se incrementa (Villavicencio-Queijeiro et al., 2015). En la ATP sintasa de bovino este tipo de comportamiento ha sido atribuido a la presencia de un péptido inhibidor que se encuentra asociado a la enzima bloqueando la rotación y que al ser liberado permite la activación gradual de la actividad hidrolítica de la ATP sintasa (Pullman y Monroy, 1963).

El comportamiento histerético que se ha reportado en enzimas que no pertenecen a la familia de las ATP sintasas se ha explicado por cambios conformacionales inducidos por ligando o por dinámicas de polimerización y despolimerización de subunidades catalíticas (Villavicencio-Queijeiro et al., 2015). Sin embargo, dado que la ATP sintasa de *Polytomella sp.* es muy estable, este último mecanismo podría ser poco probable.

A pesar de que ahora se conoce muchos aspectos relacionados con la función y la estructura completa de la enzima, hasta ahora no se ha encontrado la presencia de una proteína inhibitoria de la ATP sintasa en *Polytomella sp.*, lo que sugiere que en el caso de existir un péptido inhibitor, éste debe residir en alguna de las subunidades que conforman a la enzima, tal y como sucede en el caso bacterias, donde la subunidad ϵ (homóloga a la subunidad δ en ATP sintasa mitocondrial) es la responsable de regular la actividad hidrolítica de la enzima, a través de cambios conformacionales que responden a las necesidades energéticas de la bacteria (Sielaff et al., 2018).

2. Justificación

Durante décadas, la purificación de enzimas ha sido de vital importancia en la bioquímica, ya que nos permite realizar una caracterización de su función, conocer más a fondo su estructura y dilucidar las interacciones de interés de la proteína ya sea consigo misma o con otras biomoléculas como sustratos y ligandos. Debido al problema que supone el estudio de proteínas de membrana las cuales tienden a agregarse en medio acuoso, muchos investigadores se han centrado en estudiar la parte soluble de las biomoléculas. A pesar de que nuestro laboratorio desarrolló el primer protocolo para purificar la enzima F_1F_0 -ATP sintasa del alga *Polytomella sp* completa, existen aspectos relacionados con el control de su actividad catalítica que siguen sin ser dilucidados. Por lo tanto, contar con una preparación aislada del sector catalítico F_1 podría ayudar a estudiar aspectos relacionados con el funcionamiento de la enzima. Montar un protocolo que nos permita extraer un sector F_1 -ATPasa de manera rápida y eficiente y con un alto rendimiento, será clave para poder identificar en un futuro, el posible inhibidor de su actividad hidrolítica.

3. Hipótesis

La subunidad δ (homóloga a la subunidad ϵ de bacterias) de la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.* tiene un papel regulatorio sobre la actividad hidrolítica de la enzima.

Sí la regulación de la F_1F_0 -ATP sintasa reside en la subunidad δ , la baja actividad hidrolítica de la enzima debería mantenerse al tener al sector F_1 puro y se esperaría que eliminar o modificar esta subunidad dispararía la actividad hidrolítica de la enzima.

4. Objetivos Generales

- Caracterizar a la subunidad δ para evaluar su papel como un posible inhibidor de la actividad hidrolítica de la enzima.
- Montar un protocolo que permita un rápido y eficiente aislamiento del sector F_1 de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial del alga incolora *Polytomella sp.*
- Comparar la eficiencia de dos estrategias de purificación del sector F_1 : 1) partiendo de una preparación de F_1F_0 -ATP sintasa previamente aislada y 2) partiendo directamente de partículas Submitocondriales (SMP) del alga incolora *Polytomella sp.*

5. Objetivos Particulares

- Identificar el % de identidad y la similitud estructural de la subunidad δ con respecto a proteínas inhibitorias de otras enzimas y la misma subunidad en otras especies.
- Obtener una preparación homogénea de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp.* con la que puedan realizarse ensayos de disociación con detergentes y calor para liberar el sector F_1 .
- Estandarizar un protocolo de obtención de SMP a partir de mitocondrias de *Polytomella sp.* para ensayos de disociación mediante tratamiento con cloroformo.
- Caracterizar los sectores F_1 obtenidos a partir de la ATP sintasa pura y de SMP mediante electroforesis 2D.
- Comparar la actividad cinética de los sectores F_1 obtenidos con las dos estrategias anteriores y contrastar esta actividad contra la del sector F_1 liberada directamente de la F_1F_0 -ATP sintasa por tratamiento a alta temperatura.

6. Diseño experimental

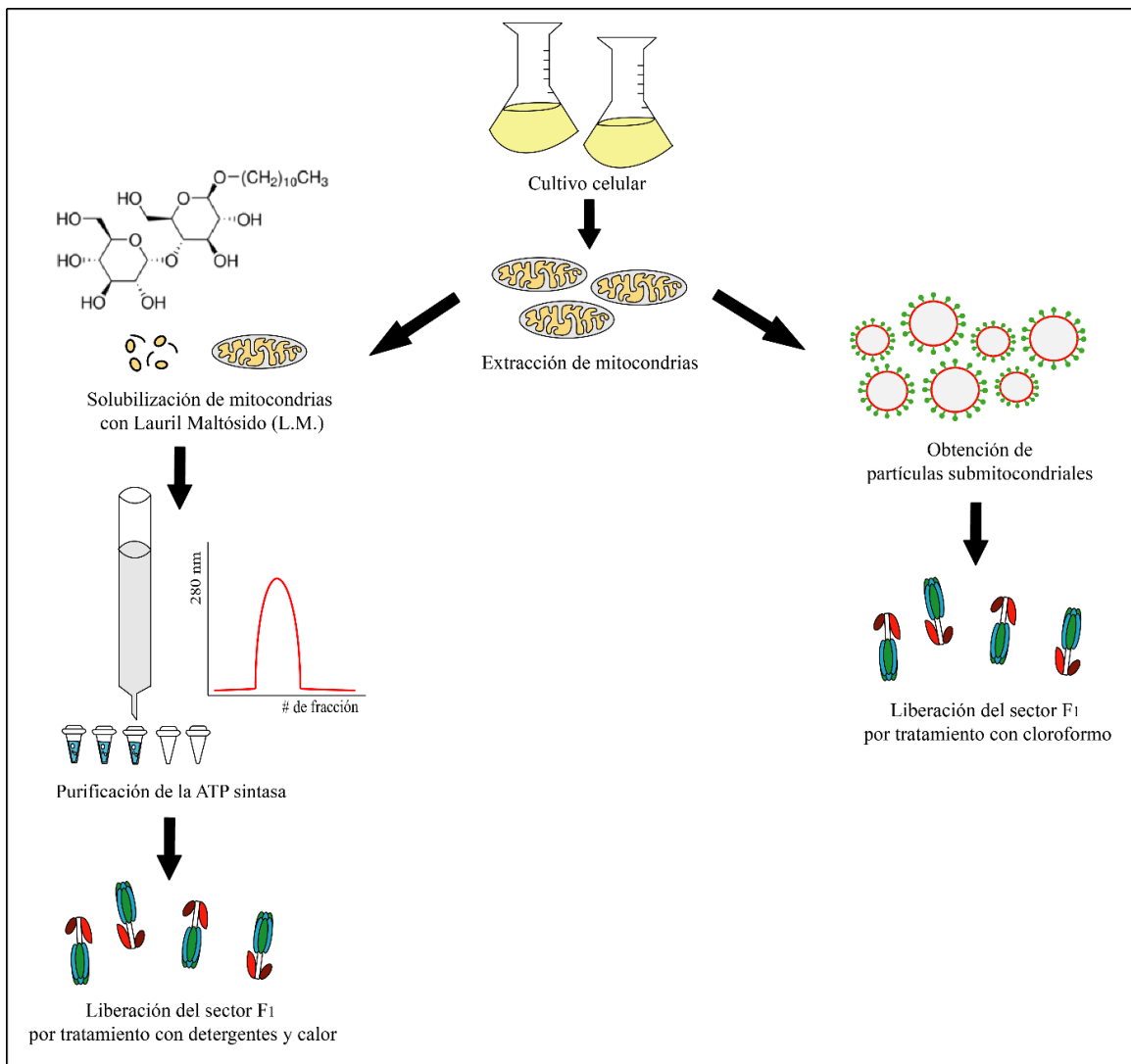


Figura 15 Estrategias para liberar el sector F1 de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp.*

Se diseñaron dos protocolos alternativos para tratar de obtener el sector catalítico soluble de la enzima, uno de ellos es partiendo de la enzima previamente purificada y la otra es a través de la liberación con cloroformo a partir de SMP. El sector F₁ de la enzima se muestra en color verde y cian (subunidades α y β), la subunidad γ se muestra en color gris claro, la subunidad δ se muestra en color naranja y la subunidad ϵ se representa en color marrón.

7. Metodología

7.1. Cultivo de *Polytomella sp.*

Se utilizó la cepa de *Polytomella sp.*, (198.80) de la colección de algas de la Universidad de Göttingen, Alemania, aislada originalmente por E. G. Pringsheim. El alga incolora se cultivó aeróbicamente sin agitación en matraces de fondo ancho de 2.5 L de capacidad, que contenían 2 L de medio de cultivo (0,4 % de acetato de sodio, 0.2 % de bacto triptona y 0.2 % de extracto de levadura) suplementado con vitaminas (0.01 mg/mL de vitamina *B1* y 0.05 µg/mL de vitamina *B12*) (Vázquez-Acevedo et al., 2006).

7.2. Extracción de las células del alga *Polytomella sp.*

Las células se incubaron sin agitación en condiciones aerobias y se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento (aproximadamente 48 horas después de la inoculación en el medio de cultivo) por centrifugación a $5000 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente. La pastilla resultante fue resuspendida en amortiguador de lavado (0.3 M de sacarosa, 4 mM EDTA-K y 20 mM de Tris-HCl 20 mM, pH 7.4) y fue nuevamente centrifugada a $5000 \times g$ por 10 minutos a temperatura ambiente. La pastilla fue resuspendida en un volumen mínimo del mismo amortiguador. El sedimento celular fue colectado y almacenado a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso (Miranda-Astudillo et al., 2018).

7.3. Obtención de Mitocondrias

Las células de *Polytomella sp.* previamente almacenadas a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ fueron descongeladas y resuspendidas en un volumen mínimo de amortiguador SET (0.3 M de sacarosa, 4 mM de EDTA-K y 20 mM de Tris, pH 7.2) frío. Las células se lisaron mecánicamente con un homogenizador de vidrio con vástago de teflón aplicando de 10 a 15 golpes suaves como se describe en Villavicencio-Queijeiro et al., 2009. El lisado celular se centrifugó a $1000 \times g$ durante 10 minutos para sedimentar las células que quedaron sin romper, el sobrenadante fue recuperado y nuevamente centrifugado a $17000 \times g$ por 10 minutos para sedimentar las mitocondrias y eliminar contaminantes citosólicos solubles.

La pastilla resultante (fracción enriquecida en mitocondrias) fue resuspendida en un volumen mínimo de amortiguador SET suplementado con inhibidores de proteasas (1 mM de PMSF y 50 µg/mL de TLCK), la concentración de proteína se estimó mediante una modificación al método de Lowry (Markwell et al., 1978) y el sedimento fue almacenado a -80 °C hasta su uso.

7.4. Purificación de F₁F₀-ATP sintasa

Las mitocondrias fueron diluidas hasta una concentración final de 10 mg de proteína/mL en amortiguador de solubilización (50 mM de Tris, 1 mM de MgSO₄, 100 mM de NaCl, 1 mM de PMSF y 50 µg/mL de TLCK, pH 8.0), el cual contenía el detergente N-dodecil-β-maltósido (Lauril Maltósido) a una concentración final de 2 mg de detergente por mg de proteína (w/w).

La mezcla se incubó con agitación suave durante 30 minutos y fue centrifugada a $90000 \times g$ por 35 minutos. El sobrenadante fue recuperado y dializado por 2 horas contra 2 L de amortiguador de diálisis (50 mM de Tris y 1 mM de MgSO₄, pH 8.0). La muestra dializada fue cargada en una columna de intercambio aniónico DEAE-Biogel A (70 ml) previamente tratada con el siguiente amortiguador (50 mM de Tris, 1 mM de MgSO₄, 0.1 mg/mL de N-dodecil-β-maltósido, pH 8.0). La matriz fue lavada con 3 volúmenes de columna, y para recuperar la ATP sintasa se aplicó un gradiente lineal de NaCl (0-125 mM) utilizando el mismo amortiguador. Las fracciones enriquecidas en la enzima fueron colectadas y concentradas por filtración en tubos Amicon con membrana YM (100).

La muestra concentrada se cargó cuidadosamente en tubos conteniendo un gradiente de glicerol del 15 al 50% preparado en amortiguador de Lutter (20 mM de Tris, 2 mM de ATP, 0.1 mg/mL de N-dodecil-β-maltósido y 1 mM de EDTA-Na, pH 7.5) (Vázquez-Acevedo et al., 2006). Los gradientes fueron centrifugados a $40000 \times g$ por 17 horas en un rotor de columpio. La ATP sintasa fue recuperada en las fracciones que migran alrededor de 20-30 % de glicerol y concentradas por filtración. La concentración de proteína se estimó mediante el método de Lowry modificado (Markwell et al., 1978), y la enzima purificada fue almacenada a -80 °C hasta su uso.

7.5. Liberación de F₁ mediante tratamiento con detergente y calor

La enzima F₁F₀-ATP sintasa previamente purificada fue tratada con taurodesoxicolato de sodio (TDOC) al 3 % disuelto en amortiguador de Lutter durante 30 minutos, a 4 °C para promover la monomerización de la enzima, tal y como se describió anteriormente en Villavicencio-Queijeiro et al., 2009; posteriormente, la enzima fue incubada a 37 °C durante 15 minutos con el fin de promover la liberación del sector F₁.

7.6. Obtención de partículas submitocondriales

Se generaron SMP a partir de mitocondrias aisladas de *Polytomella sp.* haciendo algunas modificaciones a los protocolos desarrollados para mitocondrias de corazón de bovino (Beechey et al., 1975; Walker et al., 1985). Las mitocondrias del alga fueron llevadas a una concentración final de 10 mg de proteína/mL en amortiguador SET (0.25 M de sacarosa, 1 mM de EDTA-K y 10 mM de Tris, pH 7.6) frío. La suspensión fue sonicada 6 veces durante 15 segundos con intervalos de 1 minuto con una amplitud de 30 amperes en un sonicador Sonifer Ultrasonic Cell Disruptor Branson SFX250. La muestra sonicada fue centrifugada a 25000 x g por 25 minutos a 4 °C para remover las mitocondrias intactas y el sobrenadante resultante fue recuperado y centrifugado nuevamente a 140000 x g por 45 minutos a 4 °C para sedimentar las SMP. La pastilla fue resuspendida en un volumen mínimo de amortiguador STE frío suplementado con inhibidor de proteasas (1 mM de PMSF y 50 µg/mL de TLCK). Se cuantificó la concentración de proteína y la suspensión fue almacenada a -80 °C hasta su uso.

7.7. Liberación de F₁ mediante tratamiento con cloroformo

Las SMP se llevaron a una concentración de 5-10 mg/mL de proteína y se alicuotaron en volúmenes pequeños (1 mL) en tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL de capacidad. Se adicionaron (0.5 volúmenes) de cloroformo a la muestra de SMP y se mezcló vigorosamente durante 10 a 30 segundos a temperatura ambiente.

La emulsión transiente previamente formada se rompió por centrifugación a baja velocidad en una centrifuga de mesa ($1000 \times g$ por 10 minutos). Se recuperó la fase acuosa cuidando no contaminar con material insoluble y se volvió a centrifugar a $140,000 \times g$ por 45 minutos a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante fue cuidadosamente recuperado y almacenado para su posterior uso (en este último sobrenadante se encuentran las proteínas solubles mayoritariamente el sector F_1 -ATPasa).

7.8. Electroforesis azul nativa (BN-PAGE) y en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Todas las muestras recuperadas en los diferentes protocolos empleados para la liberación y purificación de F_1 fueron analizadas por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Schägger y von Jagow, 1991) y nativas (BN-PAGE) (Schägger et al., 1994), en geles de poliacrilamida preparados al 14 % y en gradiente del 4 al 12 % respectivamente. En ambos casos las proteínas fueron detectadas por tinción con el colorante azul de Coomassie para evidenciar la presencia de la enzima y las subunidades que la conforman.

7.9. Ensayo de hidrólisis de ATP por espectrofotometría

La actividad hidrolítica de la ATP sintasa se evaluó espectrofotométricamente a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm mediante el sistema de regeneración de ATP descrito por Pullman (Pullman et al., 1960) con algunas modificaciones (Villavicencio-Queijeiro et al., 2015). El sistema de regeneración de ATP contiene: amortiguador de actividad (50 mM de Tris-HCl, 5 mM de MgCl_2 y 0.01 % de Lauril Maltósido), 200 U/mL de piruvato cinasa (PK), 300 U/mL de lactato deshidrogenasa (LDH), 2 mM de fosfoenol piruvato (PEP), 200 μM de NADH y 5 mM de ATP. La reacción se inició al agregar 2 μg de la muestra. El ATP hidrolizado da lugar a la formación de ADP y fosfato, el ADP generado es utilizado junto al PEP como sustrato por la PK, dando como productos ATP y piruvato (de esta manera se mantienen concentraciones constantes de ATP y las concentraciones de ADP se mantiene bajas, ya que este último es inhibidor de la hidrólisis).

El piruvato es utilizado por la LDH y es transformado a lactato a costa de utilizar el poder reductor que proporciona la oxidación de NADH a NAD⁺ en una reacción que es directamente proporcional al ATP que ha sido hidrolizado por la enzima (Figura 17). De esta manera, al evaluar la pérdida de absorbancia a 340 nm debido a la oxidación de NADH, es posible cuantificar la cantidad de ATP que la enzima ha hidrolizado.

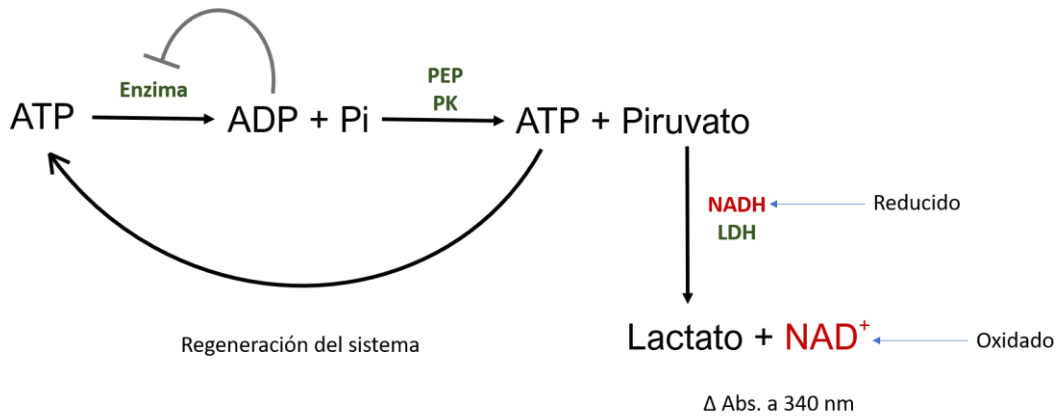


Figura 16 Sistema de regeneración de ATP empleado para evaluar la actividad hidrolítica de la enzima

8. Resultados

8.1. Análisis estructural de los modelos de F₁-ATPasas de diferentes especies unidos a sus inhibidores

Una de las estrategias empleadas en este trabajo para poder identificar al inhibidor natural de la ATP sintasa, fue realizar análisis de estructuras y alineamiento de secuencias de residuos de aminoácidos a través de softwares como Pymol, Chimera y ClustalΩ.

La ATP sintasa del alga incolora *Polytomella sp.* es una enzima que tiene muchas características particulares, por ejemplo, la presencia de subunidades específicas exclusivas de las algas clorofíceas y también el hecho de que esta enzima presenta una baja actividad hidrolítica en ensayos *in vitro* la cual aumenta fuertemente al incubar a la enzima a altas temperaturas por periodos cortos de tiempo o en presencia de algunos detergentes no iónicos (Villavicencio-Queijeiro et al., 2009). Esta última característica, ha llevado a sugerir que la ATP sintasa de *Polytomella sp.* cuenta con un inhibidor natural que regula la actividad de ATPasa tal y como ocurre en la enzima de otras especies (Morales-Ríos et al., 2010; Pullman and Monroy, 1963; Sielaff et al., 2018). Sin embargo, hasta ahora no se ha identificado algún péptido inhibidor en esta enzima.

En el caso de bacterias como *E. coli* y *Bacillus sp.*, se ha propuesto a la subunidad ε como la responsable de llevar a cabo la inhibición de la hidrólisis dentro del sector F₁ (Sielaff et al., 2018). Al analizar los modelos tridimensionales generados para estas enzimas, se hace evidente que el plegamiento que siguen estas subunidades para lograr la inhibición no es el mismo (Guo et al., 2019). Sin embargo, en ambos casos es la región C-terminal la que se encarga de llevar a cabo esta función, no obstante, como se puede apreciar en la Figura 17, en la ATP sintasa de *E. coli* la subunidad ε se pliega en una estructura de α-hélice, seguida de una región intrínsecamente desordenada que forma un pequeño pliegue, seguida de otra α-hélice la cual interacciona con la interfaz α/β/γ bloqueando la rotación de enzima y por lo tanto impidiendo la hidrólisis de ATP (Sielaff et al., 2018).

Por otro lado, la subunidad ϵ de *Bacillus sp.* sufre un plegamiento de la subunidad ϵ formando una única estructura alargada de α -hélice, la cual se inserta en la misma zona que la de *E. coli* bloqueando la hidrólisis de manera similar (Guo et al., 2019).

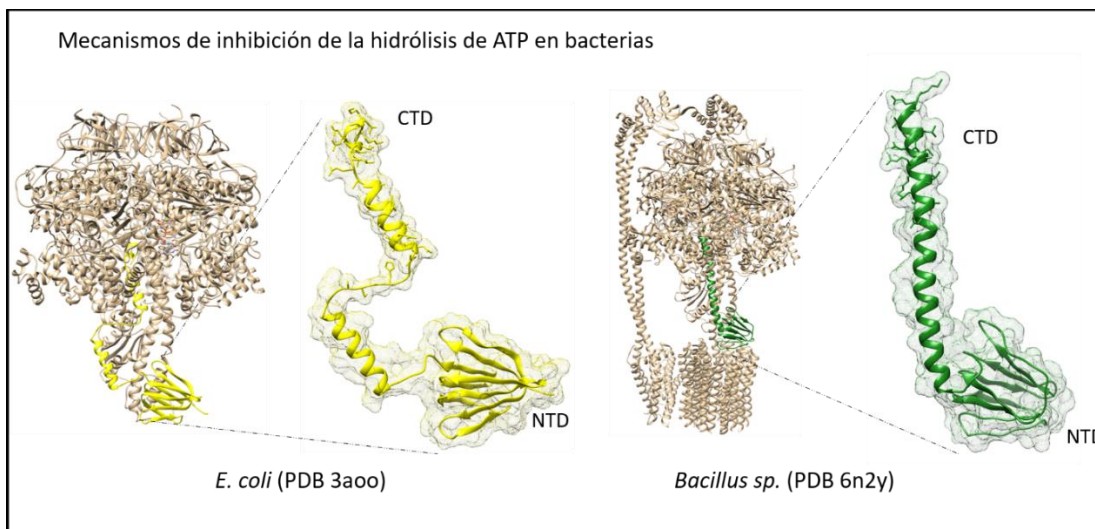


Figura 17 . Proteínas inhibitorias de la hidrólisis de ATP en bacterias

La subunidad ϵ de la F_1 -ATPasa de *E. coli* (PDB: 3oaa) se encuentra marcada en amarillo mientras que la subunidad ϵ de la F_1 -ATP sintasa de *Bacillus sp.* (PDB: 6n2y) se encuentra resaltada en verde.

Por lo tanto, a pesar de que en ambas bacterias la subunidad ϵ es la responsable de llevar a cabo la inhibición de la enzima, el plegamiento que adopta y los estímulos que promueve sus cambios conformacionales son diferentes para cada subunidad (Guo y Rubinstein, 2018).

8.2. Inhibidores de la hidrólisis de ATP en *B. taurus* y en el α -proteobacteria *P. denitrificans*.

Además de observar estructuras donde el inhibidor se encuentra dentro del mismo sector F_1 (como en el caso de la subunidad ϵ de algunas bacterias donde la región inhibitoria se encuentra en el dominio C-terminal), se analizaron las enzimas en la que el inhibidor corresponde a una proteína que no forma parte del sector F_1 -ATP sintasa, como es el caso del mamífero *B. taurus* y de la α -proteobacteria *P. denitrificans*, los cuales cuentan con la proteína inhibitoria IF1 y la subunidad ζ respectivamente (Figura 18).

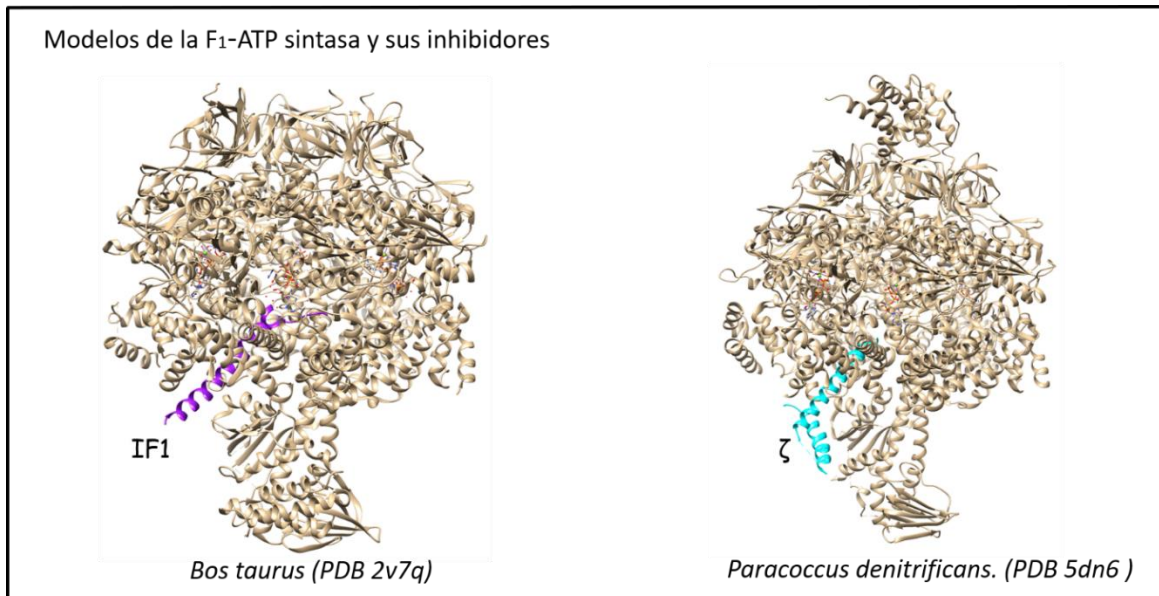


Figura 18 Proteínas inhibitorias de la hidrólisis de ATP, que no pertenecen al complejo enzimático

Modelo de la F₁ ATP sintasa de *Bos taurus* en complejo con su inhibidor IF1 (PDB: 2v7q) resaltado en color magenta. Modelo de la F₁-ATP sintasa de la α -proteobacteria *P. denitrificans* en complejo con su proteína inhibitoria ζ (PDB: 5dn6) resaltado en color cian.

A diferencia de los inhibidores que pertenecen al mismo sector F₁, los inhibidores extrínsecos a este sector (IF1 y la subunidad ζ) contienen su región inhibitoria en el dominio N-terminal. A pesar de esto, la interfaz $\alpha/\beta/\gamma$ a la cual se unen es la misma, demostrando que esta región es altamente conservada.

8.3. Alineamiento de secuencia de los péptidos inhibitorios de la hidrólisis de ATP

Para identificar qué grado de identidad compartían estas proteínas se realizó un alineamiento de secuencia de las subunidad ϵ de las bacterias *E. coli* y *Bacillus sp.* (Figura 19 panel a). Este análisis reveló una alta similitud entre los residuos de aminoácidos, incluyendo la región C-terminal responsable de la inhibición. Por otro lado, la proteína IF1 y la subunidad ζ, las cuales contienen su dominio inhibitorio en la región N-terminal, también presentan alta similitud entre ellas y preservan tres residuos de aminoácidos altamente conservados que han sido descritos como indispensables para la interacción y posterior inhibición de IF1 con la F₁-ATPasa de bovino (Figura 19 panel b) (Bason et al., 2011).

a) Alineamiento de la subunidad ϵ de bacterias.

	N-terminal	C-terminal
Escherichia	MAMTYHLDVVS AEQQMF SGLVEKIQVTGSEGE LGIYPGHAPLLTAIKPGMIRIVKQHGHE	60
Bacillus	-MKTIHVSVVTPDGPVYEDDVEMVSVKAKSGELGILPGHIPLVAPLEISAAR-LKKGGKT	58
	* * : . * * : : : . . . * * : . * . . . * * * * * * * * * * * * : : : . * : * : * :	
Escherichia	EFIYLSGGILEVQPGNVTVLADTAIRGQDLDEARAMEAKRKAEEHISSSHGDVDYAQASA	120
Bacillus	QYIAVSGGFLEVRPDNVTILAQAERAEDIDLRAKAR-KSGRTPLQSQQDDIDFKRAEL	117
	:: * : * * * : * * * : * . * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * :	
Escherichia	ELAKAIAQLRVIELTKKAM	139
Bacillus	ALKRAMNRLSVAEMK----	132
	* : * : : * * * * : .	

b) Alineamiento de las proteínas inhibitorias IF1 y ζ de *Bos taurus* y *P. denitrificans*.

	N-terminal	C-terminal
Zeta	-----MTTFDDRERAHEAKFAHDAEL-NFKA--EARRNRL-----	33
IF1	GSESGDNVRSSAGAVRDAGGAFGKREQAEEERYFRARAKEQLAALKKHHENEISHHAKEI	60
	: * . * * : * . * : : : : : * : : * . * :	
Zeta	-----	33
IF1	HHHHHH	66

Figura 19 Alineamiento de secuencias de los inhibidores de la hidrólisis de ATP

a) En este panel se muestra la similitud que existe entre la subunidad ϵ de la ATP sintasa de las bacterias *E. coli* y *Bacillus sp.*; estas subunidades se encuentran altamente conservadas a pesar de sufrir plegamientos diferentes para insertarse en la interfaz $\alpha/\beta/\gamma$. b) En este panel se muestra la similitud que existe entre las proteínas inhibitorias IF1 de *B. taurus* y ζ de *P. denitrificans*, resaltando con recuadros rojos los residuos de aminoácidos altamente conservados, que se han reportado indispensables ya sea para la unión o para la inhibición en la proteína de bovino (IF1).

Estos análisis de alineamiento de secuencia, sumados a observaciones estructurales de los modelos generados para las ATP sintasas unidas a sus inhibidores, refuerzan la idea de que los mecanismos de control de la hidrólisis de ATP basados en proteínas inhibitorias se mantienen conservados entre las diferentes especies a pesar de que el dominio de inhibición se encuentre en regiones diferentes (Zarco-Zavala et al., 2018).

8.4. Extensión de la región N-terminal de la subunidad δ de la ATP sintasa de *Polytomella sp.*

Recientemente se logró generar un modelo para la F_1F_0 -ATP sintasa completa del alga *Polytomella sp.* utilizando la técnica de criomicroscopía electrónica de alta resolución (Cryo-EM) (Murphy et al., 2019).

La estructura dimérica de la enzima reveló la disposición topológica de todas las subunidades del brazo periférico y describió la presencia de una subunidad adicional denominada ASA10 la cual está implicada en la dimerización de la enzima.

Aprovechando que el modelo generado para esta enzima fue depositado en el PDB (6re0); la F₁F₀-ATP sintasa de *Polytomella sp.* fue sometida a un alineamiento estructural con el sector F₁-ATPasa de *B. taurus* (PDB: 2v7q). Al observar el alineamiento de estructura de las F₁-ATPasas de estas dos especies, sobresale la presencia de una extensión de alrededor de 30 residuos de aminoácidos en la región N-terminal de la subunidad δ en *Polytomella sp* que no está presente en la enzima de bovino (Figura 20).

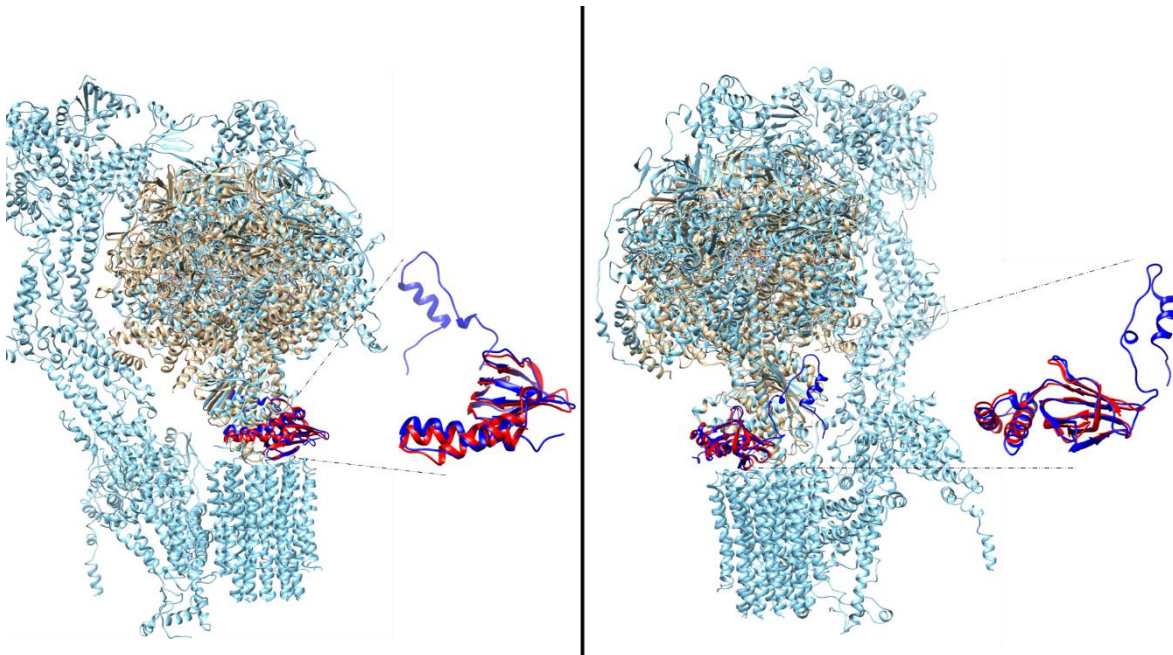


Figura 20 Superposición de estructuras de las ATP sintasas de *Polytomella sp.* y *B. taurus*

La enzima F₁F₀-ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp.* (PDB: 6re0) se muestra en color azul claro resaltando la subunidad δ en color azul oscuro; el sector F₁-ATPasa de *B. taurus* (PDB: 2v7q) se muestra en color dorado resaltando la subunidad δ en color rojo. La superposición de estructuras de estas dos enzimas permitió identificar un región N-terminal que sobresale en la enzima de *Polytomella sp.*

Para indagar sobre la naturaleza de esta extensión, se realizó una búsqueda de secuencias similares mediante BLAST y un alineamiento de subunidades δ de ATP sintasas mitocondriales para identificar si la extensión presente en *Polytomella sp.* se encontraba en la ATP sintasa de otras especies.

Como era de esperarse, el análisis reveló alrededor de 250 péptidos que presentan cierto grado de homología con esta subunidad. Todos ellos, pertenecen a la superfamilia Delta/Épsilon F₁- ATPasa. Sin embargo, el dominio de superfamilia δ abarca una región que va del residuo 70 al 156, y el dominio de superfamilia AtpC (que corresponde con la subunidad ϵ de bacterias) abarca los residuos 76 al 199. Por lo tanto, esta región N-terminal de la enzima del alga no está formando parte de la región altamente conservada entre las subunidades δ mitocondriales ni de la región conservada entre las subunidades ϵ bacterianas.

Para evaluar si la extensión de la región N-terminal de la subunidad δ estaba presente en otras especies, delimitamos los primeros 75 aminoácidos de esta región y nuevamente se realizó un búsqueda de secuencias mediante BLAST. El análisis arrojó solo 8 candidatos que presentan homología en esta región. Estos 8 péptidos corresponden a la subunidad δ mitocondrial de la ATP sintasa de algas verdes (Figura 21).

BLAST de los primeros 75 residuos de aminoácidos de la subunidad δ mitocondrial de *Polytomella sp.*

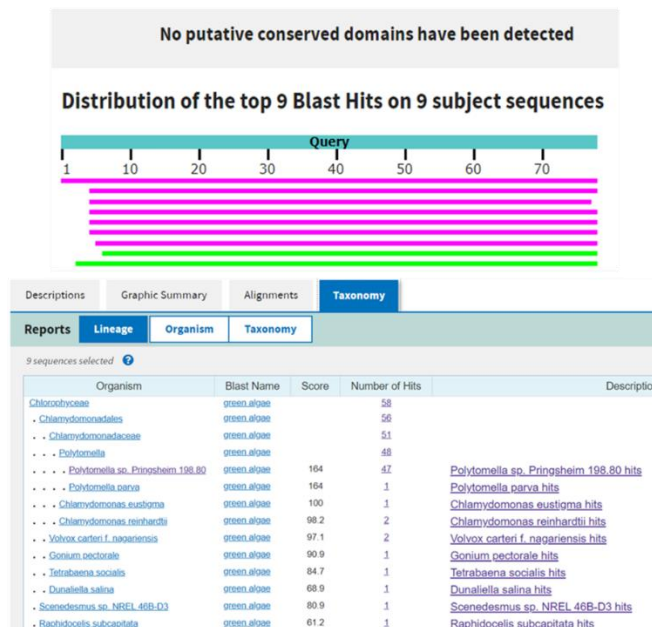


Figura 21 Análisis de alineamiento de secuencias mediante BLAST de los primeros 75 residuos de aminoácidos de la región N-terminal de la subunidad δ de *Polytomella sp.*

El BLAST de esta región, solo produjo 8 candidatos: *Chlamydomonas eustigma*, *C. reinhardtii*, *Volvox carteri*, *Gonium pectorale*, *Tettrabaena socialis*, *Dunaliella salina*, *Scenedesmus sp.* y *Raphidocelis subcapitata*; todos ellos pertenecientes a la clase de algas clorofíceas.

Posteriormente se realizó un alineamiento de la secuencia de la subunidad δ mitocondrial de *Polytomella sp.* contra la subunidad δ de cuatro de estas algas (*T. sociales*, *G. pectorale*, *C. reinhardtii* y *V. carteri*).

La subunidad δ al igual que todas las subunidades que forman el complejo enzimático de la ATP sintasa mitocondrial están codificadas en el núcleo, por lo tanto, necesitan de una secuencia de localización para que estas subunidades sean dirigidas a la mitocondria. Una vez ahí las secuencias son procesadas por proteasas mitocondriales que eliminan al péptido señal que no formará parte de la proteína madura (Priesnitz y Becker, 2018). Tomando esto en cuenta, el alineamiento de secuencia que se realizó para comparar la subunidad δ de *Polytomella sp.* contra la misma subunidad en otras especies, se hizo eliminando esta presecuencia que generalmente se encuentra en la región N-terminal (Figura 22).

Alineamiento de la subunidad δ mitocondrial de algunas algas clorofíceas

	N-terminal	C-terminal
	Extensión de la subunidad δ	
Polytomella	-----EAAAPAGPKFTEVWNKKAPSTLIVPEFPSNY	TAVKAVGEGQVHGDAFPVN 51
Tetrabaena	VSTSTVCMEEAAIPAGPKFAEAWLKKAPSTLEAPAVPSTW	TNVST--ENQTQGDLFPVN 58
Gonium	-----EEVAVAAGPKFAEAWAKKAPSTLVAPELPSKF	TNIST--ENQTQGDLFPVN 50
Chlamydomonas	-----EEVAVPAGPKFTEAWNKKAPSQLLVPELPSNF	TNVSA--DNQTQGDLFPVN 50
Volvox	-----EEAVIPAGPKFAEAWNKKAPSTLAVPELPSNF	TNVST--EPQTQGDLFPVN 50
	*.. *****;*. * ***** * . * .**.:* :.: :*.:** ****	
Polytomella	FYTPHSILSQA-QKDTVVLPGVDGYFGVKASHVPTIAQLKPGVVELHSGAESEKFFVSGG	110
Tetrabaena	FYTPHSILADGAKRDGVTLPIDGYFGVKANHVPPIAQLRPGMVVELSSGAETEKFFISGG	118
Gonium	FYTPHSVLADGVKKDGVTLPGIDGYFGIKANHVPPIAQLRPGVVELSSGAETEKYFISGG	110
Chlamydomonas	FYTPSSVLADGVKKDGVTLPGIDGYFGVKANHVPVIAQLRPGIVELSSGADTEKFFIAGG	110
Volvox	FYTPHSVLSDGAKKDGVTLPGIDGYFGIKANHVPPIAQLRPGIVELSSGPDETEKFFISGG	110
	**** *.: :.: * .**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**.:**	
Polytomella	FAFVHPNGVTDICVLEAATLDQVDPAAVKSALAAASAAQ-PTDEFQAAANRAAIELYSAL	169
Tetrabaena	FAFVHPNGVADICAL EAGTLDQFDAGAVKSALAAATSAQGGDEYDQAAANRAALELYAL	178
Gonium	FAFVHPNGVADICVLEAGTLDQFDAAVKSALNSATSQGGDEYDQAAANRAALELYGAL	170
Chlamydomonas	FAFVHPNGVADICAL EAGTLDQFDPAAVKSALAAANSAQGGDEYDQAAANRAALELYAL	170
Volvox	FAFVHPNGVADICAL EAGTLDQFDPAVKSALAAATSAQGGDEYDQAAANRAALELYGAL	170
	*****:***.***.***.* . ***** :*.:** **.:*****:***.**	
Polytomella	ESAVEAKA	177
Tetrabaena	DSAIDSKA	186
Gonium	DSALDSKA	178
Chlamydomonas	DSALDQKS	178
Volvox	DSALDNKA	178
	:***: *:	

Figura 22 Alineamiento de la subunidad δ de la ATP sintasa mitocondrial de organismos pertenecientes al género de algas verdes

El alineamiento de secuencia de la subunidad δ mitocondrial de *Polytomella sp.*, *T. sociales*, *G. pectorale*, *C. reinhardtii* y *V. carteri*, reveló que la extensión de la región N-terminal de esta subunidad se encuentra bastante conservada en este linaje de algas verdes.

El alineamiento de secuencia reveló una alta similitud entre ellas, incluso en la región que corresponde con la extensión N-terminal, que no está presente en la ATP sintasa de otros organismos.

Para probar que efectivamente la subunidad δ de la ATP sintasa mitocondrial de las algas verdes contiene una extensión en la región N-terminal en comparación con la misma subunidad en otras especies, se realizó un alineamiento de secuencias de las subunidades δ de organismos representativos contra esta misma subunidad en *Polytomella sp.* Nuevamente el análisis de alineamiento de secuencia se hizo sin tomar en cuenta la presecuencia de localización mitocondrial que se encuentra en la región N-terminal y solamente se alinearon los residuos de aminoácidos correspondientes con la proteína madura (Figura 23).

Alineamiento de la subunidad δ mitocondrial de *Polytomella sp.* contra la misma subunidad en otras especies

N-terminal	-----	C-terminal
	Extensión de la subunidad δ	
Polytomella	EAAAPAGPKEFTEVWKKAPSTLIVPEFPSNYTAVKAVGEGQVHGDAFPVNFYTPHSIL-	59
Human	-----AEAAAAPAAASGPNQMSFTFASPTQVFF	28
Bos	-----AEAAAQAPAAGPGQMSFTFASPTQVFF	28
Saccharomyces	-----AEAAAASSGLKQLQFALPHETLY	22
C.elegans	-----AAAAPAANANPEELRLTFASPD TAVF	26
	: . * * .	
Polytomella	SQAQKDTVVLPGVDGYFGVKASHVPTIAQLKPGVVELHSG-AESEKFFVSGGFVFPVHPNG	118
Human	NGANVRQVDVPTLTGAFGILAAHVPTLQVLRPGLVVVHAEDGTTSKYFVSSGSIAVNADS	88
Bos	NSANVRQVDVPTQTGAFGILAAHVPTLQVLRPGLVVVHAEDGTTSKYFVSSGSVTVNADS	88
Saccharomyces	SGSEVTQVNLPAKSGRIGVLANHVPTVEQLLPGVVEVMEG-TNSKKFFISGGFATVQVPS	81
C.elegans	SNAVVKQVDVPTLAGMVGVLANHVPTIGVLPVSVTTNEGTVQRLFVSSGTLVSNIDG	86
	. : * : * * . * : * * * * : * * * * : . : * : * * * : : .	
Polytomella	VTDICVLEAATLDQVDPAAVKSALAAASAAQP-TDEF-EQAANRAAIELYSALESAVEAK	176
Human	SVQLLAEAEAVTLDMLDLGAAKANLEKAQAEVGTADEATRAEIQIRIEANEALVKALE--	146
Bos	SVQLLAEAEAVTLDMLDLGAAKANLEKAQSELLGADEATRAEIQIRIEANEALVKALE--	146
Saccharomyces	QLCVTAIEAFPLESFSQENIKNLLAEAKKNVS-SSDAREAAEAAIQVEVLENLQSVLK--	138
C.elegans	SCQVLAEEVLKVEEIDESARAELDAAQR-ASGEGSEVARAEQIRAEVAEALIKAATNQ	145
	: . * . : : . . : * * . . * * * . * . * .	
Polytomella	A	177
Human	-	
Bos	-	
Saccharomyces	-	
C.elegans	Q	146

Figura 23 Alineamiento de la subunidad δ de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp.* contra la misma subunidad en otras especies

El alineamiento de secuencia de la subunidad δ mitocondrial de *Polytomella sp.* contra la misma subunidad de organismos modelo reveló que la extensión de la región N-terminal no está presente en la ATP sintasa de estos organismos.

Dado que la extensión N-terminal de la subunidad δ no se encuentra presente en la enzima de otros organismos modelos, en un principio se pensó que probablemente esta región era única del linaje de algas clorofíceas tal y como ocurre con las extensiones de las subunidades α y β (Atteia et al., 1997).

Para abordar esta cuestión se realizó un alineamiento de secuencia de la subunidad δ mitocondrial de *Polytomella sp.* con la misma subunidad en la ATP sintasa mitocondrial de algunas plantas (Figura 24).

Alineamiento de la subunidad δ mitocondrial de *Polytomella sp.* contra la misma subunidad en otras especies

N-terminal	-----	C-terminal
	Extensión de la subunidad δ	
Polytomella	----EAAAPAGPKEFTEVWKKAPSTLIVPEFPSNYTAVKAVGEGQVHGDAFPVNFYTP-	55
Arabidopsis	-STEL--PSTLDSTFVEAWKKVAPNM-EPPQTPSAFMKPRPSTPSSI-PTKLTVNFVLPY	55
Juglans.regia	-SSDLPAAPTSDSAFIESWKKVIPNI-EPPKTPSNFLRPRPATPTSI-PSKITVNFVLPY	57
Oriza.sativa	STAEVPAEAATDSAFAEAWKKVAPNI-EAPATPMSLMQPRPPTPAAI-PSKLTVNFVLPY	58
Populus.alba	-STNVPATPVEDSAFLESWKKVAPNI-DPPKTPSAFMKPRPPTPTSI-PSKITVNFVLPY	57
	. . * * * : * * . * * * : : : * * * *	
Polytomella	HSILSQAQKDTVVLPGVDGYFGVKASHVPTIAQLKPGVVELHSGAESEKFFVSGGFVHVH	115
Arabidopsis	TSELTGKEVDMVIIIPASTGQMGLVPGHVPTIAELKPGIMSVHEGTDVKKYFLSSGFVFLH	115
Juglans.regia	ASELSAKEVDMVIIIPATTGQMGLVPGHVPTIAELKPGVLSVHEGNDVTKYFLSSGFVFIH	117
Oriza.sativa	KSEIANKEVDMVIVPATTGQMGLVPGHVSTIAELKPGVLSVHEGNDITKYFVSSGFVHVH	118
Populus.alba	ASELTSKEVDMVIIIPATTGQMGLVPGHVPTIAELKPGVLSVHEGNDVKKYFLTSGFVHVH	117
	* : : * * : * : * * : * * * * : * * * : * : * * : * : * * : * : * * : *	
Polytomella	PNGVTDICVLEAATLDQVPAAVKSAALAAASA--AQPTDEFQAANRAAIELYSALESV	173
Arabidopsis	ANSVADIIAVEAVPLDHIDPSVQKGLAEFQQLASATTDLEKAEQIGVEVHSAINAL	175
Juglans.regia	ANSVADIIAVEAVRIDHIDPSLVQKGLAEFTQKLSSATTELEKAEQIGVELHSALNSAL	177
Oriza.sativa	ANSIADIVAVEAVPLDQIDPAAVQGLAEFNAKLGSASTELEKAEQIGVDVHSAINAL	178
Populus.alba	ANSVADIVVVEAVPVDHIDQNLVQKGLADFTQKLSSATTELEKAEQIGIDVHSAINAL	177
	* : * * * . : * * . : * * * * * : * * * * * . . : : * * * * : . : * * * * : * * * * :	
Polytomella	EAKA	177
Arabidopsis	SG--	177
Juglans.regia	SG--	179
Oriza.sativa	AG--	180
Populus.alba	VG--	179

Figura 24 Alineamiento de la subunidad δ de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp.* contra la misma subunidad en otras especies de plantas

El alineamiento de secuencia de la subunidad δ mitocondrial de *Polytomella sp.* contra la subunidad δ de plantas reveló que la extensión de la región N-terminal también se encuentra presente en plantas, además esta extensión presenta cierto grado de similitud con la subunidad δ de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp.*

Este alineamiento de secuencias reveló que la extensión en la región N-terminal de la subunidad δ mitocondrial también se encuentra presente en la enzima mitocondrial de plantas.

Estos péptidos cuentan con al menos 7 residuos de aminoácidos altamente conservados en la zona que corresponde con la extensión N-terminal, lo que plantea la pregunta de qué papel está jugando esta extensión en la ATP sintasa mitocondrial de plantas superiores y algas verdes.

8.5. Análisis de estructural y alineamiento de secuencias entre la subunidad δ de *Polytomella sp.* y la subunidad ϵ de *E. coli*.

Para indagar si la subunidad δ podría tener un papel en la regulación de la actividad hidrolítica de la enzima, se realizó un alineamiento de secuencia y una sobreposición de estructura entre la subunidad δ de *Polytomella sp.* contra la subunidad ϵ de *E. coli*, (Figura25) ya son homólogos (Guo and Rubinstein, 2018); además como se mostró al inicio (Figura 17), esta última es la responsable de controlar la actividad hidrolítica de la ATP sintasa bacteria.

Alineamiento de secuencia y análisis estructural de la subunidad δ de *Polytomella sp.* contra la subunidad ϵ de *E. coli*

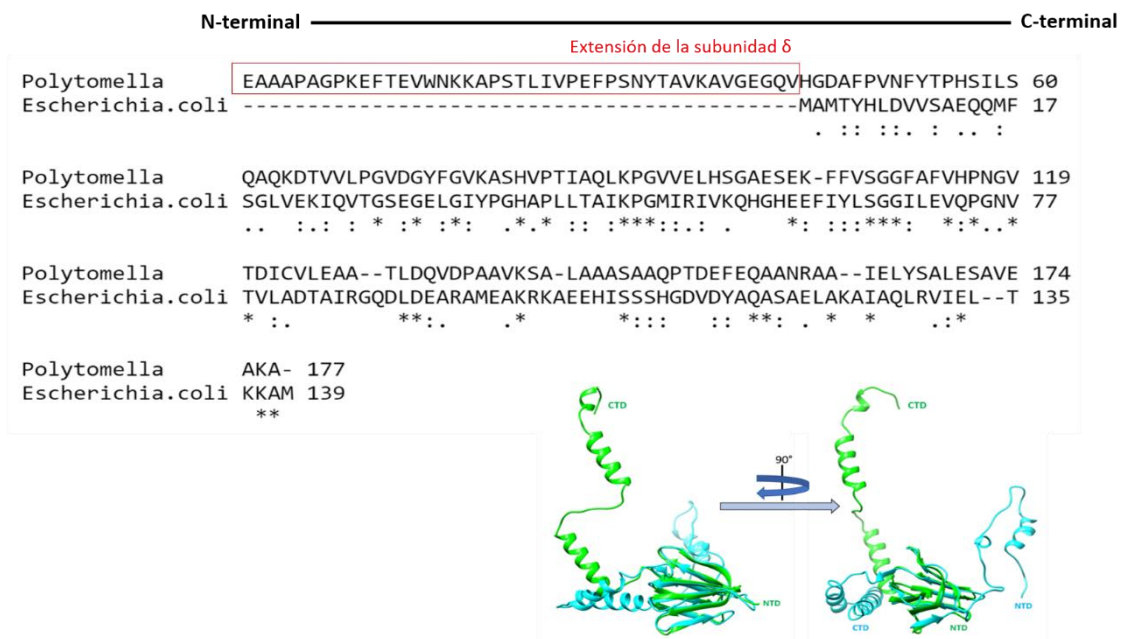


Figura 25 Análisis de estructural y alineamiento de secuencias entre la subunidad δ de *Polytomella sp.* y la subunidad ϵ de *E. coli*

En la parte superior se muestra el alineamiento de secuencias de residuos de aminoácidos de la subunidad δ de *Polytomella sp.* (acceso al PDB: 6J5K) contra la subunidad ϵ de *E. coli*. (acceso al PDB: 3oaa). En la parte inferior se muestra la sobreposición de estructura de las mismas subunidades ϵ de *E. coli* (verde) y δ de *Polytomella sp.* (cian).

Los análisis tanto del alineamiento de secuencia como el empalme estructural muestran que existe una relación estructural entre estas subunidades, lo cual nos lleva a sugerir que la subunidad δ podría estar jugando un papel en la regulación de la actividad hidrolítica en la enzima de *Polytomella sp.* Estos análisis deben de ser tomados con precaución, ya que deberán ser corroborados mediante aproximaciones experimentales que demuestren que efectivamente esta subunidad controla la actividad de ATPasa de la enzima del alga.

8.6. Purificación de la ATP sintasa mitocondrial del alga *Polytomella sp.*

Para abordar la cuestión de la posible existencia de un inhibidor de la hidrólisis de ATP en la F_1F_0 -ATP sintasa del alga incolora *Polytomella sp.*, fue importante contar con un protocolo que nos permitiera obtener al sector soluble F_1 (dado que aquí es donde reside el núcleo catalítico de la enzima) libre de contaminantes y otros elementos que podrían interferir con los ensayos bioquímicos de actividad. La ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp.* fue purificada siguiendo el protocolo de Vázquez-Acevedo et al., 2006. Después de romper las células mecánicamente y extraer las mitocondrias por centrifugación diferencial, éstas fueron solubilizadas con Lauril Maltósido, para ser cargadas en una columna de intercambio aniónico (DEAE-Biogel).

Asa1	63.1 kDa
β	61.8 kDa
α	56.8 kDa
Asa2	45.5 kDa
Asa4	36.3 kDa
γ	36.1 kDa
Asa3	35.9 kDa
OSCP + α	22.9 kDa
δ	21.2 kDa
Asa7	19.5 kDa
Asa5	14.3 kDa
Asa6	13.3 kDa
Asa8	10.0 kDa
Asa9 + ϵ	8.3 kDa

Tabla 1 Subunidades y masas moleculares de la ATP sintasa mitocondrial del alga incolora *Polytomella sp.* (modificado de Vázquez-Acevedo et al., 2006)

Las fracciones se colectaron después de hacer pasar un gradiente lineal de NaCl (0-150 mM) por la columna. Aquellas fracciones que presentaron absorbancia a 280 nm se colectaron (Figura 26, panel a, zona roja) y analizaron en geles de poliácridamida-SDS. De este gel se seleccionaron las fracciones donde se encontró la presencia de las bandas polipeptídicas características de la ATP sintasa del alga (Tabla 1 y Figura 26, panel b).

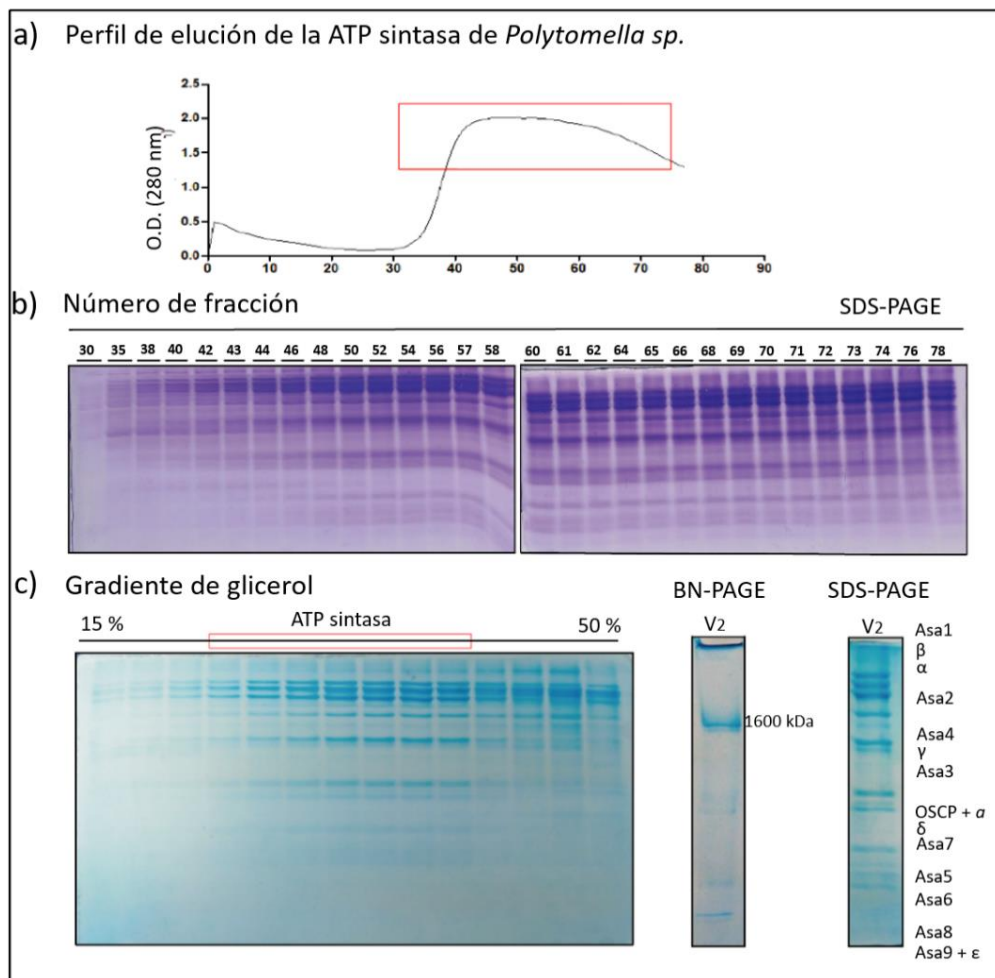


Figura 26 Purificación de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp.*

(a) Perfil de elución de la ATP sintasa Obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Biogel A) y utilizando un gradiente continuo de NaCl. El cuadro rojo marca las fracciones donde la enzima se encuentra más enriquecida. b) Gel de poliácridamida SDS en donde se cargaron las fracciones que presentaron una mayor absorbancia a 280 nm. (c) Separación electroforesis en gel de poliácridamida SDS de las fracciones recuperadas del gradiente de glicerol (izquierda); las fracciones que corresponden a la zona marcada en rojo fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliácridamida nativos (BN-PAGE) y desnaturalizantes (SDS-PAGE).

8.7. Liberación del sector F₁ mediante tratamiento con detergente y calor

Una vez que se obtuvo una fracción enriquecida con la F₁F₀-ATP sintasa mitocondrial en su forma dimérica, la enzima fue tratada con TDOC al 3 %, para favorecer la disociación del dímero a monómero (Villavicencio-Queijeiro et al., 2009). La fracción que contenía el monómero de la enzima fue sometida a una incubación a 37 °C durante 15 minutos, promoviendo la liberación del sector F₁ de la enzima (Figura 27, panel a).

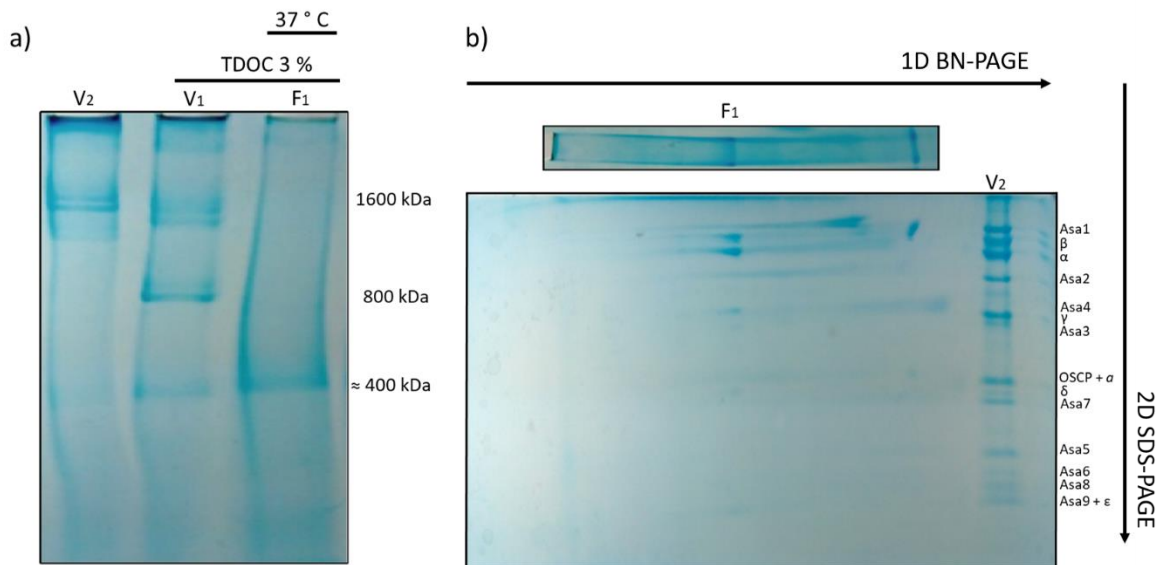


Figura 27 Liberación del sector F₁ de la enzima F₁F₀-ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp.*

(a) Electroforesis nativa (BN-PAGE). En el primer carril (V₂) se cargó a la F₁F₀-ATP sintasa en su forma dimérica. En el segundo carril (V₁) se cargó la enzima después de haber sido tratada con taurodesoxicolato al 3%. Por último, en el tercer carril (F₁) se cargó la enzima enriquecida en la forma del sector F₁-ATPasa, la cual fue liberada a incubando la enzima a 37 °C durante 15 minutos. (b) Caracterización de la banda correspondiente al sector F₁-ATPasa mediante electroforesis 2D.

Para analizar si la banda con masa molecular de 400 kDa que se ve en el gel en realidad era el sector F₁, después de la electroforesis azul nativa un carril con una réplica de la muestra fue cuidadosamente cortado y sometido a una electroforesis bidimensional desnaturizante (2D-SDS-PAGE). Como puede apreciarse, esta preparación cuenta con todas las subunidades canónicas descritas para la F₁-ATPasa (β , α , γ , δ y ϵ) (Figura 27, panel b). Por lo tanto, con este método de disociación se logró obtener una fracción enriquecida del sector F₁.

Sin embargo, como se puede observar en los geles de segunda dimensión, la muestra aún cuenta con la presencia de contaminantes que podrían ser las demás subunidades disociadas que no forman parte del sector catalítico de la enzima (subunidades del brazo periférico o subunidades pertenecientes al sector F_0).

8.8. Purificación del sector F_1 -ATP sintasa liberado de la ATP sintasa mitocondrial aislada

Dada la presencia de contaminantes en la preparación, el sector F_1 fue sometido a cromatografía en una columna de exclusión molecular (Superose 6 10/300 GL, 24 mL) conectada a un equipo FPLC ÄKTA UPC-900 Workstation (GE Healthcare Life Sciences). Las fracciones que presentaron un máximo de absorbancia a 280 nm fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (Figura 18 panel a). Aquellas que presentaron al menos dos de las bandas características del sector F_1 (β y α) fueron concentradas por filtración para ser evaluadas por electroforesis en condiciones nativas (Figura 28 panel b).

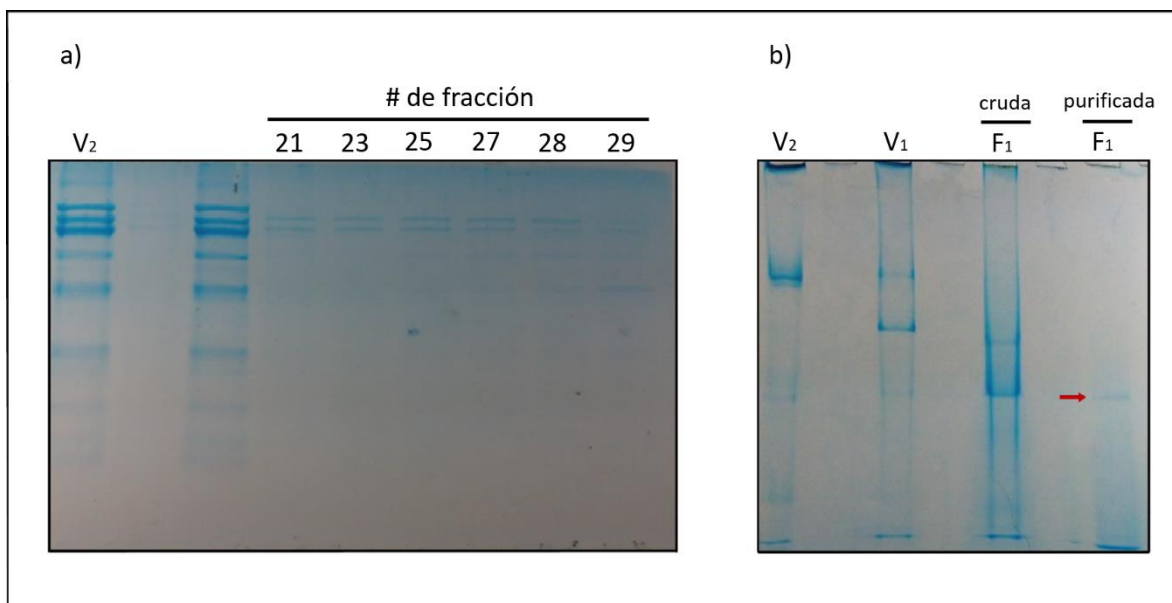


Figura 28 Cromatografía de exclusión molecular del sector F_1 liberado de la F_1F_0 -ATP sintasa purificada

(a) Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de un perfil de elución de una cromatografía de exclusión molecular de las fracciones que presentaron un máximo absorción a 280 nm. (b) Electroforesis nativa (BN-PAGE) de la enzima dimérica (carril V_2), en su forma monomérica (carril V_1), el sector F_1 liberado por tratamiento con TDOC e incubación con calor (Carril F_1 cruda), sector F_1 después de haber pasado por una columna de exclusión molecular (Carril F_1 purificada)

A pesar de que en el gel azul nativo se logra identificar una banda tenue que corresponde con la masa molecular del sector F_1 el rendimiento fue bastante pobre, lo que limitaría la realización de ensayos posteriores con la enzima. Por lo tanto, este método, a pesar de ser muy prometedor, tiene el inconveniente de brindar cantidades de F_1 -ATPasa muy limitadas y además requiere de un gran número de pasos para poder aislar el sector F_1 . Teniendo esto en mente, planteamos la posibilidad de extraer el sector F_1 de la enzima partiendo de SMP.

8.9. Extracción de SMP del alga incolora *Polytomella sp.*

La obtención de SMP del alga incolora fue adaptado a partir de los protocolos descritos por Walker y cols. (1985) y Beechey y cols. (1975) haciendo algunas modificaciones. Se aislaron mitocondrias del alga incolora *Polytomella sp.* con el mismo método empleado para purificar la ATP sintasa dimérica (Vázquez-Acevedo et al., 2006). La suspensión de mitocondrias fue tratada con un sonicador Sonifer Ultrasonic Cell Disruptor Branson SFX250 por 6 periodos de 15 segundos (utilizando una amplitud del 30 %) en un medio hipotónico. Las mitocondrias intactas (que no lograron romperse después de la sonicación) se sedimentaron por centrifugación y la fracción soluble (que contenía las SMP) fue recuperada y nuevamente centrifugada para sedimentarlas y concentrar la preparación de SMP (Figura 29, panel a).

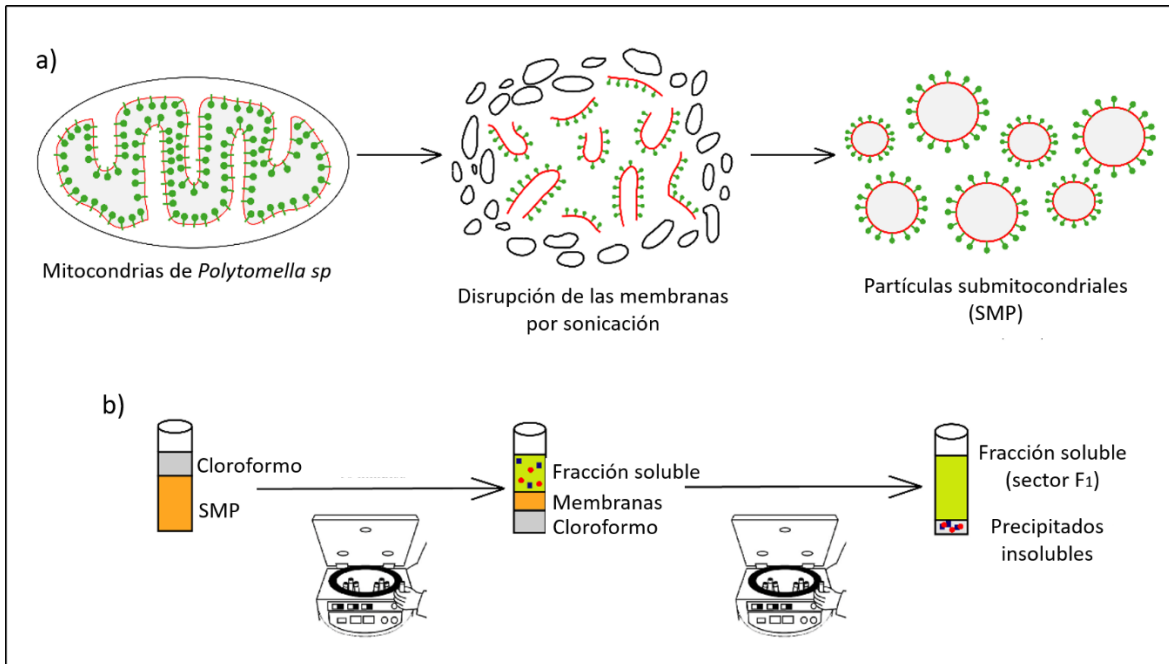


Figura 29 Esquema resumido del protocolo de extracción de SMP y liberación del sector F₁-ATPasa por cloroformo

(a) Las mitocondrias extraídas del alga fueron lisadas por sonicación causando una ruptura tanto de membrana interna como la membrana externa mitocondrial. Después, la muestra fue centrifugada para sedimentar las mitocondrias que no se lisaron y el sobrenadante fue nuevamente centrifugado a alta velocidad para sedimentar las SMP. (b) Las SMP fueron tratadas con cloroformo y centrifugadas a baja velocidad para promover la formación de tres fases, la fracción soluble fue recuperada y nuevamente centrifugada a alta velocidad para sedimentar los precipitados insolubles y obtener una fracción enriquecida en el sector F₁-ATP sintasa (para más detalles ver métodos).

8.10. Calidad de las SMP generadas por sonicación.

Para verificar que la extracción de SMP fue exitosa y que se encontraban presentes todos los complejos mitocondriales, se evaluó el consumo de oxígeno en estas preparaciones empleando al NADH como donador de electrones. Las partículas se obtienen con un buen rendimiento y poseen un actividad respiratoria específica comparable con la de otras preparaciones de SMP.

Aunque se esperaba un aumento mayor en el consumo de oxígeno al adicionar NADH, la caída en la concentración de oxígeno al adicionar ADP sugiere que los componentes de la CTE y la ATP sintasa están presentes en estas preparaciones y además se encuentran acoplados, demostrando que este método es eficiente para la generación de SMP

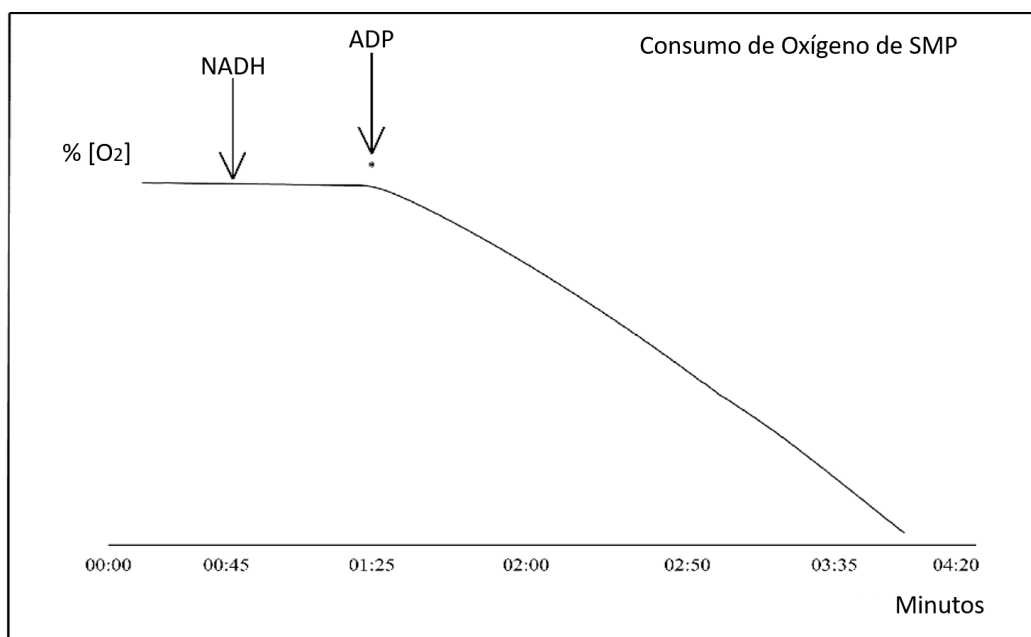


Figura 30 Consumo de oxígeno de SMP de *Polytomella sp.*

Se evaluó el consumo de oxígeno en presencia de NADH como donador de electrones de la CTE. El asterisco indica la adición de ADP al sistema y el cambio en la pendiente del consumo de oxígeno sugiere que las membranas de las SMP se resellaron y que la CTE y la OXPHOS se encuentran acoplados dando como resultado la síntesis de ATP.

8.11. Liberación de F₁ a partir de SMP mediante tratamiento con cloroformo.

Se realizó una extracción con cloroformo del sector F₁ a partir de las muestras de SMP generadas con el protocolo antes mencionado (Figura 29, panel b). Las muestras colectadas después del tratamiento con cloroformo fueron sometidas a electroforesis BN-PAGE y 2D (BN/SDS-PAGE).

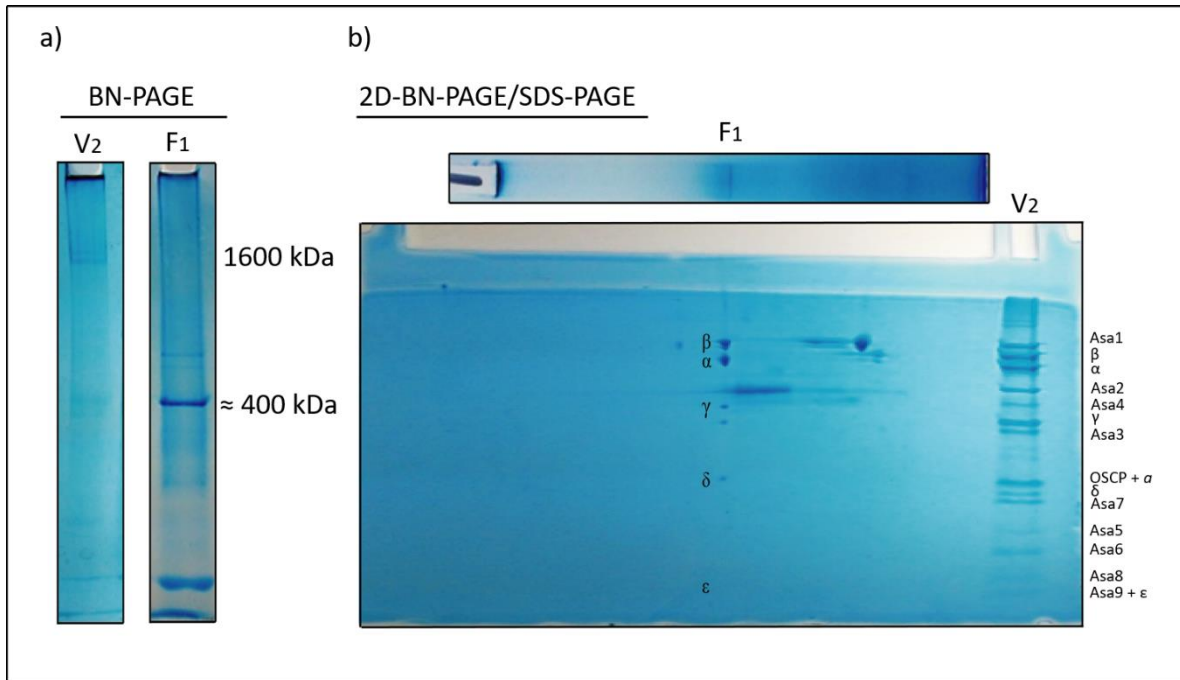


Figura 31 Liberación de F₁ a partir de SMP de *Polytomella sp.*

(a) Electroforesis en condiciones nativas BN-PAGE donde se muestra el dímero de la ATP sintasa (carril V₂ 1600 KDa) y una banda que tentativamente corresponde con el sector F₁ después de haber tratado a las SMP de *Polytomella sp.* con cloroformo (carril F₁, 400 KDa). (b) Electroforesis 2D (BN-PAGE/SDS-PAGE) donde se caracterizaron las subunidades que forman la banda denominada F₁ en donde se aprecian las subunidades que característicamente conforman este sector en otras especies (β , α , γ , δ y ϵ).

Como se logra apreciar en los gels nativos, la liberación del sector F₁ de la membrana mitocondrial con cloroformo es altamente específica. El tratamiento con este solvente permite extraer una banda con una masa molecular aparente de 400 kDa lo que concuerda con lo esperado para el sector F₁ del complejo F₁F₀-ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp.* Al analizar la composición polipeptídica de este complejo de 400 kDa aislado a partir de SMP por tratamiento con cloroformo mediante electroforesis 2D (BN/SDS-PAGE), se encontró la presencia de las subunidades canónicas que forman parte de este sector (β , α , γ , δ y ϵ). Por lo tanto, una de las principales ventajas de este método es la rapidez con la que se puede llevar a cabo un aislamiento del sector F₁ permitiendo obtener cantidades suficientes de la enzima para ensayos posteriores.

8.12. Purificación del sector F_1 liberado a partir de SMP.

Al igual que con la preparación de F_1 aislada partiendo de la F_1F_0 -ATP sintasa, el sector catalítico liberado a partir de SMP por tratamiento con cloroformo presenta algunas contaminaciones (Figura 31, panel b).

Para eliminar las impurezas de estas preparaciones de SMP, las muestras fueron sometidas a una cromatografía de exclusión molecular con el fin de obtener una purificación ulterior de la enzima. Se utilizó la misma columna cromatográfica de exclusión molecular (Superose 6 10/300 GL, 24 mL) empleada en la purificación del sector F_1 liberado partiendo de la enzima previamente aislada. Las fracciones colectadas se analizaron por espectrofotometría y aquellas que presentaron un mayor absorbancia a 280 nm se visualizaron en geles de poliacrilamida-SDS (Figura 32).

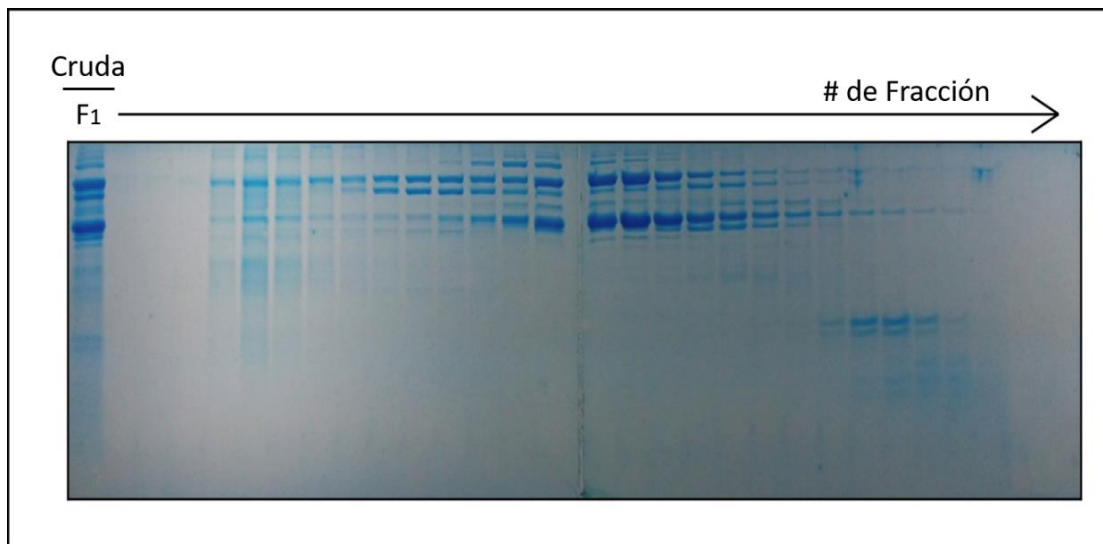


Figura 32. Cromatografía de exclusión molecular del sector F_1 liberado a partir de SMP.

SDS-PAGE de un perfil de elución de una cromatografía de exclusión molecular donde se cargó la muestra de F_1 liberada con cloroformo a partir de una preparación de SMP.

Sin embargo, a diferencia de las muestras del primer aislamiento, aquí se observa la presencia de bandas no esperadas posiblemente debido a una proteólisis de las subunidades del sector F_1 durante la cromatografía.

8.13. Comparación del sector F₁ liberado por ambos diseños experimentales contra el sector F₁ liberado solo por tratamiento con calor.

Los resultados anteriores demuestran que ambas aproximaciones experimentales permiten la liberación del sector catalítico de la enzima. No obstante, el número de pasos, tiempo invertido y rendimiento de la cantidad de proteína recuperada difiere bastante entre un protocolo y otro, dando mejores resultados la extracción de F₁ partiendo de SMP. Por otro lado, una característica importante que debe cumplir el sector F₁ aislado ya sea por los métodos aquí descritos o por cualquier otro método, es que la enzima conserve su actividad catalítica. Por lo tanto, se midió la actividad hidrolítica de las dos preparaciones de F₁ generadas por los protocolos antes descritos. En estos ensayos de hidrólisis de ATP la actividad catalítica de nuestras preparaciones de F₁ se comparó contra una fracción enriquecida del sector F₁ disociado de la F₁F₀-ATP sintasa mediante la incubación de la muestra a altas temperaturas por periodos cortos de tiempo (60 °C, 2 minutos). Esta fracción de F₁ disociada solo por calor presentan una alta actividad hidrolítica comparada con la actividad que presenta la enzima en su forma dimérica (Figura 33, panel d).

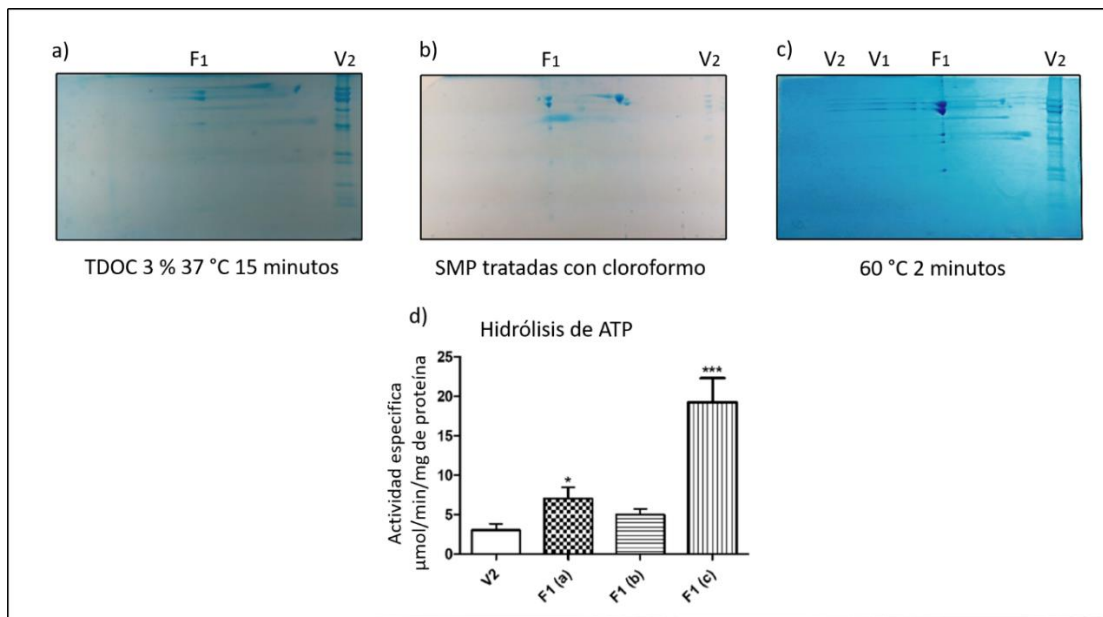


Figura 33 Comparación de tres preparaciones de F₁-ATPasa de *Polytomella sp.*

(a) Electroforesis 2D (BN-PAGE/SDS-PAGE) de una F₁-ATPasa liberada mediante tratamiento con TDOC al 3% e incubación a 37 °C durante 15 min. (b) F₁-ATPasa liberada a partir de SMP tratadas con cloroformo. (c) F₁-ATPasa liberada incubando la enzima previamente purificada a 60 °C durante 2 minutos. (d) Comparación de la actividad hidrolítica de la enzima (μmol/min/mg de proteína) dimérica y las tres preparaciones que liberan el sector F₁.

Al analizar la composición polipeptídica de la F_1 generada por nuestros tratamientos (Figura 24, panel a, b) contra la F_1 disociada solo por calor (Figura 33, panel c) no encontramos diferencia entre ellas, todas cuentan con las subunidades canónicas que normalmente se encuentran formando este sector ($\beta, \alpha, \gamma, \delta$ y ϵ). Sin embargo, aunque la actividad hidrolítica que presentan las fracciones de F_1 generadas en este trabajo son ligeramente mayores que la actividad hidrolítica que presenta el dímero aislado, estas no alcanzan una actividad catalítica tan alta como la que presenta el sector F_1 disociado de la enzima mediante incubación con calor (Figura 33 panel d). Lo que nos lleva a pensar que posiblemente los protocolos generados en este proyecto para aislar a F_1 , nos permiten obtener una versión en de la enzima en un estado inhibido.

8.14. Rendimiento de la F_1 liberada mediante dos estrategias experimentales.

Para saber qué cantidad de la enzima estábamos recuperando, se realizó un cálculo del rendimiento obtenido en cada uno de los protocolos experimentales. Como se aprecia en la Figura 34, el rendimiento de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial purificada a partir de mitocondrias aisladas del alga es de 8.13 % (Figura 34, panel a). Sin embargo, si tomamos en cuenta la cantidad de proteína presente en las mitocondrias comparada con la cantidad de proteína que se recupera en forma de F_1 después del tratamiento con TDOC y calor (0.12 %) se hace evidente que el rendimiento de esta estrategia es bastante pobre.

Por otro lado la cantidad de proteína que se recupera después de generar SMP y liberar el sector F_1 de la ATP sintasa mitocondrial mediante cloroformo, es mayor logrando alcanzar el 6.0 % de la proteína total de la que partimos en las mitocondrias. Por lo tanto, este protocolo tiene la ventaja de brindar mayor rendimiento con un número de pasos menor comparado con el que se logra obtener al disociar a la enzima (previamente purificada) con detergentes y calor.

a)

Rendimiento de F₁ liberado con TDOC 3 % e incubación a 37°C				
Muestra	Proteína (mg/mL)	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Rendimiento
Mitocondrias	20	40	800	100 %
ATP-Sintasa (V ₂)	9.3	7	65.1	8.13 %
F ₁ -ATPasa	0.42	2	0.84	0.12 %

b)

Rendimiento de F₁ liberada de SMP con cloroformo				
Muestra	Proteína (mg/mL)	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Rendimiento
Mitocondrias	10	30	300	100 %
SMP	40	4	160	53.3 %
F ₁ -ATPasa	4.5	4	18	6 %

Figura 34 Tabla de Rendimiento de la F₁ liberada mediante dos estrategias experimentales

La tabla (a) muestra el rendimiento obtenido para el sector F₁ liberado a partir de la enzima previamente purificada. La tabla (b) muestra el rendimiento obtenido al liberar el sector F₁ partiendo de SMP extraídas de mitocondrias del alga. Ambos cálculos toman en cuenta la cantidad de proteína total inicial presente en la preparación mitocondrial.

9. Discusión

En la primera parte de este trabajo se realizó un análisis estructural y de alineamiento de secuencia para tratar de dilucidar algunas de las principales características de las ATP sintasas más estudiadas y conocer a sus respectivos inhibidores naturales de la hidrólisis de ATP.

Comparado con su contraparte mitocondrial, la ATP sintasa bacteriana tiene una composición más simple. La región F₁ consiste de 4 subunidades con la siguiente estequiometría $\alpha_3/\beta_3/\gamma_1/\epsilon_1$. La subunidad β puede adoptar diferentes conformaciones y unir ADP-Mg (β_{DP}), ATP-Mg (β_{TP}), o permanecer vacía (β_E) (Boyer, 2002). En estructuras de ATP sintasa intacta de *E. coli*, se ha encontrado a la subunidad ϵ adoptando una conformación extendida que se ha relacionado con la inhibición de la hidrólisis de ATP (Figura 17) (Guo and Rubinstein, 2018). Esta inhibición depende principalmente de las condiciones bioenergéticas celulares. En contraste, en la bacteria termófila *Bacillus sp.* esta inhibición depende más de las concentraciones de ATP libre (Sekiya et al., 2010). Bajas concentraciones de ATP (< 0.7 mM) promueven la conformación extendida que mantiene la rotación de la enzima inhibida, mientras que una conformación contraída (permisiva para la hidrólisis) puede ser inducida por una alta concentración de ATP (> 1 mM). Por otro lado, en *E. coli* la inhibición de la hidrólisis persiste incluso cuando la concentración de ATP libre es alta (Guo and Rubinstein, 2018).

Para explicar estas diferencias, recientemente se ha propuesto que la ATP sintasa de *Bacillus sp.* se encuentra todo el tiempo en una conformación extendida que permite la síntesis de ATP mientras que la hidrólisis de ATP esta auto-inhibida (Guo et al., 2019). En esta propuesta la subunidad ϵ mantendría una conformación extendida insertándose dentro de la interfaz α_{DP}/β_{DP} , forzando a β_{DP} a adoptar una conformación abierta que permite la unión de ADP-Mg y Pi otorgando a la enzima la posibilidad de rotar en la dirección de síntesis pero no en dirección de la hidrólisis de ATP en un mecanismo que funcionaría como una especie de trinquete el cual bloque la rotación en una sola dirección (Guo et al., 2019).

En comparación, la subunidad ϵ de la enzima de *E. coli* ha mostrado que el dominio C-terminal puede adoptar dos diferentes conformaciones, una conformación contraída y una conformación extendida (Iino et al., 2009; Sielaff et al., 2018) .

Estructuras cristalográficas han mostrado que en *E. coli*. la región C-terminal está conformada por dos α -hélices, unidas por una región de alrededor de 10 residuos de aminoácidos altamente flexible que permitiría que este cambio conformacional se lleve a cabo (Sekiya et al., 2010). Esta región altamente flexible responde a cambios energéticos en la bacteria (abatimiento en el potencial de membrana) e interacciona con la subunidad ϵ y estabilizando la conformación extendida de la subunidad ϵ de *E. coli*, lo que podría explicar por qué la auto inhibición en esta bacteria no depende de las concentraciones de ATP libre (Guo et al., 2019).

Por lo tanto, aunque las regiones a las que se une esta subunidad para bloquear la rotación en dirección de la hidrólisis de la F_1 -ATPasa son las mismas, los estímulos celulares que contralanzan este cambio conformacional (de un estado contraído permisivo a uno extendido inhibitorio) y el plegamiento que adoptan para llevar a cabo su función, son distintos para cada una de estas dos especies bacterianas.

En mamíferos el Factor inhibidor de la ATPasa 1 (IF1) es el encargado de controlar la actividad hidrolítica de la enzima para evitar que las reservas de ATP se consuman en condiciones donde el gradiente de protones ha colapsado (Pullman y Monroy, 1963). Curiosamente este péptido tiene la región inhibitoria en su dominio N-terminal a diferencia del inhibidor en bacterias el cual tiene su región inhibitoria en el dominio C-terminal (García-Aguilar y Cuezva, 2018).

Normalmente IF1 se encuentra como un dímero inactivo que interacciona consigo mismo a través de su región C-terminal. El efecto inhibitorio de IF1 sobre la actividad hidrolítica se vuelve óptimo cuando existe un pH ácido el medio, sin embargo, este se va perdiendo progresivamente a medida que el pH aumenta hacia la neutralidad. El incremento en el pH provoca que IF1 tienda a formar tetrámeros por la interacción de dos pares de dímeros. La formación de estos tetrámeros involucra el dominio N-terminal de la proteína enmascarando aún más la interacción de IF1 con la ATP sintasa (García-Bermúdez y Cuezva, 2016).

Muchos estudios han mostrado que la subunidad ϵ tiene un rol en la actividad de ATPasa de varias enzimas bacterianas a través de su dominio C-terminal. Sin embargo, este dominio es el más variable entre las diferentes especies bacterianas (Zarco-Zavala et al., 2018).

Por lo tanto, existe evidencia de que no todas las subunidades ϵ preservan su función inhibitoria. Por ejemplo, la subunidad ϵ de *P. denitrificans* no es capaz de bloquear la rotación de la enzima por sí misma, por lo que se ha sugerido que la función inhibitoria se ha transferido a otra proteína que sirva como inhibidor tal y como ocurre con IF1 en la ATP sintasa mitocondrial (Morales-Ríos et al., 2010).

Cuando se llevó a cabo la caracterización tanto del complejo F_1F_0 -ATP sintasa como del sector F_1 de la α -proteobacteria *P. denitrificans*, se encontró la presencia de una sexta subunidad de 11 kDa asociada con F_1 además de las cinco subunidades canónicas descritas para este sector de la enzima (α , β , γ , δ , y ϵ) (Morales-Ríos et al., 2010). Aproximaciones experimentales posteriores llevaron a proponer a esta nueva subunidad (llamada ζ) como la responsable de llevar a cabo la inhibición de la hidrólisis de ATP a través de su dominio N-terminal. Esta hipótesis fue posteriormente confirmada al clonar el gen de esta subunidad en *E. coli*. y realizar una purificación de la proteína ζ recombinante, la cual se empleó para realizar ensayos de actividad de hidrólisis de ATP en partículas sub-bacterianas (SBP) y en el sector F_1 -ATPasa soluble en presencia de ATP-Mg (Morales-Ríos et al., 2010).

Los mecanismos de control de la hidrólisis de ATP basados en proteínas inhibitorias están ampliamente conservados entre las ATP sintasas de diferentes especies, no obstante, existen características particulares de cada uno de ellos, probablemente debido a un ajuste para regular sus funciones metabólicas en función de las demandas ambientales. Sin embargo, a pesar de estas diferencias, la zona de la interfaz $\alpha/\beta/\gamma$ donde estos inhibidores actúan es la misma en todos los casos. Estudios bioquímicos y de rotación de molécula única con mutantes han resaltado la importancia de un dominio de siete residuos de aminoácidos (motivo DELSEED) conservados en la subunidad β que participan en la inhibición de la rotación de la enzima (Mnatsakanyan et al., 2009; Sielaff et al., 2018). Por lo tanto, este dominio sirve como punto de anclaje para la unión del inhibidor a la región de la interfaz $\alpha/\beta/\gamma$.

Análisis de alineamiento de secuencia de las regiones inhibitorias mostraron similitud entre los dominios C-terminal de la subunidades ϵ de *E. coli*. y *Bacillus sp.* Por otro lado, la proteína IF1 y la subunidad ζ de *P. denitrificans*. que contienen la región inhibitoria en el dominio N-terminal, también presentaron alta similitud.

Estos resultados eran de esperarse y refuerzan la idea de que los mecanismos de control de la hidrólisis de ATP basados en proteínas inhibitorias se mantienen conservados a pesar de provenir de diferentes especies.

Aunque la evidencia experimental de que la subunidad δ mitocondrial (homóloga a la subunidad ϵ bacteriana) pueda funcionar como inhibidor es limitada (Grüber et al., 1994). En este trabajo se realizó una caracterización preliminar de esta subunidad apoyados del modelo generado por Cryo-EM de la enzima completa (Murphy et al., 2019) para encontrar alguna característica distintiva que le de sustento a la idea de que en el alga incolora *Polytomella sp.* esta subunidad podría estar funcionando como el inhibidor natural de la ATP sintasa.

Un estudio de sobreposición de estructuras entre la ATP sintasa de *Polytomella sp.* y el sector F_1 de la ATP sintasa mitocondrial del bovino *B. taurus*. reveló que esta subunidad tiene una extensión en la región N-terminal la cual no está presente en la misma subunidad de otros organismos. En un principio, se pensó que esta característica era única de este linaje de algas al igual que las extensiones existentes en la región N-terminal y C-terminal de las subunidades α y β respectivamente (Atteia et al., 1997). Sin embargo, al extender este análisis se encontró que la extensión de esta subunidad no pertenece a los dominios altamente conservados de superfamilia δ/ϵ F_1 -ATPasa, por lo tanto, no se encuentra presente en la enzima de la mayoría de los organismos representativos. No obstante, esta región N-terminal también se encuentra en la ATP sintasa mitocondrial de plantas superiores. Por lo tanto, sería interesante saber el papel que desempeña esta región de subunidad δ en el control de la enzima.

Alineamiento de secuencia de la subunidad δ mitocondrial de *Polytomella sp.* contra la subunidad ϵ de *E. coli* reveló que existe similitud entre estas dos subunidades, además la sobreposición de estructura entre las mismas subunidades demostró que el plegamiento de ambas es bastante similar. Por lo tanto, existe una ligera posibilidad que en *Polytomella sp.* la función de la inhibición de la hidrólisis de ATP la lleve a cabo la región N-terminal de la subunidad δ , en lugar de ser delegada a otro péptido como en el caso de IF1 de mitocondria de mamíferos o la subunidad ζ del α -proteobacteria *P. denitrificans*.

Para poder esclarecer si efectivamente la subunidad δ de la F₁-ATP sintasa de *Polytomella sp.* tiene un papel en el control de la actividad de hidrólisis de la enzima, se realizó una purificación “preliminar” de este sector. Para abordar la tarea de purificar la región F₁ de la F₁F₀-ATP sintasa mitocondrial empleamos dos estrategias experimentales, la primera partiendo de la enzima previamente purificada siguiendo el protocolo desarrollado en nuestro laboratorio (Vázquez-Acevedo et al., 2006), y la otra empleando el uso de SMPs generadas a partir de mitocondrias extraídas del alga.

Como ya se mencionó, la ATP sintasa del alga, puede ser aislada como un dímero de 1600 kDa y al igual que sucede con ésta enzima en otras especies, el dímero de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* forma un ángulo bastante marcado entre los dos sectores F₀ de cada monómero, el cual contribuyen a proporcionar curvatura y la morfología característica de las crestas de la membrana interna mitocondrial (Blum et al., 2019; Dudkina et al., 2006). Además, el hecho de que la enzima cuente con un brazo periférico altamente robusto, formado por 10 subunidades atípicas de origen evolutivo desconocido, le brinda a la enzima una gran estabilidad estructural (Murphy et al., 2019; Vázquez-Acevedo et al., 2006; Villavicencio-Queijeiro et al., 2009).

El tratamiento con concentraciones relativamente altas de algunos detergentes como el TDOC al 3 %, favorecen la disociación del dímero, permitiendo obtener una fracción enriquecida de la especie monomérica, la cual es mucho menos estable (Vázquez-Acevedo et al., 2006). Sin embargo, también se ha observado que la enzima permanece en forma de tetrámero o dímero aún a altas concentraciones de otros detergentes no iónicos como el LM (hasta una concentración del 10 %) o el detergente zwitteriónico CHAPS (hasta una concentración 2 %); ambos detergentes son comúnmente empleados en la solubilización de proteínas de membrana, ya que ayudan a la estabilización y permiten mantener la actividad de las proteínas. Quizá por esta razón, estos detergentes no promueven un desensamblaje de la ATP sintasa de *Polytomella sp.*, como si lo hace el TDOC, el cual es un surfactante derivado de sales biliares que disminuye la tensión superficial y al parecer afecta las interacciones que mantienen la estructura del dímero.

Por otro lado, cuando la F₁F₀-ATP sintasa purificada es sometida a incubación con alta temperatura por periodos de tiempo cortos, la enzima tiende a desensamblarse en monómeros y subsecuentemente se disocia formando dos subcomplejos; el sector F₁ donde reside el núcleo catalítico [$\beta_3/\alpha_3/\gamma/\delta/\epsilon$], el cual tiene una masa molecular aproximada de 400 kDa, y un subcomplejo de 200 kDa formado por las subunidades [ASA1/ASA3/ASA5/ASA8/a/c₁₀]. Por su parte, las subunidades ASA2, ASA4, ASA6, ASA7, ASA9, y OSCP se disocian de manera independiente (Vázquez-Acevedo et al., 2006).

Tomando en cuenta estos antecedentes, generamos un protocolo que nos permitiera obtener el sector F₁ a partir de la F₁F₀-ATP sintasa previamente monomerizada con detergente, aplicando un tratamiento de incubación con calor.

Como se puede apreciar en los geles de poliacrilamida azul nativos y de poliacrilamida-SDS (Figura 17) el protocolo de purificación de la enzima previamente reportado por nuestro grupo de trabajo es muy reproducible, y nos permite obtener una fracción altamente enriquecida en la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp.* en su forma dimérica, la cual prácticamente se encuentra libre de otros elementos de la CTE.

Una vez que tuvimos la enzima purificada, aplicamos la primera estrategia experimental para disociar el sector F₁ de la F₁F₀-ATP sintasa del alga. Al analizar en BN-PAGE y 2D la composición y la integridad de las subunidades de la preparación generada, (Figura 18) apreciamos que en geles nativos (BN-PAGE) se detecta una banda de 400 kDa, consistente con el peso molecular aproximado descrito para este sector en trabajos previos (Vázquez-Acevedo et al., 2006). Por otro lado, mediante electroforesis 2D, encontramos la presencia de las subunidades esperadas para dicho sector. No obstante, también se hizo evidente que en la preparación existe la presencia de subunidades libres que son disociadas debido al tratamiento al que fue sometida la enzima, mismas que son consideradas como contaminantes de la preparación de F₁.

Para llevar a cabo la purificación ulterior del sector F₁, se utilizó cromatografía de exclusión molecular. La muestra fue aplicada a una columna Superose 6 10/300 que separa masas moleculares entre 5 y 5000 kDa, lo que nos permite eliminar las subunidades libres que fueron disociadas por el tratamiento.

Las fracciones donde se encontraban las subunidades del sector F_1 fueron colectadas, concentradas y analizadas mediante electroforesis en condiciones nativas (Figura 19). Sin embargo, a pesar de que se detectó la presencia de una banda muy tenue de masa molecular aproximada de 400 kDa, el rendimiento obtenido fue mínimo comparado con la cantidad de proteína de la que partimos (Figura 25). Además, considerando que tenemos que purificar previamente la enzima en su forma dimérica, el proceso se vuelve tardado y poco eficiente, por lo cual, dificulta obtener una cantidad suficiente del sector F_1 que pueda ser empleada en pruebas bioquímicas posteriores.

Para resolver el problema de la baja eficiencia de recuperación del sector F_1 partiendo de F_1F_0 -ATP sintasa previamente purificada, implementamos otra estrategia experimental partiendo de SMP, generadas por sonicación de mitocondrias extraídas del alga, esto nos permitió obtener este sector de la enzima más rápidamente y con un mayor rendimiento.

El uso de estas SMP no es nuevo, muchos de los primeros trabajos bioquímicos que pretendían caracterizar a la ATP sintasa y los demás complejos mitocondriales, empleaban la generación de estas partículas para llevar a cabo diversos estudios, ya que así se puede tener acceso directo a la porción F_1 de la enzima, región donde reside el núcleo catalítico (Beltrán et al., 1984). Las SMP, además de exponer los sitios catalíticos de la ATP sintasa, cuentan con otras características que les brindan ventajas frente a mitocondrias aisladas y por esto han sido adoptadas como un sistema de estudio bioquímico para conocer aspectos de este organelo.

En una de las primeras caracterizaciones de las SMP extraídas de mitocondrias de corazón de bovino, se encontró que la actividad de hidrólisis de ATP aumenta de valores relativamente bajos ($0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) a valores mucho más altos ($7 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) después de incubar las muestras por 5-6 horas a 38°C . Este incremento en la actividad hidrolítica de la enzima no se debe al desensamble de F_1 de la membrana mitocondrial, sino a la transición de un estado inhibido a un estado activo, ya que estas SMP son sensibles a oligomicina, un inhibidor que actúa específicamente bloqueando el canal de protones de la fracción F_0 de la ATP sintasa (Beltrán et al., 1984).

Además de la incubación a altas temperatura, se ha reportado que la interacción de IF1 con la ATP sintasa mitocondrial se ve afectada por aniones y cationes. Cuando se evaluó el rol que juegan diferentes sales en la activación de la hidrólisis de SMP extraídas de mitocondrias de corazón de bovino, se encontró que su activación depende de la concentración de Tris-acetato en el cual las partículas son preincubadas; evidenciando que la máxima activación se da en presencia de 100 mM de esta sal. Las SMP también pueden ser activadas a niveles similares con Tris-HCl y Tris-SO₄. Por su parte, la activación casi insignificante de las SMP incubadas en Tris-acetato 1 mM, aumenta considerablemente agregando KCl o MgCl₂, a una concentración de 100 mM. Estos datos indican que las sales favorecen en gran medida la velocidad del proceso de activación. Sin embargo, no parece haber una selectividad especial para un anión o un catión dado, ya que no se encontraron diferencias significativas en el proceso de activación cuando las partículas se expusieron a diversas concentraciones de NaCl o KCl (Beltrán et al., 1984). Por lo tanto, el grado de activación de las SMP de corazón de bovino, depende no solo de la temperatura y el pH, sino también de la concentración de sales.

Otro ejemplo de este fenómeno se encuentra en las SMP generadas a partir de mitocondrias de levadura, las cuales al ser suspendidas en un amortiguador que contiene Tris-SO₄ (pH 8.5) promueve la liberación del péptido inhibidor de la enzima, derivando en una alta actividad específica. En contraste, las SMP que son suspendidas en presencia de ácido maleico (pH 6.0) preservan la unión de este inhibidor, lo que deriva en una baja actividad específica (Venard et al., 2003). Esta versatilidad hace que el sistema de SMP sea atractivo para tratar de responder preguntas asociadas con la actividad y la regulación de la enzima.

Otra característica que presentan las SMP generadas a partir de mitocondrias, en este caso de hígado de rata, es la de tener una gran estabilidad al ser sometidas a ciclos de congelación y descongelación. Si estas preparaciones son almacenadas en una solución concentrada de sacarosa y se suspenden en medio fresco antes de realizar ensayos de oximetría, se encuentra que retienen entre el 80-90% de la fosforilación oxidativa original. Además esta actividad permanece durante al menos 5 ciclos de congelación/descongelación o en almacenamiento a -20 °C durante 1 mes (Gregg, 1967).

Los diferentes protocolos que existen para generar SMP están basados en dos métodos. El primero de ellos es la solubilización de mitocondrias con detergentes suaves no iónicos como la digitonina, y el otro es la generación de SMP mediante sonicación drástica por periodos cortos de tiempo.

Las preparaciones de SMP que obtuvimos a partir de mitocondrias extraídas del alga mediante sonicación drástica se encontraban acopladas, ya que éstas presentaron una transición del estado 3 al estado 4 con la adición de ADP empleando NADH como sustrato, mostrando que sus membranas fueron nuevamente selladas después de la sonicación (Figura 21). Es importante mencionar que el hecho de que la CTE esté acoplada en estas preparaciones nos da la pauta para una posible caracterización bioquímica ulterior de las SMP del alga.

La liberación de F_1 de la membrana interna mitocondrial por la adición de cloroformo es bastante específica y por esta razón se ha empleado desde hace varios años en la purificación de la ATP sintasa de diversos organismos (Beechey et al., 1975; Gahura et al., 2018; Pullman y Monroy, 1963; Varghese et al., 2018; Walker et al., 1985). En trabajos donde se evaluó la capacidad de otros agentes para liberar este sector de la membrana interna mitocondrial no tuvieron éxito. Solventes como dietiléter, di-isopropil-éter, tetracloruro de carbono, acetato de etilo, acetato de butilo, butan-1-ol y n-pentano no logran disociar una ATPasa activa de la membrana. La liberación de la F_1 -ATPasa por cloroformo, es una técnica bastante sensible a condiciones como el pH o la presencia de algunos componentes en el amortiguador donde son suspendidas las SMP antes del tratamiento con el solvente (Beechey et al., 1975). Cuando se analizó la liberación de F_1 de bovino en un rango de pH que va de 6-9, los autores del citado estudio encontraron que la F_1 liberada con cloroformo, solo es el 20 %, comparada con la cantidad que se logra solubilizar a un pH de 7.6. Para obtener el máximo rendimiento de extracción de F_1 -ATPasa, la suspensión de SMP debe encontrarse a un pH de 7.6 para garantizar la liberación óptima del sector soluble de la membrana.

La composición del medio en el cual las SMP de corazón de *B. taurus* son suspendidas, afectan la cantidad y la actividad específica de la F_1 -ATPasa solubilizada. El rendimiento y la actividad específica más alta de la enzima de bovino se obtuvo cuando fue solubilizada solo en presencia de EDTA, ya que la combinación de ATP y EDTA genera liberación de F_1

con un bajo rendimiento y una alta actividad específica, mientras que la adición de ADP y/o Pi resulta en un bajo rendimiento y una baja actividad específica de la enzima (Beechey et al., 1975). Tomando en cuenta lo anterior decidimos resuspender la SMP del alga en un amortiguador de sacarosa/Tris/EDTA a un pH de 7.6 antes de realizar la extracción con cloroformo.

La liberación de F_1 de la membrana de SMP del alga resultó ser eficiente, ya que al analizar las muestras por electroforesis en condiciones nativas, se encontró la presencia de una banda de 400 kDa, lo cual concuerda con la masa molecular esperada para este sector. Al analizar las muestras mediante una electroforesis 2D, se hizo evidente que la preparación del sector liberado con cloroformo cuenta con todas las subunidades que se esperan para la F_1 .

En algunos trabajos, una vez que se realizó la extracción con cloroformo, el sector F_1 -ATPasa fue sometido a cromatografía, ya sea de intercambio iónico, de exclusión molecular o ambas, para purificar ulteriormente la enzima (Gahura et al., 2018; Varghese et al., 2018; Walker et al., 1985). Como este método preserva todas las subunidades del sector catalítico de la enzima, es posible realizar estudios tanto estructurales como bioquímicos de estas preparaciones.

En un primer intento para una mayor purificación del sector F_1 realizamos una cromatografía de exclusión molecular en una columna Superose 6 10/300 que separa proteínas con una masa molecular entre 5-5000 kDa, la misma que se empleó después del tratamiento con detergente y calor. Sin embargo, a pesar de que el perfil cromatográfico arrojó un pico bien definido, cuando se analizaron los patrones polipeptídicos de las fracciones mediante SDS-PAGE, además de encontrar las bandas de las subunidades esperadas, también se encontró la presencia de una banda con un peso similar a γ , la cual en un principio pensamos que era una contaminación o una degradación del complejo F_1 . No obstante, al analizar los geles 2D con más detenimiento, resalta el hecho de que en algunas extracciones esta banda de peso similar a γ está presente y en otras no, planteando la duda de si es realmente una degradación, un contaminante o un péptido novedoso que se encuentra unido al núcleo catalítico y que no ha sido previamente descrito. Sin duda, este aspecto amerita ser explorado más ampliamente, para encontrar en qué condiciones este péptido permanece unido al sector F_1 y cuál podría ser su función.

En un estudio reciente se purificó la F_1 -ATPasa del parásito *Trypanosoma brucei*, utilizando el mismo sistema de SMP generadas por sonicación a partir de mitocondrias, y la posterior liberación del sector con cloroformo. En esta preparación se encontraron subunidades novedosas que están unidas a las subunidades α que fueron denominadas p18. Curiosamente, a pesar que este sector había sido extraído y caracterizado desde inicio de la década de los 90 como un complejo activo, la subunidad había pasado desapercibida y originalmente se interpretó como un contaminante abundante proveniente del sector F_0 de la ATP sintasa del parásito (Gahura et al., 2018).

Como había sido descrito en trabajos previos, la ATP sintasa del alga *Polytomella sp.* tiene una actividad hidrolítica muy baja comparada con la actividad descrita para la enzima de otras especies, no obstante, esta actividad puede incrementarse con algunos tratamientos como la adición de detergentes o incubación a altas temperaturas (Beltrán et al., 1984; Gahura et al., 2018; Villavicencio-Queijeiro et al., 2015)

A pesar de que se han planteado algunas hipótesis para explicar el aumento de la actividad en la enzima del alga, aún no hemos podido dilucidar qué es lo que promueve el incremento de la actividad hidrolítica de la enzima; en un principio se propuso que esta activación se debía a la liberación del sector F_1 del complejo lo que deriva en la entrada de ATP a los sitios catalíticos para ser hidrolizados. Sin embargo, aunque las dos preparaciones de F_1 cuentan con todas las subunidades características del sector, la actividad enzimática que presentan no es mucho mayor que la actividad hidrolítica que presenta la F_1F_0 -ATP sintasa dimérica.

Por otro lado, la actividad hidrolítica de las preparaciones generadas mediante nuestras estrategias experimentales es muy baja, comparada con una preparación en la que el sector F_1 se disocia incubando la enzima con alta temperatura por tiempo corto (60°C , 2 min) (Figura 24d). Cuando las 3 preparaciones se analizan mediante electroforesis 2D, todas ellas cuentan con las mismas subunidades canónicas del sector F_1 (Figura 24 a, b y c). Por lo tanto, saber qué sucede en el sector catalítico de la enzima para que presente un aumento considerable en su actividad hidrolítica cuando se incuba a 60°C por 2 minutos, sigue siendo una pregunta abierta.

Estos resultados podrían explicarse si tomamos en cuenta que una de las condiciones que promueve cambios conformacionales en la subunidad ϵ de *E. coli* son los contactos entre la región F_0 y F_1 de la enzima. Por ejemplo, cuando se realizan preparaciones del sector F_1 aislado, más del 90 % del complejo se encuentra típicamente con la subunidad ϵ en un estado inhibido, mientras la extracción del complejo enzimático completo F_1F_0 típicamente muestra alrededor del 50 % de ϵ en su estado inhibido (Sielaff et al., 2018). Si extrapolamos estos resultados a nuestras preparaciones de F_1 se inferiría que algo similar podría estar ocurriendo y que al liberar el sector F_1 por cualquiera de los dos métodos descritos favoreceríamos el aislamiento de dicho sector en un estado inhibido. Sin embargo, no contamos con evidencia experimental que compruebe dicha aseveración por lo cual, encontrar alguna condición experimental que permita observar un aumento en la actividad hidrolítica del sector F_1 aislado de *Polytomella sp.* podría apoyar esta idea.

En resumen, ambas estrategias experimentales permiten obtener un sector F_1 que cuenta con las subunidades clásicas [$\beta/\alpha/\gamma/\delta/\epsilon$] que normalmente se encuentran presentes en todas las ATP sintasas descritas a la fecha (Colina-Tenorio et al., 2018). Sin embargo, debido al número de pasos, tiempo invertido y rendimiento del procedimiento, pensamos que vale la pena intentar conseguir una purificación ulterior del sector F_1 liberado a partir de SMP con cloroformo, mediante la utilización de alguna otra matriz cromatográfica, como la aminohexil Sefarosa la cual es capaz de unir al sector F_1 (Atteia et al., 1997), lo que nos permitiría obtener una preparación de alta pureza, que nos ayudaría a dilucidar el posible papel de la subunidad δ en el control de la actividad hidrolítica.

10. Conclusión

Como se observa en la primera parte de este trabajo la subunidad δ de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp.*, presenta una extensión en la región N-terminal que está presente en organismos pertenecientes al género de algas verdes y además también se encuentra en la ATP sintasa mitocondrial de algunas plantas. Por otro lado, esta región N-terminal no se encuentra en la enzima mitocondrial de organismos modelos, y no pertenece a la región altamente conservada de esta familia de subunidades δ mitocondriales. Por lo tanto, no descartamos la posibilidad de que esta región N-terminal podría estar jugando un papel importante en la regulación de la actividad hidrolítica de la enzima no solo en este linaje de algas sino también en la regulación de la sintasa mitocondrial de plantas superiores. Sin embargo, esto debe ser confirmado por aproximaciones experimentales que permitan dilucidar el papel de esta extensión en la cinética de la enzima.

Obtener una buena purificación del sector F_1 de la enzima que sea homogéneo y libre de otros contaminantes es un paso clave para explicar aspectos que siguen sin ser aclarados. En este trabajo demostramos que ambas estrategias experimentales pueden dar una buena pauta para la purificación del sector catalítico de la enzima, sin embargo, a pesar de que las subunidades canónicas de F_1 se encuentran presentes en ambas preparaciones, la cantidad de proteína que se recupera de la primer estrategia (TDOC y calor, partiendo de la enzima pura) es mínima, además de ser un proceso bastante laborioso, ya que previamente hay que purificar la forma dimérica de la enzima. Dado que esta técnica tiene un rendimiento bastante pobre, no es viable obtener grandes cantidades del sector F_1 crudo que puedan ser empleados en procesos de purificación ulterior o en ensayos bioquímicos que requieran un alta pureza de la enzima. Por otro lado, el protocolo que adaptamos para generar SMP y posteriormente liberar al sector F_1 mediante tratamiento con cloroformo, mostró tener alto rendimiento y presenta la ventaja de que el número de pasos para llegar al objetivo es mucho menor que con el primer protocolo utilizado, sin embargo, aún es necesario limpiar la preparación de contaminantes remanentes, para poder llevar a cabo ensayos bioquímicos posteriores que permitan obtener resultados confiables.

11. Bibliografía

Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., and Walker, J.E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621–628.

Acin-Perez, R., and Enriquez, J.A. (2014). The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1837**, 444–450.

Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M.L., Pérez-Martos, A., and Enriquez, J.A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* **32**, 529–539.

Aggeler, R., and Capaldi, R.A. (1996). Nucleotide-dependent movement of the epsilon subunit between alpha and beta subunits in the *Escherichia coli* F₁F₀-type ATPase. *J Biol Chem* **271**, 13888–13891.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (Garland Science).

Atteia, A., Dreyfus, G., and González-Halphen, D. (1997). Characterization of the alpha and beta-subunits of the F₀F₁-ATPase from the alga *Polytomella* spp., a colorless relative of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* **1320**, 275–284.

Bason, J.V., Runswick, M.J., Fearnley, I.M., and Walker, J.E. (2011). Binding of the inhibitor protein IF(1) to bovine F(1)-ATPase. *J. Mol. Biol.* **406**, 443–453.

Beechey, R.B., Hubbard, S.A., Linnett, P.E., Mitchell, A.D., and Munn, E.A. (1975). A simple and rapid method for the preparation of adenosine triphosphatase from submitochondrial particles. *Biochem. J.* **148**, 533–537.

Beltrán, C., Gómez-Puyou, M.T. de, Gómez-Puyou, A., and Darszon, A. (1984). Release of the inhibitory action of the natural ATPase inhibitor protein on the mitochondrial ATPase. *European Journal of Biochemistry* **144**, 151–157.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. Biochemistry. 5th Edition.

Blum, T.B., Hahn, A., Meier, T., Davies, K.M., and Kühlbrandt, W. (2019). Dimers of mitochondrial ATP synthase induce membrane curvature and self-assemble into rows. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 4250–4255.

Boreikaite, V., Wicky, B.I.M., Watt, I.N., Clarke, J., and Walker, J.E. (2019). Extrinsic conditions influence the self-association and structure of IF1, the regulatory protein of mitochondrial ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 10354–10359.

Boyer, P.D. (1993). The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. *Biochim. Biophys. Acta* **1140**, 215–250.

Boyer, P.D. (2002). Catalytic site occupancy during ATP synthase catalysis. *FEBS Letters* **512**, 29–32.

Colina-Tenorio, L., Dautant, A., Miranda-Astudillo, H., Giraud, M.-F., and González-Halphen, D. (2018). The Peripheral Stalk of Rotary ATPases. *Front Physiol* **9**, 1243.

- Degli Esposti, M. (2014). Bioenergetic Evolution in Proteobacteria and Mitochondria. *Genome Biol Evol* 6, 3238–3251.
- Degli Esposti, M., Chouaia, B., Comandatore, F., Crotti, E., Sasser, D., Lievens, P.M.-J., Daffonchio, D., and Bandi, C. (2014). Evolution of Mitochondria Reconstructed from the Energy Metabolism of Living Bacteria. *PLoS One* 9.
- Dudkina, N.V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E.J., and Braun, H.-P. (2005). Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3225–3229.
- Dudkina, N.V., Sunderhaus, S., Braun, H.-P., and Boekema, E.J. (2006). Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett.* 580, 3427–3432.
- Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Stairs, C.W., and Ettema, T.J.G. (2017). Archaea and the origin of eukaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 711–723.
- Figuroa-Martinez, F., Nedelcu, A.M., Smith, D.R., and Reyes-Prieto, A. (2015). When the lights go out: the evolutionary fate of free-living colorless green algae. *New Phytol* 206, 972–982.
- Friedman, J.R., and Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature* 505, 335–343.
- Gahura, O., Šubrtová, K., Váchová, H., Panicucci, B., Fearnley, I.M., Harbour, M.E., Walker, J.E., and Zíková, A. (2018). The F1 -ATPase from *Trypanosoma brucei* is elaborated by three copies of an additional p18-subunit. *FEBS J.* 285, 614–628.
- García-Aguilar, A., and Cuezva, J.M. (2018). A Review of the Inhibition of the Mitochondrial ATP Synthase by IF1 in vivo: Reprogramming Energy Metabolism and Inducing Mitohormesis. *Front Physiol* 9.
- García-Bermúdez, 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.
- Giorgi, C., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Marchi, S., Missiroli, S., Patergnani, S., Poletti, F., Rimessi, A., et al. (2012). Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine. *Mitochondrion* 12, 77–85.
- Gogol, E.P., Johnston, E., Aggeler, R., and Capaldi, R.A. (1990). Ligand-dependent structural variations in *Escherichia coli* F1 ATPase revealed by cryoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9585–9589.
- Green, D.R., and Kroemer, G. (2004). The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science* 305, 626–629.
- Gregg, C.T. (1967). [33] Preparation and assay of phosphorylating submitochondrial particles: Particles from rat liver prepared by drastic sonication. In *Methods in Enzymology*, (Academic Press), pp. 181–185.

- Grüber, G., Godovac-Zimmermann, J., and Nawroth, T. (1994). ATP synthesis and hydrolysis of the ATP-synthase from *Micrococcus luteus* regulated by an inhibitor subunit and membrane energization. *Biochim. Biophys. Acta* *1186*, 43–51.
- Guo, H., and Rubinstein, J.L. (2018). Cryo-EM of ATP synthases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *52*, 71–79.
- Guo, H., Suzuki, T., and Rubinstein, J.L. (2019). Structure of a bacterial ATP synthase. *Elife* *8*.
- Guo, R., Gu, J., Zong, S., Wu, M., and Yang, M. (2018). Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. *Biomed J* *41*, 9–20.
- Hackenbrock, C.R., Chazotte, B., and Gupte, S.S. (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* *18*, 331–368.
- Hatefi, Y. (1985). The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorylation System. *Annual Review of Biochemistry* *54*, 1015–1069.
- Iino, R., Hasegawa, R., Tabata, K.V., and Noji, H. (2009). Mechanism of Inhibition by C-terminal α -Helices of the ϵ Subunit of *Escherichia coli* FoF1-ATP Synthase. *J Biol Chem* *284*, 17457–17464.
- Jiménez-Suárez, A., Vázquez-Acevedo, M., Rojas-Hernández, A., Funes, S., Uribe-Carvajal, S., and González-Halphen, D. (2012). In *Polytomella* sp. mitochondria, biogenesis of the heterodimeric COX2 subunit of cytochrome c oxidase requires two different import pathways. *Biochim. Biophys. Acta* *1817*, 819–827.
- Kühlbrandt, W. (2019). Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases. *Annu. Rev. Biochem.* *88*, 515–549.
- Lang, B.F., Seif, E., Gray, M.W., O’Kelly, C.J., and Burger, G. (1999). A comparative genomics approach to the evolution of eukaryotes and their mitochondria. *J. Eukaryot. Microbiol.* *46*, 320–326.
- Lapaille, M., Escobar-Ramírez, A., Degand, H., Baurain, D., Rodríguez-Salinas, E., Coosemans, N., Boutry, M., Gonzalez-Halphen, D., Remacle, C., and Cardol, P. (2010). Atypical subunit composition of the chlorophycean mitochondrial F1FO-ATP synthase and role of Asa7 protein in stability and oligomycin resistance of the enzyme. *Mol. Biol. Evol.* *27*, 1630–1644.
- Lapashina, A.S., and Feniouk, B.A. (2018). ADP-Inhibition of H⁺-FOF1-ATP Synthase. *Biochemistry Mosc.* *83*, 1141–1160.
- Lenaz, G. (2001). A critical appraisal of the mitochondrial coenzyme Q pool. *FEBS Lett* *509*, 151–155.
- Lenaz, G., and Genova, M.L. (2007). Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *Am J Physiol Cell Physiol* *292*, C1221-1239.
- Leslie, A.G., and Walker, J.E. (2000). Structural model of F1-ATPase and the implications for rotary catalysis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* *355*, 465–471.

- Li, R.J., Zhang, G.S., Chen, Y.H., Zhu, J.F., Lu, Q.J., Gong, F.J., and Kuang, W.Y. (2010). Down-regulation of mitochondrial ATPase by hypermethylation mechanism in chronic myeloid leukemia is associated with multidrug resistance. *Annals of Oncology* 21, 1506–1514.
- van Lis, R., González-Halphen, D., and Atteia, A. (2005). Divergence of the mitochondrial electron transport chains from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its colorless close relative *Polytomella* sp. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1708, 23–34.
- van Lis, R., Mendoza-Hernández, G., Groth, G., and Atteia, A. (2007). New insights into the unique structure of the FOF1-ATP synthase from the chlamydomonad algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 144, 1190–1199.
- Little, P.A., Oleson, J.J., and Williams, J.H. (1951). Growth studies on *Polytomella agilis*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 78, 510–513.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000). *Electron Transport and Oxidative Phosphorylation*. *Molecular Cell Biology*. 4th Edition.
- López-García, P., and Moreira, D. (1999). Metabolic symbiosis at the origin of eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 24, 88–93.
- López-García, P., and Moreira, D. (2020). The Syntrophy hypothesis for the origin of eukaryotes revisited. *Nature Microbiology* 5, 655–667.
- Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L., and Tolbert, N.E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry* 87, 206–210.
- Martin, W., and Müller, M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature (London)* 392, 37–41.
- Miranda-Astudillo, H., Cano-Estrada, A., Vázquez-Acevedo, M., Colina-Tenorio, L., Downie-Velasco, A., Cardol, P., Remacle, C., Domínguez-Ramírez, L., and González-Halphen, D. (2014). Interactions of subunits Asa2, Asa4 and Asa7 in the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of the chlorophycean alga *Polytomella* sp. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 1–13.
- Miranda-Astudillo, H., Colina-Tenorio, L., Jiménez-Suárez, A., Vázquez-Acevedo, M., Salin, B., Giraud, M.-F., Remacle, C., Cardol, P., and González-Halphen, D. (2018). Oxidative phosphorylation supercomplexes and respirasome reconstitution of the colorless alga *Polytomella* sp. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1859, 434–444.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144–148.
- Mnatsakanyan, N., Krishnakumar, A.M., Suzuki, T., and Weber, J. (2009). The Role of the β DELSEED-loop of ATP Synthase. *J Biol Chem* 284, 11336–11345.

Morales-Ríos, E., de la Rosa-Morales, F., Mendoza-Hernández, G., Rodríguez-Zavala, J.S., Celis, H., Zarco-Zavala, M., and García-Trejo, J.J. (2010). A novel 11-kDa inhibitory subunit in the F1FO ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related alpha-proteobacteria. *FASEB J.* *24*, 599–608.

Moreira, null, and Lopez-Garcia, null (1998). Symbiosis between methanogenic archaea and delta-proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis. *J Mol Evol* *47*, 517–530.

Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* *417*, 1–13.

Murphy, B.J., Klusch, N., Langer, J., Mills, D.J., Yildiz, Ö., and Kühlbrandt, W. (2019). Rotary substates of mitochondrial ATP synthase reveal the basis of flexible F1-Fo coupling. *Science* *364*.

Neupane, P., Bhujju, S., Thapa, N., and Bhattarai, H.K. (2019). ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition. *Biomol Concepts* *10*, 1–10.

Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., and Kinoshita, K. (1997). Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature* *386*, 299–302.

Priesnitz, C., and Becker, T. (2018). Pathways to balance mitochondrial translation and protein import. *Genes Dev.* *32*, 1285–1296.

Pullman, M.E., and Monroy, G.C. (1963). A NATURALLY OCCURRING INHIBITOR OF MITOCHONDRIAL ADENOSINE TRIPHOSPHATASE. *J. Biol. Chem.* *238*, 3762–3769.

Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A., and Racker, E. (1960). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* *235*, 3322–3329.

Rich, P.R. (1984). Electron and proton transfers through quinones and cytochrome bc complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics* *768*, 53–79.

Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* *14*, 255–274.

Sánchez-Vásquez, L., Vázquez-Acevedo, M., de la Mora, J., Vega-deLuna, F., Cardol, P., Remacle, C., Dreyfus, G., and González-Halphen, D. (2017). Near-neighbor interactions of the membrane-embedded subunits of the mitochondrial ATP synthase of a chlorophycean alga. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* *1858*, 497–509.

Schägger, H., and von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* *199*, 223–231.

Schägger, H., and Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* *19*, 1777–1783.

Schägger, H., Cramer, W.A., and von Jagow, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* *217*, 220–230.

- Sekiya, M., Hosokawa, H., Nakanishi-Matsui, M., Al-Shawi, M.K., Nakamoto, R.K., and Futai, M. (2010). Single molecule behavior of inhibited and active states of Escherichia coli ATP synthase F1 rotation. *J Biol Chem* 285, 42058–42067.
- Sielaff, H., Duncan, T.M., and Börsch, M. (2018). The regulatory subunit ϵ in Escherichia coli FOF1-ATP synthase. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1859, 775–788.
- Smith, D.R., Hua, J., and Lee, R.W. (2010). Evolution of linear mitochondrial DNA in three known lineages of Polytomella. *Curr. Genet.* 56, 427–438.
- Stehling, O., Wilbrecht, C., and Lill, R. (2014). Mitochondrial iron–sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie* 100, 61–77.
- Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B., and Schägger, H. (2004). Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in Paracoccus denitrificans. *J Biol Chem* 279, 5000–5007.
- Varghese, F., Blaza, J.N., Jones, A.J.Y., Jarman, O.D., and Hirst, J. (2018). Deleting the IF1-like ζ subunit from Paracoccus denitrificans ATP synthase is not sufficient to activate ATP hydrolysis. *Open Biol* 8.
- Vázquez-Acevedo, M., Cardol, P., Cano-Estrada, A., Lapaille, M., Remacle, C., and González-Halphen, D. (2006). The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *J. Bioenerg. Biomembr.* 38, 271–282.
- Vellai, T., Takács, K., and Vida, G. (1998). A new aspect to the origin and evolution of eukaryotes. *J Mol Evol* 46, 499–507.
- Venard, R., Brèthes, D., Giraud, M.-F., Vaillier, J., Velours, J., and Haraux, F. (2003). Investigation of the role and mechanism of IF1 and STF1 proteins, twin inhibitory peptides which interact with the yeast mitochondrial ATP synthase. *Biochemistry* 42, 7626–7636.
- Villavicencio-Queijeiro, A., Vázquez-Acevedo, M., Cano-Estrada, A., Zarco-Zavala, M., Tuena de Gómez, M., Mignaco, J.A., Freire, M.M., Scofano, H.M., Foguel, D., Cardol, P., et al. (2009). The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of Polytomella sp. is dimeric. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41, 1–13.
- Villavicencio-Queijeiro, A., Pardo, J.P., and González-Halphen, D. (2015). Kinetic and hysteretic behavior of ATP hydrolysis of the highly stable dimeric ATP synthase of Polytomella sp. *Arch. Biochem. Biophys.* 575, 30–37.
- Walker, J.E., Fearnley, I.M., Gay, N.J., Gibson, B.W., Northrop, F.D., Powell, S.J., Runswick, M.J., Saraste, M., and Tybulewicz, V.L. (1985). Primary structure and subunit stoichiometry of F1-ATPase from bovine mitochondria. *J. Mol. Biol.* 184, 677–701.
- Wang, Z., and Wu, M. (2015). An integrated phylogenomic approach toward pinpointing the origin of mitochondria. *Sci Rep* 5.

Zarco-Zavala, M., Mendoza-Hoffmann, F., and García-Trejo, J.J. (2018). Unidirectional regulation of the F₁F₀-ATP synthase nanomotor by the ζ pawl-ratchet inhibitor protein of *Paracoccus denitrificans* and related α -proteobacteria. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* *1859*, 762–774.

Zhao, R.-Z., Jiang, S., Zhang, L., and Yu, Z.-B. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med* *44*, 3–15.