



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**MECANISMOS NATURALES DE INHIBICIÓN Y CONTROL DE
LA ROTACIÓN DE LA ATP SINTASA**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JUAN MANUEL SÁNCHEZ CONTRERAS



Ciudad Universitaria, CDMX

2017



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: DRA.REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND

VOCAL: Profesor: Q.F.B. RUTH EDITH MARTIN FUENTES

SECRETARIO: Profesor: DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO

1er. SUPLENTE: Profesor:M.C. MARTHA GILES GÓMEZ

2° SUPLENTE: Profesor: M.C.B. SARA MARGARITA GARZA AGUILAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 206, EDIFICIO F, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO

SUSTENTANTE: JUAN MANUEL SÁNCHEZ CONTRERAS

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	4
LISTA DE FIGURAS	6
OBJETIVO GENERAL	7
INTRODUCCIÓN	8
Cadena Respiratoria y función de la ATP sintasa	11
Estructura de la ATP sintasa	13
Absorción y transformación primaria de energía la fotofosforilación oxidativa	16
La fosforilación oxidativa para formar ATP en bacterias y mitocondrias	17
REGULACIÓN DE LA ATP SINTASA	30
INHIBIDORES NATURALES DE LA ENZIMA EN BACTERIAS	37
Inhibidores (ζ y ϵ)	37
ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PROTEINA INHIBIDORA DE LA F_1F_0 - ATPasa MITOCONDRIAL (IF_1)	43
PAPEL DE LA IF_1 EN LA DIMERIZACIÓN DE LA ATP SINTASA MITOCONDRIAL	55
PAPEL DE LA IF_1 EN LA FISIOLÓGÍA CELULAR Y EN CONDICIONES PATOLÓGICAS COMO EL CÁNCER	57
EFFECTOS DEL INHIBIDOR IF_1 EN LA MITOCONDRIA DE LA CÉLULA CANCERÍGENA	62
CONCLUSIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
Å	Angström unidad de medida equivalente a 1×10^{-10} m
A-ATPasas	ATPasas en arqueas
A6L	Subunidad Membranal de ATP Sintasa en Eucariontes
ADP	Adenosina Difosfato
ADNmt	ADN mitocondrial
AMP	Adenosina Monofosfato
ANT	Adenín Nucleótidos
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca ²⁺	Calcio
CYTB6F	Citocromo
Dapit	Proteína asociada a la diabetes en tejidos sensibles a la insulina
DELSEED	Región conservada de la subunidad beta
F-ATPasa	Enzima de más de 8 subunidades, presente en cloroplastos y mitocondrias
F ₁ F ₀	Complejo enzimático F ₀ F ₁ de ATP sintasa
F ₀	Subunidad de la ATP Sintasa con sensibilidad al antibiótico oligomicina
F ₁	Dominio Catalítico de la ATP Sintasa compuesto por seis subunidades
H ⁺	Ión Hidronio
HCC	Carcinogénesis hepatocelular
HepG2	Línea celular que presenta carcinogénesis en Hígado
IF ₁	Factor Inhibidor de Hidrólisis de ATP en eucariontes complejos
IF ₁ -KO	Knock-out genético del inhibidor IF ₁

kDa		Kilodaltones
Mg ²⁺		Magnesio
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada	
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida	
Pi		Fosfato inorgánico
PSI		Fotosistema I
PSII		Fotosistema II
OSCP	Proteína eucariótica del inglés "Oligomycin Sensitivity Conferring Protein"	
OXPPOS		Acrónimo del inglés Oxidative Phosphorylation
RMN		Resonancia Magnética Nuclear
ROS		Especies reactivas de Oxígeno
PGC-1α	Co-activador transcripcional implicado en biogénesis mitocondrial	
SU6	Proteína del núcleo Fo en Levadura codificada por el ADN mitocondrial	
SU8	Proteína del núcleo Fo en Levadura codificada por el ADN mitocondrial	
SU9	Proteína del núcleo Fo en Levadura codificada por el ADN mitocondrial	
V-ATPasas		ATPasas Vacuolares en cloroplastos

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO
1.	Peter Mitchell, Premio Nobel de Química por proponer y demostrar la Teoría Quimiosmótica
2.	Primeras imágenes del sector F_1 de la ATP sintasa
3.	Molécula de ATP
4.	Estructura de la ATP Sintasa
5.	Cuadro comparativo de las subunidades de la ATP sintasa en distintas especies.
6.	Estructura de la F_1 -ATPasa bacteriana y conformeros de la subunidad ϵ
7.	Estructura y sitio de unión de la subunidad ζ de <i>Paracoccus denitrificans</i>
8.	Secuencia y estados de agregación de la IF_1 mitocondrial
9.	Sitio de entrada y unión inhibitoria de la IF_1 en la enzima mitocondrial.
10.	Proteína inhibidora de la F_1F_0 - ATPasa mitocondrial (IF_1)
11.	Comparación de la enzima ATP sintasa bacteriana y mitocondrial
12.	Respuesta celular de IF_1 en condiciones patológicas como carcinogénesis.

OBJETIVO GENERAL

- **Revisión y actualización de la literatura, de la estructura funcionamiento y regulación de la ATP sintasa.**

OBJETIVOS PARTICULARES

- **Describir el origen, descubrimiento y definición de la función de la ATP sintasa como fuente de energía vital.**
- **Resumir y actualizar el mecanismo catalítico y de acoplamiento de la ATP sintasa.**
- **Describir los mecanismos de regulación de la enzima por proteínas inhibidoras naturales**
- **Revisar y documentar el comportamiento de la ATP sintasa y sus subunidades, en condiciones patológicas particulares como cáncer.**

INTRODUCCIÓN

Descubrimiento de la ATP sintasa y la Teoría Quimiosmótica

La generación de energía en metabolismo celular siempre fue un tema de gran relevancia en la bioquímica. Un ejemplo de ello es la teoría Quimiosmótica enunciada por Peter Mitchell, la cual explica como la energía derivada del transporte de electrones por la cadena de transporte de electrones se utiliza para producir ATP a partir de ADP y Pi (Mitchell, 1961). En el caso de la bomba de protones mitocondrial, el transporte de electrones está acoplado al transporte de H⁺ a través de la membrana interna mitocondrial desde el espacio intermembranal. Este proceso crea simultáneamente, a través de la membrana interna mitocondrial, un gradiente eléctrico (con más cargas positivas en el exterior de la membrana que en la matriz mitocondrial) y un gradiente de pH (el exterior de la membrana está a un pH más ácido que el interior). La energía generada por este gradiente es suficiente para realizar la síntesis del ATP (Racker, 1980).

Como se describe más adelante, a principios de 1960 diversos investigadores se interesaron por el tema del metabolismo celular y la función que realizaban las enzimas en torno a la fase de la llamada fosforilación oxidativa que se realizaba en la membrana de la mitocondria, aunque no se conocía el mecanismo (Junge y Nelson,2015).

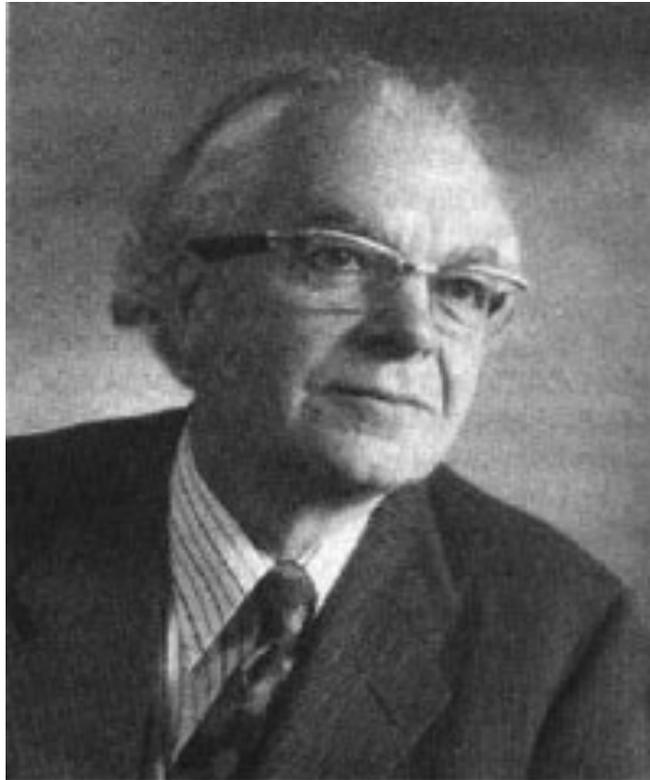


Figura 1. Peter Mitchell, investigador y bioquímico británico, autor de la Teoría Quimiosmótica, cuyo trabajo le concedió el Premio Nobel de Química en el año de 1978. (Fotografía tomada de Antony Crofts) (Obituary, *Photosynthesis Research*, Antony Crofts, June 29th. 1992)

En el año de 1960 un equipo comprendido por el bioquímico Efraím Racker, y Maynard Pullman entre otros, realizaron diversos experimentos utilizando la centrifugación y aislamiento de un compuesto que a la larga sería el denominado F_1 . Este factor F_1 se une al sector conocido como F_0 en la membrana interna mitocondrial, el sector F_0 fue nombrado así porque se encontró que era sensible y sitio de unión para el inhibidor oligomicina.

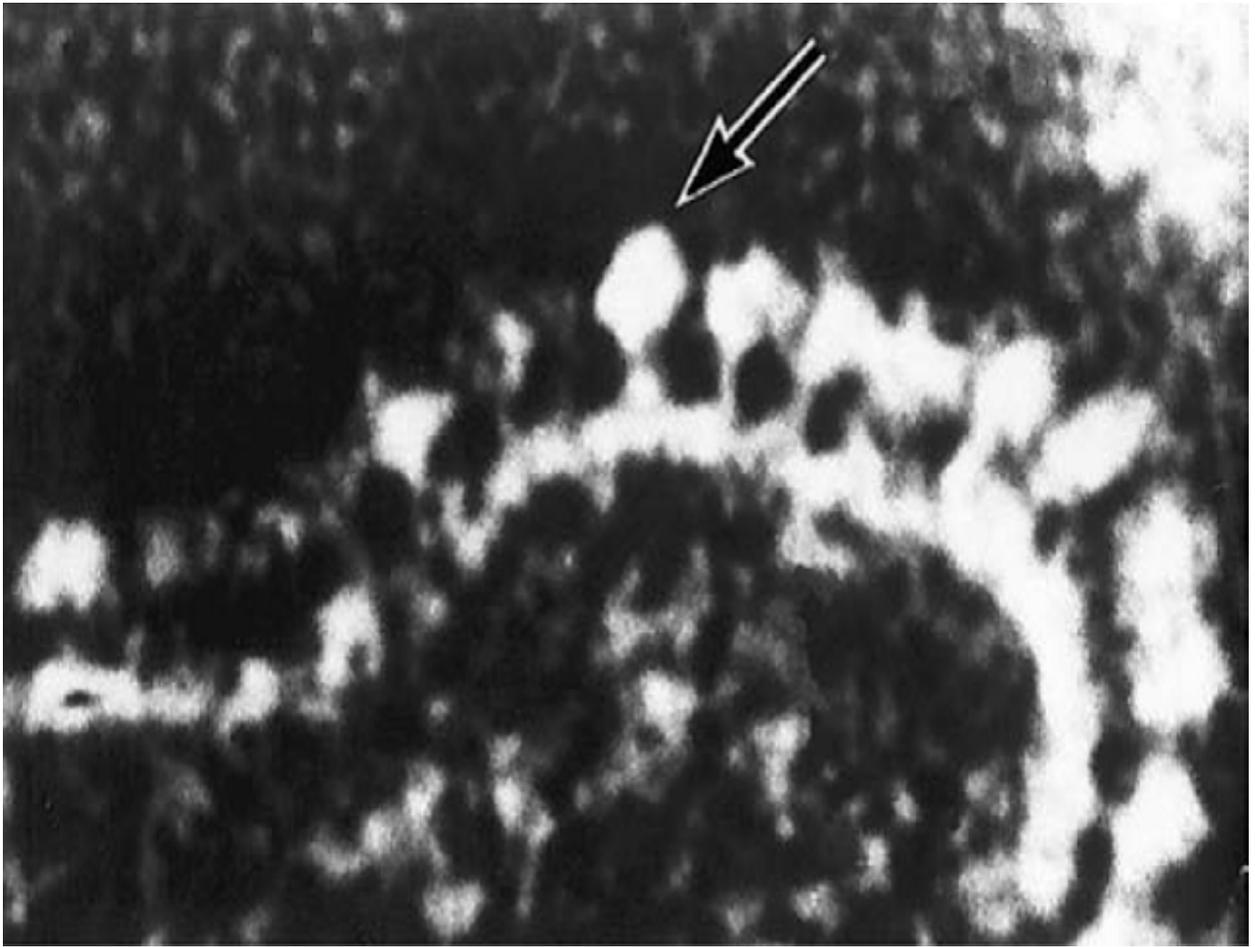


Figura 2. Primeras Imágenes del complejo hoy conocido como F_1 en 1964. Los hallazgos en las investigaciones derivaron en el creciente interés por conocer el funcionamiento del complejo enzimático. (Micrografía Electrónica de Partículas Submitocondriales de corazón Bovino tomadas de Fernández-Morán y cols., 1964).

Cadena Respiratoria y Función de la ATP Sintasa

La cadena respiratoria mitocondrial o cadena de transporte de electrones está embebida en la membrana interna mitocondrial, y la constituyen cinco complejos multiproteicos (I, II, III, IV y V o ATP sintasa) y dos transportadores de electrones móviles (coenzima Q o ubiquinona y Citocromo c).

Su principal función es el transporte coordinado de protones y electrones, para producir energía en forma de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. El transporte de electrones genera energía que es utilizada para transportar protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal situado entre las membranas mitocondriales externa e interna. Este proceso genera un gradiente electroquímico de protones, que es utilizado por el complejo V (ATP sintasa) para generar ATP a medida que los protones fluyen de nuevo desde el espacio intermembranal a la matriz mitocondrial. El ATP generado es exportado al citoplasma a través del transportador de nucleótidos de adenina (ANT) (Tuena de Gómez-Puyou y García Trejo, 2015).

La ATP sintasa, mejor llamada F_1F_0 -ATP sintasa, F_1F_0 -ATPasa o ATPasa H^+ -transportadora de dos sectores (EC 3.6.3.14, Nomenclatura enzimática IUBMB) es la enzima responsable de la síntesis de la molécula que lleva su nombre, o adenosina trifosfato (ATP). Este último es de suma importancia en la generación y almacenamiento de energía del metabolismo celular. El ATP está compuesto por

una ribosa, una adenina y tres grupos fosfato (Nelson y Cox, 2017; Tuena de Gómez-Puyou y García Trejo, 2015).

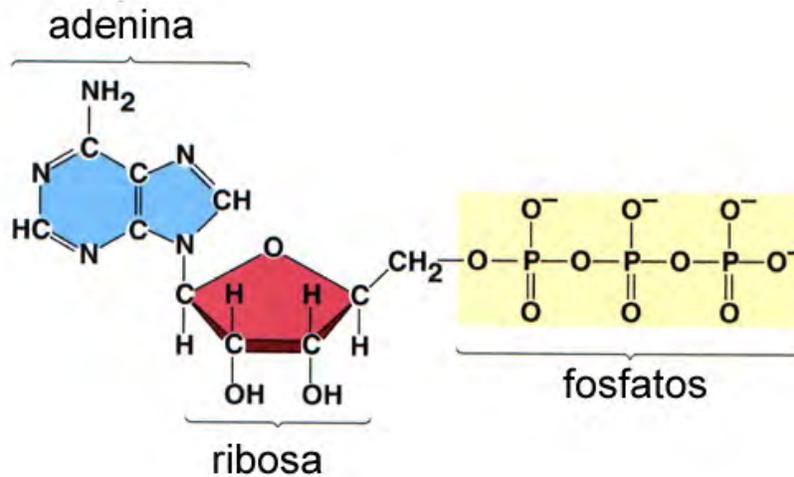


Figura 3. Molécula de ATP

(Imagen tomada de Tuena de Gómez-Puyou y García-Trejo, 2015)

Esta es la molécula que proporciona energía química a la célula al acumularse dentro del citoplasma, la célula la transforma en trabajo al convertir el ATP en adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi) por medio de su hidrólisis. Esta última es una reacción que libera energía, mejor llamada reacción *exergónica*, la cual se acopla a los procesos que consumen dicha energía o procesos *endergónicos*. Este compuesto es fundamental para las células vivas por lo cual debe ser abundante, y constantemente se repone en el interior de las mitocondrias; éstas contienen a la ATP sintasa que es la enzima responsable de llevar a cabo la síntesis de la mayoría del ATP celular (Cramer y Knaff, 1991).

Estructura de la ATP sintasa

La ATP sintasa consta de dos sectores o dominios definidos, uno que está embebido en la membrana interna de la mitocondria y se conoce como F_0 y otro que está en contacto con el medio acuoso o matriz de la mitocondria conocido como F_1 .

En el marco de la Teoría Quimiosmótica formulada por Peter Mitchell, la ATP sintasa es un actor preponderante en el concierto de reacciones de transferencia de energía. La enzima tiene la propiedad de acoplar en sus sitios catalíticos la energía química acumulada en la membrana interna de la mitocondria, sitio donde se le agrega el último fosfato al ADP para formar al ATP (Nelson y Cox, 2017; Tuena de Gómez-Puyou y García Trejo, 2015).

Esta membrana está densamente poblada de proteínas; entre ellas destacan las que bombean o transportan protones (H^+) de la matriz hacia el espacio intermembranal. Los protones por tener una carga positiva, no pueden difundir libremente a través de la membrana, por lo que se ven obligados a circular por un canal que se localiza en el sector F_0 de la ATP sintasa (García-Trejo y cols., 2006; 2011; 2012; Tuena de Gómez-Puyou y García Trejo, 2015).

El flujo de H^+ a través de la ATP sintasa, impulsa la rotación de un eje interno y este a su vez activa secuencialmente los tres sitios activos de la enzima, dando como resultado la síntesis del ATP a partir del ADP y del fosfato inorgánico (Pi). La

comprensión de este proceso involucra la revelación del funcionamiento de la maquinaria biológica, dentro del cual se han visto implicados diversos y prestigiosos grupos de investigación. En resumen se podría argumentar que la ATP sintasa es una máquina semiperfecta que fabrica ATP a partir de $ADP + P_i$ empleando como combustible el flujo de H^+ , cual pasa a través de un canal especializado que se encuentra en la porción F_o de la membrana interna mitocondrial (Nelson y Cox, 2017; García-Trejo y cols., 2006; 2011; 2012; Tuena de Gómez-Puyou y García Trejo, 2015).

En referencia a las subunidades de las que está compuesta la ATP sintasa, éstas varían dependiendo de la especie. Sin embargo la enzima tiene algunos componentes invariables entre organismos que es simplemente la estructura básica del segmento F_1 conteniendo a las subunidades α , β , γ , δ y ϵ . Aunque en algunos organismos se encuentren componentes homólogos con diferente nombre. Por ejemplo la subunidad delta en bacterias, en organismos eucarióticos equivale a una proteína llamada OSCP, derivado del inglés “Oligomycin Sensitivity Conferring Protein” o proteína que confiere sensibilidad a oligomicina (Racker, 1980; García-Trejo y cols., 2012).

Puesto que la reacción de síntesis de ATP es reversible, es decir la enzima es también una ATP hidrolasa, es importante mencionar el trabajo efectuado por los Dres. Armando Gómez Puyou y Marietta Tuena de Gómez Puyou, investigadores que estudiaron tanto la cinética de la síntesis, como la de la hidrólisis del ATP catalizados por esta enzima, así como la acción de una proteína que tiene la

función de regular la actividad de la F_1 -ATPasa. Estos estudios además de muchos otros ayudaron a vislumbrar de manera más clara la función preponderante que realiza esta enzima en la naturaleza, que además es de suma importancia, ya que es una piedra angular en la biología y la bioquímica, y funge como generador de la moneda de cambio energético en el metabolismo celular; es decir la ATP sintasa es el complejo enzimático encargado de proveer a la célula de la mayoría de la energía para la realización de todos los procesos vitales.

Absorción y transformación primaria de energía: la fotofosforilación.

Bioenergéticamente hablando, la mayoría de la energía vital de la biósfera proviene de la fotosíntesis. La fotosíntesis oxigénica ha existido durante más de tres mil millones de años. Su maquinaria molecular se ha perfeccionado para minimizar el desperdicio y maximizar el mayor aprovechamiento de la energía. Por ejemplo, la transferencia de energía por excitones entre los sistemas fotosintéticos (Cramer y Knaff, 1991).

La energía solar es la mayor fuente de energía de la tierra, ésta es convertida en energía química así como también es vital en la cadena alimenticia y la vida del planeta. El proceso primario de conversión de luz solar en energía por medio de la fotosíntesis incluye dos formas, es decir el par redox NADPH/NADP⁺ y el cociente ATP/ (ADP + P_i) (fosfato inorgánico). La eficiencia en estos mecanismos respecto a la conversión de energía es comparable al de una celda fotovoltaica. Por lo tanto, el mecanismo que permite el funcionamiento de los complejos fotosintéticos y respiratorios en la célula es en gran medida eficiente y efectivo. Dado que la fotosíntesis oxigénica no será revisada en este trabajo puesto que nos concentraremos en bacterias y mitocondrias, basta por el momento recordar que las cianobacterias y las plantas proporcionan el oxígeno y los carbohidratos esenciales para la vida. Cuatro complejos multiproteicos transmembranales están involucrados en la fotosíntesis para producir NADPH y ATP quimiosmóticamente: Fotosistema I (PSI), Fotosistema II (PSII), Citocromo (cyt_bf) y de manera importante la ATP sintasa (CF₁F_o) (Cramer y Knaff, 1991; Junge y cols., 2015).

La fosforilación oxidativa para formar ATP en bacterias y mitocondrias.

Peter Mitchell en 1961 propuso la hipótesis de que el transporte de electrones durante la respiración está vinculado con el transporte de protones a través de la membrana para acumular energía química en forma de un gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$) (Mitchell, 1961).

La síntesis de ATP está acoplada al gradiente de potencial electroquímico de protones, que es generado por los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria durante la oxidación de sustratos. Esta hipótesis se transformó en teoría al demostrar que este mecanismo opera en la naturaleza en todas las membranas transductoras de energía; es decir, en las membranas plasmáticas de bacterias, las membranas tilacoidales de los cloroplastos, y las membranas internas que forman las crestas mitocondriales. Por lo tanto es un mecanismo generalizado y conservado en todos los seres vivos (Mitchell, P., 2011; Tuena de Gómez-Puyou y García-Trejo, 2015).

Racker y colaboradores descubrieron a principios de los años '60, un componente de la mitocondria, era una fracción proteica soluble que participaba para el acoplamiento de la fosforilación del ADP a la cadena de transporte oxidativa de electrones. Ellos acuñaron el término F_1F_0 ATP sintasa, refiriéndose a la combinación del "Factor 1", o " F_1 " y su contraparte membrana llamado "Factor O" o " F_0 ", donde el subíndice representa la sensibilidad a Oligomicina, esto quiere decir

que se bloquea al canal de protones de esa fracción F_0 el cual es inhibido por este macrólido llamado oligomicina, ya que este bloquea de manera específica la fosforilación oxidativa. Particularmente esta molécula es usada para investigación, respecto el funcionamiento y desarrollo del conocimiento de la ATP sintasa ya que tiene alta toxicidad en humanos (Symersky y cols., 2012).

La F_1F_0 -ATP sintasa es el complejo enzimático terminal de la fosforilación oxidativa, es decir es el complejo que cataliza apropiadamente la síntesis del ATP, por lo cual también se le conoce como “Complejo V respiratorio”. Dado que este complejo reversible, puede llevar a cabo la hidrólisis del ATP, por lo cual también se le nombra F_1F_0 -ATPasa. El dominio F_1 está compuesto por subunidades solubles (α_3 , β_3 , γ_1 , δ_1 y ϵ_1) en el dominio catalítico de la enzima, mientras que el F_0 es el dominio membranal y la estructura básica de la enzima contiene tres subunidades esenciales (a_1 , b_2 y c_{8-15}). Los subíndices muestran la estequiometría de estas subunidades tanto en F_1 como en F_0 . Ambos dominios están unidos por un tallo central y por un tallo periférico (García-Trejo y cols., 2006; 2011; 2012; Tuena de Gómez-Puyou y García Trejo, 2015).

La ATP sintasa es una enzima esencial en el acoplamiento bioenergético más importante para la vida. Se conforma de dos nanomotores acoplados conformacionalmente; uno de ellos es el sector catalítico (F_1) que produce ATP a partir de ADP y P_i , el otro sector es un canal transmembranal (F_0) que produce un flujo de protones (o iones de sodio) a través de las membranas transductoras de energía. El acoplamiento de ambos nanomotores se conserva en todas las formas

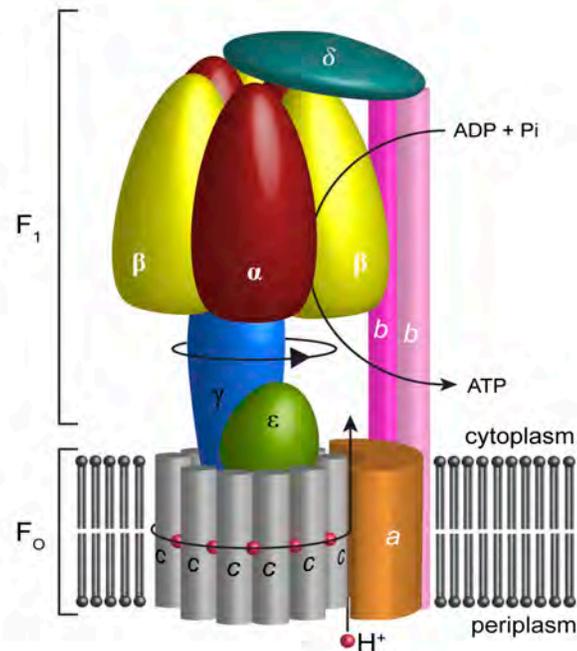
de vida es un mecanismo rotacional donde el flujo de protones a través del canal F_0 impulsa el giro del rotor central conectando F_1 con F_0 . Un estator periférico conecta ambos motores mientras el rotor central gira y al mismo tiempo alterna los sitios catalíticos del sector F_1 en tres conformaciones: una que une ADP y P_i , otra que los condensa, y otra que libera al ATP de la F_1 , todo esto ocurre simultáneamente dirigido por el giro del rotor. Este nanomotor trabaja con una eficiencia de acoplamiento cercana al 100%, dado que prácticamente toda la energía que obtiene de los gradientes electroquímicos la transforma en ATP; por lo tanto es la máquina molecular más cercana a la perfección termodinámica en toda la naturaleza (García-Trejo y cols., 2006; 2011; 2012).

La estructura de la F_1F_0 -ATPasa o F_1F_0 -ATP sintasa es muy importante para entender su funcionamiento, por lo que ha sido de gran interés estudiar las subunidades que la componen, la interacción entre ellas y su función dentro de la enzima. La estructura de la F_1F_0 -ATPasa se conserva en su arquitectura de rotor y estator por ser un nanomotor, pero varía en algunas subunidades supernumerarias y regulatorias de una especie a otra. Por ejemplo en los organismos eucarióticos existen subunidades especie-específicas por lo cual la enzima mitocondrial es más compleja en su estructura que su homóloga bacteriana. Además de esto, estudios recientes han demostrado la presencia de subunidades novedosas dentro de la estructura de la ATP sintasa de algunas algas clorofíceas y algunos parásitos. Se han comparado las subunidades que forman la F_1F_0 -ATPasa de diferentes especies, haciendo hincapié en sus diferencias en la composición de subunidades, y se ha encontrado que algunas de

estas subunidades adicionales regulan el estado de agregación y probablemente el funcionamiento de la enzima en las diferentes especies.

La estructura general de ATP sintasa se compone de dos dominios funcionales importantes, una encontrada de forma extrínseca de la membrana la cual es el sector de F_1 y una parte intrínseca de membrana F_0 . El dominio F_1 es la parte catalítica de la enzima donde se forma el ATP a partir del ADP y del Pi. El dominio F_0 contiene un motor, que genera la rotación usando la energía potencial almacenada en el gradiente de protones. La rotación del motor se transmite al dominio catalítico por el tallo central, que está unido directamente al motor rotativo. El tallo periférico une el dominio $\alpha_3\beta_3$ a la subunidad a en el dominio F_0 , para que juntos formen el estator integrante de la enzima (García-Trejo y cols., 2006; 2011; 2012; Tuena de Gómez-Puyou y García Trejo, 2015).

A)



B)

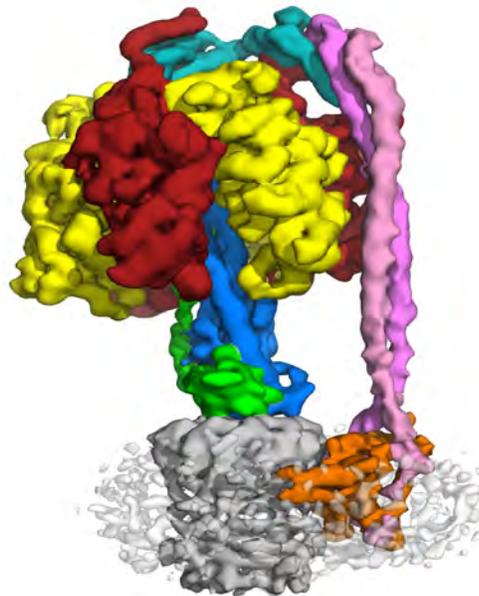


Figura 4. Organización de los dominios que componen a la ATP sintasa los cuales son F_1F_0 . A) Ilustración esquemática que muestra la trayectoria del protón y síntesis de ATP así como la disposición de subunidades en *E. coli* F-ATPasa. Subunidades α en rojo, β en Amarillo, γ en azul, ϵ en verde, c en gris, a en naranja, b en magenta o rosa, y d en turquesa) Criomicroscopía Electrónica de la *E. coli* F_1F_0 -ATPasa, donde se aprecia de mejor manera la forma del rotor y estator de la misma así como sus subunidades α en rojo, β en Amarillo, γ en azul, ϵ en verde, c en gris, a en naranja, b en magenta o rosa, y δ en turquesa(imágenes tomadas de Sobti y cols., 2016)

El dominio F_1 de la ATP sintasa es un conjunto de cinco proteínas globulares, α , β , γ , δ y ϵ , con la estequiometría $\alpha_3, \beta_3, \gamma_1, \delta_1\epsilon_1$. La masa molecular combinada de estas subunidades es de aproximadamente 350kDa. En el subconjunto $\alpha_3, \beta_3, \gamma_1$ que es común en todas las ATP sintasas, las tres subunidades α y las tres β forman una estructura aproximadamente esférica de 100Å (1Å= 0.1 nm) de diámetro, con las seis subunidades dispuestas en alternancia en torno a una estructura α -helicoidal alargada en la γ subunidad. Esta parte de la subunidad γ está completamente envuelta en el dominio $\alpha_3\beta_3$ y ocupa su eje central. Así, la estructura se asemeja a una naranja (Ver figura 4) hecha de seis segmentos $\alpha_3\beta_3$ o gajos dispuestos alrededor del tallo o médula central de la estructura (Nakanishi-Matsui y cols., 2016).

El resto de la subunidad γ sobresale aproximadamente 30 Å más allá del dominio $\alpha_3\beta_3$ hacia el sector F_0 y forma parte de un "pie" que une firmemente el sector F_1 al F_0 . Esta unión se ve aumentada por otra proteína, conocida por razones históricas como la subunidad ϵ en bacterias y cloroplastos, y como subunidad δ en las mitocondrias. A pesar de sus diferentes nombres, estas subunidades δ y ϵ , aunque no son idénticos, se doblan y se unen de una manera similar, y sus funciones se relacionan con la conexión entre γ y el anillo de subunidades c del rotor (Ver Fig. 5). En las mitocondrias, la fijación del pie de la subunidad γ al dominio de F_0 se ve aumentada por una segunda subunidad, conocida confusamente también como subunidad ϵ , sin embargo esta proteína mitocondrial no tiene ningún homólogo en las enzimas bacterianas y cloroplastos (Shirakihara y cols., 2015). Las subunidades γ y ϵ asociadas en las enzimas bacterianas y de

cloroplastos junto con las otras subunidades δ y ϵ en la enzima mitocondrial, se unen firmemente a un extremo de la estructura cilíndrica compuesta de un anillo hidrofóbico de las subunidades con el dominio F_0 de la enzima (Shirakihara y cols., 2015).

La organización de las subunidades en la ATP sintasa es más compleja en la enzima mitocondrial con respecto a las ATP sintasas bacterianas o las presentes en los cloroplastos. La subunidad γ que está en contacto con el dominio de membrana F_0 y este mismo dominio puede variar ya que el número de subunidades en el anillo difiere entre especies ya que en organismos superiores es más compleja. El rotor de la enzima consiste en el conjunto de la unidad del anillo de subunidades c , la subunidad ϵ , y la subunidad γ . La vía para los protones a través del dominio F_0 (ver figura 5) está alrededor de la interfaz entre una subunidad del anillo de subunidades c y la subunidad γ (Junge y Nelson., 2015).

En algunas enzimas bacterianas, el cuello lateral consiste en la subunidad δ y dos subunidades b idénticas. En otras enzimas bacterianas, y en la enzima del cloroplasto, las dos subunidades b son reemplazadas por una sola copia de homólogos, pero no idéntico, las subunidades b y b' . El dominio N-terminal de la subunidad δ se une a la región N-terminal de una de las tres subunidades alfa del heterodímero de subunidades b - y b' - interactúan con la subunidad transmembranal a través de sus α -hélices N-terminales (ver Fig. 5). En la enzima mitocondrial, el tallo periférico consiste en copias individuales de las subunidades OSCP, b , d y F6. OSCP es el homólogo de la subunidad bacteriana δ . Las

secuencias de subunidades mitocondriales *b*, *d* y F6 no están evidentemente relacionados con los de las subunidades bacterianas *b* y *b'*. Sus estructuras también difieren significativamente, aunque ambos están dominados por alfa-hélices, excepto para el dominio C-terminal de OSCP (y, presumiblemente, la subunidades δ bacteriana y de cloroplasto), que contienen estructuras beta-plegada (Junge y *cols.*, 2015).

Los dominios de la membrana de la enzima mitocondrial contienen una serie de subunidades individuales de membrana con alfa-hélices transmembranales que no se encuentran en las bacterias y los cloroplastos. Estas subunidades supernumerarias no tienen funciones conocidas en la generación de ATP; las subunidades *e*, *f*, *g*, A6L y Dapit y el proteolípido de 8 kDa, son proteínas que se encuentran en el complejo cuando los fosfolípidos se mantienen durante la purificación del complejo (Cano-Estrada y González-Halphen, 2011).

El rol de la ATP sintasa más allá de la fosforilación oxidativa ha llamado la atención a diversos grupos de científicos a largo de los años, se han acumulado pruebas en bacterias y mitocondrias que los complejos respiratorios, incluyendo el complejo de la ATP sintasa, se organizan en complejos súper moleculares (Schägger, 2002; Minauro-Sanmiguel y *cols.*, 2005; Couoh-Cardely *cols.*, 2010; Seelert y Dencher, 2011; Chaban, 2014; Cogliati, 2016).

Evolutivamente se han modificado algunas subunidades de la enzima para inhibir a la actividad de F_1F_0 -ATPasa y permitir o favorecer la de F_1F_0 -ATP sintasa. En

general, al disminuir el $\Delta\mu_{H^+}$, algunas subunidades o dominios inhibitorios se estructuran de tal manera dentro del rotor de la enzima que impiden el giro del cuello central impulsado por la unión del ATP. En bacterias, esta función inhibitoria la lleva a cabo la subunidad ϵ que funciona como un trinquete, es decir, una estructura que favorece el giro del cuello central de la F_1 en el sentido de la síntesis, pero lo inhibe en el de la hidrólisis (Sternweiss y Smith, 1980; Tsonuda y cols., 2001; Nakanishi-Matsui y cols., 2016).

Cuando los protones atraviesan la membrana por un conducto formado en el dominio F_0 (entre las subunidades a y c) provocan un giro de un anillo de proteolípidos formado por la subunidad c . Esta rotación hace girar al tallo central (subunidades γ y ϵ) en movimientos de 120° (ver figura 3), provocando cambios conformacionales alternantes y simultáneos en las subunidades catalíticas (subunidades α y β) e induciendo la unión de sustratos (ADP + Pi), la síntesis de ATP y su liberación. A la ATP sintasa se le representa como un motor molecular debido a su mecanismo catalítico, y por lo tanto consta de un rotor y de un estator. El rotor está compuesto por el tallo central de la enzima y el anillo de proteolípidos. Estas subunidades están involucradas en el movimiento de la enzima durante la catálisis, mientras que el estator lo forman las subunidades del tallo periférico, las cuales se mantienen estáticas durante la síntesis del ATP y a su vez mantienen fijas a las subunidades catalíticas (García-Trejo y cols., 2006; 2011; 2012; Tuena de Gómez-Puyou y García-Trejo, 2015; Junge y Nelson, 2015).

Una gran interrogante en el mecanismo de acoplamiento del nanomotor era el origen de la fuente de energía que impulsa el funcionamiento reversible en la enzima, además de cómo se regulaba el funcionamiento del rotor central que favorece la síntesis de ATP. Además de resolver la fuente de energía que impulsa la rotación del nanomotor, también se ha avanzado en los mecanismos de control de la enzima tanto en bacterias, como en mitocondrias y en cloroplastos. En estos últimos, la reacción primordial es el giro del nanomotor F_1F_0 en el sentido de la ATP sintasa, mientras que en bacterias, además del flujo de esta reacción en sentido sintético, a veces también se requiere el giro contrario del nanomotor en el sentido de la actividad de F_1F_0 -ATPasa, esto para acoplarla a los transportadores secundarios que alimentan a la célula bacteriana de nutrientes (García-Trejo y cols, 2006; 2011; 2012).

Figura 5. Composición de subunidades de ATP sintasa humana, de levadura y de *E. coli* (Figura transcrita de Kucharczyk y cols.,2011)

	Estequiometría	Bacteria	Mitochondria	
		<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>
F ₁	3	α	α	α
	3	β	β	β
	1	γ	γ	γ
	1	ε	δ	δ
	1	-	ε	ε
	1	δ	OSCP	OSCP
F _o	1	a	6	a
	1	-	8	A6L

	Estequiometría	Bacteria	Mitochondria	
		<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>
	10-15	C ₁₀₋₁₂	9 ₁₀	C ₈
	1-2	b ₂	4	B
	1	-	d	D
	1	-	h	F ₆
	1	-	f	F
	t.b.d.	-	e	E
	t.b.d.	-	g	G
	1	-	i	-
	1	-	k	-

	Estequiometría	Bacteria	Mitochondria	
		<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>
Regulador	1	-	Inh1p	IF ₁
	t.b.d.	-	Stf1p	-
	t.b.d.	-	Stf2p	-

Regulación de la ATP sintasa

Para entender la regulación de este complejo enzimático se debe saber que la función mitocondrial es de suma importancia para la homeostasis energética, el metabolismo, la señalización, y la apoptosis en las células. El complejo V de la mitocondrial dentro de la cadena respiratoria (ATP sintasa), es el motor molecular o generador de ATP final y determinante, la enzima clave de la función de este organelo celular. Como se ha reiterado la ATP sintasa cataliza el paso final de acoplamiento de la fosforilación oxidativa para suministrar energía en la forma de ATP (Long y cols., 2015). Entre otras definiciones cabe señalar que el complejo enzimático F_1F_0 -ATP sintasa también se denomina complejo V del sistema OXPHOS por ser la enzima terminal de la vía de la fosforilación oxidativa y por lo tanto es la enzima responsable de la mayoría de la síntesis de ATP en todas las células vivas (Boyer, 1997). Se trata de un complejo de proteínas excepcionalmente complicada, cuya masa molecular completa varía desde 540 hasta aproximadamente 600 kDa dependiendo de la fuente, y que se puede separar como ya mencionamos en la parte globular catalítica (F_1) y el sector membranoso (F_0) unidos por los tallos centrales y periféricos.

La enzima está presente en las membranas plasmáticas bacteriana y tilacoides de los cloroplastos, donde contiene 8 y 9 subunidades, respectivamente (Cano-Estrada y González-Halphen, 2011) en las mitocondrias, donde se encuentra en la membrana interna y se compone de al menos 15 y 17 subunidades diferentes en mamíferos y levaduras, respectivamente (Wittig y Schägger, 2008).

El sector de la F_1 casi siempre consta de cinco subunidades. La parte F_0 , que es responsable de la translocación de iones a través de la membrana, tiene lugar una composición variable. La forma más simple está presente en bacterias y consiste en las subunidades ab_2c_{10-15} . Las subunidades c forman una estructura de anillo con estequiometría variable entre las especies, conectados a F_1 por el tallo central, constituido por las subunidades γ y ϵ , siendo esta última homóloga a la subunidad δ de la enzima mitocondrial y es capaz de modular la catálisis (Sternweiss y Smith, 1980; Tsunoda y cols., 2001; Nakanishi-Matsui y cols., 2016).

El complejo F_1F_0 mitocondrial se compone de los productos de los genes nucleares y mitocondriales. En la levadura las tres proteínas del sector F_0 , la subunidad 6 (SU6, ó a), A6L (Su8 ó b) y c (SU9) están codificadas por el ADN mitocondrial (ADNmt), mientras que en los mamíferos solamente subunidades 6 (a) y A6L están codificadas por el ADNmt.

La alteración de la actividad de la ATP sintasa tiene relación importante a los impactos y orígenes en los trastornos mitocondriales de energía ya que estos están involucrados en el desarrollo de ciertas enfermedades y afecciones aún sin tratamientos efectivos, ejemplos de estas enfermedades son aquellas causadas por mutaciones de aminoácidos en la subunidad mitocondrial codificada en el gen ATP6 (García y cols., 2000; Cortés-Hernández y cols., 2007). Se han identificado ocho mutaciones puntuales y una micro-delección de dos nucleótidos en el gen ATP6, de los cuales los más comunes y mejor estudiada es la mutación T8993G

que conduce a la sustitución de una leucina altamente conservada por arginina (Vázquez-Memijey *cols.*,2002; Kucharczyk y *cols.*,2011).

Las enfermedades más comunes asociadas a estas mutaciones son letales en los primeros años de vida y se conocen como el Síndrome de Leigh Heredado Maternalmente (MILS) o Ataxia Neurogénica con Retinitis Pigmentaria (NARP) (García-Trejo, 2002). El Dr. García Trejo ha resuelto el mecanismo de acción de estas miopatías mitocondriales humanas asociadas a mutaciones a genes de la ATP sintasa en el ADNmt donde se ha encontrado que las mutaciones tienen dos efectos, por un lado bloquean el paso de protones por el canal F_0 , y por otro lado desestabilizan la estructura dimérica de la enzima mitocondrial (García y *cols.*, 2000; Cortés-Hernández y *cols.*, 2007), lo cual da la pauta al ensayo de terapias génicas para curar estas mutaciones en el futuro al menos *in vitro*. Incluso existen algunos métodos correctivos de estas mutaciones por edición génica en roedores (Reddy y *cols.*, 2015); sin embargo, todavía no se pueden aplicar estos métodos de terapia génica en humanos. Por lo tanto se requieren más estudios de terapia génica para que en un futuro se pueda dar algún método efectivo para curar estas enfermedades tan severas.

Por otro lado, a pesar del hecho de que el proceso de ensamblaje de la ATP sintasa mitocondrial es todavía poco caracterizada en los seres humanos, sus defectos se han reconocido como una causa de las enfermedades humanas (Houstek y *cols.*,2006; Kucharczyk y *cols.*,2011). La alteración de la biogénesis de la ATP sintasa lleva a la deficiencia de la ATP sintasa mitocondrial puede causar

dos tipos de defectos: cualitativos cuando la enzima está estructuralmente modificada y no funciona correctamente, y cuantitativa cuando está presente en cantidades insuficientes.

Es de suma importancia, la continuación de estos estudios para conocer y comprender conocimiento en forma específica de cómo se regula la ATP sintasa, ya que su funcionamiento básico como nanomotor se conoce para la hidrólisis y la generación del ATP (Hayashi y cols., 2012).

Independiente del mecanismo, se ha propuesto que el conjunto de la ATP sintasa puede recapitular algunos de los eventos evolutivos que dieron origen a esta enzima. De hecho, hay pruebas de que la F_1 evolucionó de una helicasa dependiente de ATP, mientras que el SU9 se deriva de un canal de iones de modo que su combinación convirtió un canal pasivo en una bomba activa (Gomis-Rüth y cols., 2001).

La ATP sintasa es un complejo enzimático con múltiples subunidades que son componentes integrales de las membranas de transducción de energía. En las bacterias, las mitocondrias y los cloroplastos. Las F-ATPasas están intrínsecamente relacionadas de manera evolutiva con las V-ATPasas (ATPasas vacuolares) que se encuentran en las membranas secretoras que utilizan la energía de hidrólisis para generar gradientes iónicos a través de las membranas, y de las A-ATPasas (ATPasas arqueas) que sintetizan ATP en las arqueas. En condiciones aeróbicas, la ATP sintasa genera ADP y Pi a partir del ATP, en vías

metabólicas de respiración o en fotosíntesis. En contraste, en condiciones anaeróbicas o fermentativas puede funcionar de manera reversible como bomba primaria y así generar un gradiente de protones como fuente de energía que impulse a los transportadores secundarios bacterianos (Miranda-Astudillo, y cols.,2012).

La ATP sintasa opera por el mismo mecanismo químico en todos los organismos, independientemente de su historia evolutiva y el hábitat. Sus parientes más remotos, de arqueas A-ATPasa vacuolar y eucariota V-ATPasa, probablemente operan bajo el mismo principio. Es probable que todas estas ATPasas evolucionaran a partir de un ancestro común (Suzuki y cols., 2012). Una diferencia entre F-ATPasa y V-ATPasa es el anillo de translocación de iones de F_0 y V_0 . En la V-ATPasa a partir de levadura, cada copia de la subunidad c en el anillo en el V_0 contiene cuatro hélices transmembranales (en comparación con dos en F_0) y una o dos cargas negativas en el medio de la membrana. Dado que las V-ATPasas tienen una transmisión de torque similar a la establecida para las F-ATPasas, esta diferencia estructural no debe afectar a la eficiente cooperación entre los dos nanomotores rotativos de la V-ATPasa (V_1 y V_0). Sin embargo, debido a la estequiometría de protón/ATP, la cual es de 2 para las V-ATPasas, éstas operan únicamente como una bomba primaria impulsado protones a través de la membrana plasmática de la célula eucariota, así como en orgánulos internos tales como vacuolas, lisosomas, vesículas sinápticas, endosomas, etc.

Por otro lado, recientemente se ha descrito, que la ATP sintasa mitocondrial se regula por medio de sus estados de agregación (de monómero a dímero y a oligómero) para mantener no sólo su función primordial para lo cual está especializada evolutivamente, que es la síntesis de ATP usando el gradiente de H⁺ generado a través de la membrana interna mitocondrial. Se ha observado que a diferencia de la enzima bacteriana, la enzima mitocondrial puede dimerizarse y oligomerizarse, y este fenómeno ocurre para controlar la formación de las crestas de la membrana interna mitocondrial. La primera estructura de la ATP sintasa dimérica mitocondrial tanto en 2D como en 3D la resolvió el Dr. José J. García Trejo en colaboración con el Dr. Stephan Wilkes (Syracuse, New York) (Minauro-Sanmiguel y cols., 2005; Couoh-Cardel y cols., 2010; Seelert y Dencher, 2011). En estos dímeros las partes F₁ de cada monómero de la enzima se encuentran relativamente separadas dentro del espacio acuoso de la matriz mitocondrial, mientras que la parte F₀ tiene una interfaz dimerizante donde las subunidades supernumerarias e y g participan en esta dimerización. Se sabe además que la proteína inhibidora mitocondrial participa en esta oligomerización de la enzima para formar las crestas mitocondriales (García y cols., 2006).

Desde el punto de vista cinético, varios estudios proponen múltiples niveles de los mecanismos que regulan la actividad de la ATP sintasa, que principalmente se basan en elementos que intervienen directamente en sus operaciones. Entre estos elementos se encuentran el ADP, Mg²⁺, Pi, ATP, oxianiones, además de las proteínas inhibidoras naturales que controlan la actividad de F₁F₀-ATPasa de la enzima.

La dirección del giro de la enzima debe controlarse de acuerdo a los requerimientos energéticos particulares y las condiciones existentes en las mitocondrias, cloroplastos y bacterias. Por ejemplo, en una condición de anoxia o isquemia en mitocondrias, o en la oscuridad en cloroplastos, se debe inhibir a la F_1F_0 -ATPasa para que se prevenga el consumo del ATP previamente generado en ambos organelos. Por otro lado, en bacterias aerobias o facultativas, o en anaerobias estrictas, también se debe de controlar la velocidad y sentido del giro dependiendo si se requiere más la actividad de F_1F_0 -ATP sintasa o de F_1F_0 -ATPasa. A este respecto, se habían descrito dos inhibidores naturales de la enzima, las subunidades ϵ de eubacterias, y la proteína inhibidora o IF_1 en mitocondrias. Sin embargo, recientemente se descubrió un nuevo inhibidor natural de la enzima por el Dr. José de Jesús García Trejo, al cual denominó subunidad ζ . Todas estas proteínas funcionan como inhibidores para controlar el funcionamiento de la enzima, con diferentes estructuras, pero mecanismos relativamente similares como se detallará a continuación.

INHIBIDORES NATURALES DE LA ENZIMA EN BACTERIAS

INHIBIDORES (ϵ y ζ)

En algunos casos las ATP sintasas bacterianas funcionan también a la inversa en condiciones anaerobias, e hidrolizan por lo tanto al ATP funcionando entonces la enzima como bomba primaria de protones para expulsarlos al espacio periplásmico.

En las bacterias, la actividad del nanomotor F_1F_0 expresa su reversibilidad cinética y termodinámica en condiciones aeróbicas o anaeróbicas para favorecer la actividad de ATP sintasa o de ATPasa, respectivamente. Esto es gracias al funcionamiento reversible del nanomotor F_1F_0 bacteriano. En condiciones aeróbicas, la cadena respiratoria bacteriana mantiene un gradiente electroquímico de protones que sostiene la fosforilación oxidativa catalizada por el ingreso de los protones a través de la F_1F_0 -ATP sintasa. Por otro lado, este gradiente mantiene el transporte secundario de nutrientes (azúcares, aminoácidos, iones, etc.) importantes para la célula. Por otro lado, en condiciones anaeróbicas, la ausencia de cadena respiratoria promueve el funcionamiento reverso del nanomotor F_1F_0 como bomba primaria de protones (F_1F_0 -ATPasa) para mantener el gradiente de protones, el cual es necesario para energizar a los transportadores secundarios de la célula bacteriana. En contraste con las bacterias, las actividades hidrolíticas de las ATP sintasas en las mitocondrias y los cloroplastos se inhiben de manera más estricta (García- Trejo y cols., 2012).

Las estructuras y los mecanismos de la enzima en estudio, la ATP sintasa, en eubacterias, arqueas, mitocondrias y cloroplastos tienen muchas similitudes y partes conservadas evolutivamente principalmente en la zona del rotor y el estator.

Sin embargo el conocimiento de esta enzima actualmente se refiere a la relación de su estructura y la función en los diferentes organismos procariontes y eucariontes, dado que se ha encontrado que aunque la estructura básica de rotor/estator se conserva en todos los seres vivos, los mecanismos de regulación del nanomotor son diferentes entre bacterias, mitocondrias y cloroplastos (Bason y cols., 2014)

En eubacterias como *Escherichia coli*, se describe a la subunidad ϵ como el inhibidor natural de la enzima bacteriana (Sternweiss y Smith, 1980). El dominio C-terminal compuesto por una horquilla de dos α -hélices anti paralelas, funciona como el dominio inhibitorio de esta subunidad (Figura 7). Recientemente se ha encontrado que este dominio C-terminal abre la horquilla para extender sus dos α -hélices y así enredarse con la subunidad γ del rotor, además de contactar a las subunidades de la interfaz catalítica α_{DP}/β_{DP} . Esta conformación extendida hace que se inhiba la rotación de la subunidad γ , pero aparentemente de preferencia en el sentido de la hidrólisis del ATP, por lo tanto se ha propuesto que ϵ funciona como una matraca o trinquete, aparentemente inhibiendo la rotación de γ pero solamente en el sentido de la hidrólisis del ATP (Tsunoday cols., 2001; García-Trejo y cols., 2012). Las estructuras compacta, semi-extendida y extendida de ϵ se pueden observar en la figura 7, paneles A, B, y C, respectivamente.

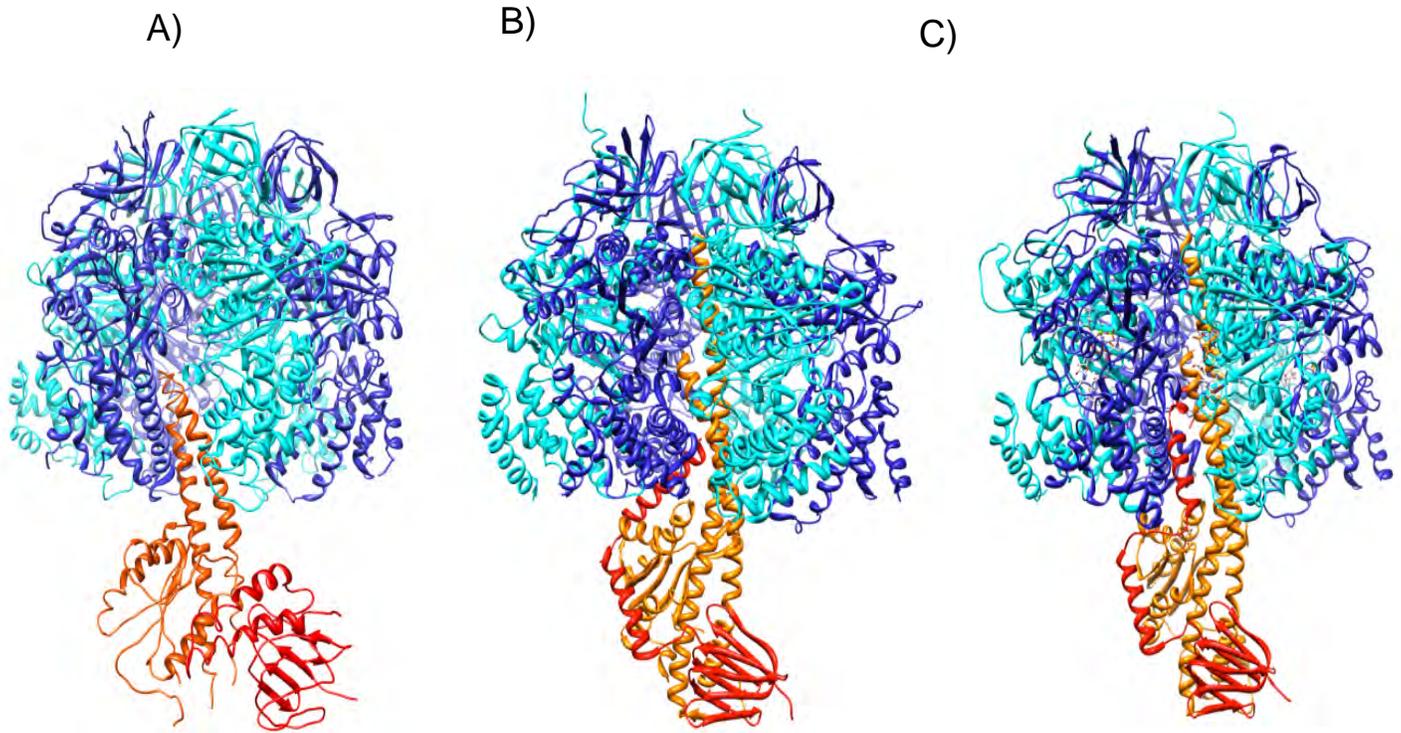


Figura 6. Mecanismos de control de la rotación del cuello central de la F₁-ATPasa en eubacterias. A) Conformación compacta de la subunidad ϵ bacteriana (ϵ_{Com} , rojo) donde se muestran sus dos α -hélices N-terminales compactadas interactuando con el dominio N-terminal de la misma subunidad y con la subunidad γ en naranja (Enzima cristalizada de la bacteria termofílica *Bacillus sp.* TA2.A1; PDB: 2QE7). B) Conformación semi-extendida de la subunidad ϵ (ϵ_{Sex}) donde las dos α -hélices inhibitorias del extremo N-terminal de ϵ se extienden parcialmente para interactuar con los extremos C-terminales de las subunidades α y β en cian y azul, respectivamente. (Enzima de *Escherichia coli*; PDB: 1JNV). C) Estructura extendida de la subunidad ϵ (ϵ_{Ext}), las dos α -hélices de ϵ se extienden para enredarse con la subunidad γ del rotor central (naranja). Esta estructura corresponde a la conformación inactiva de la F₁-ATPasa de *E. coli* (PDB: 3OAA). (Tomada de García-Trejo y cols., 2012).

Se han encontrado algunos casos en bacterias con mecanismos diferentes de control, por ejemplo hay un mecanismo de inhibición en *Bacillus sp* TA2.A1 donde la subunidad ϵ es corta e inclinada y eso impide la rotación si la participación de ϵ la cual se encuentra en conformación compacta (Figura 6). En contraste, en *Paracoccus denitrificans* y otras α -proteobacterias, la inhibición de la hidrólisis de ATP catalizada por la F_1 -ATPasa implica una nueva proteína inhibidora conocida como subunidad zeta (ζ).

Esta nueva proteína inhibidora no existe en mitocondrias ni cloroplastos, ni en otras clases de bacterias, es decir que es exclusiva de las α -proteobacterias. Esta subunidad fue descubierta por el Dr. José J. García Trejo en la α -proteobacteria *Paracoccus denitrificans*, como una subunidad adicional a las 5 subunidades canónicas de las F_1 -ATPasas (α , β , γ , δ y ϵ) (de la Rosa-Morales, 2005). Dado que tiene un peso menor a ϵ , es decir de 11 kDa, se le denominó como subunidad ζ siguiendo el alfabeto griego y el orden decreciente del peso molecular de las subunidades de la F_1 -ATPasa de *Paracoccus denitrificans* (Pd F_1 -ATPasa). Posteriormente se encontró que esta subunidad está conservada exclusivamente en la clase de las α -proteobacterias y que funciona como inhibidor natural de la actividad de Pd F_1 -ATPasa (Morales-Ríos y cols., 2010). Adicionalmente, el grupo del Dr. García Trejo demostró que el dominio inhibitorio de la subunidad ζ está en el extremo N-terminal de la subunidad y además resolvió la estructura del inhibidor libre ζ a partir de estudios que emplean resonancia magnética nuclear (NMR) en solución, en colaboración con el Premio Nobel de Química, Dr. Kurt Wüthrich (Zarco-Zavala y cols., 2013; Zarco-Zavala y cols., 2014; Serrano y cols.,

2014) (Figura 8). Posteriormente, el Dr. García Trejo demostró que la subunidad ζ se une a la interfaz catalítica $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$ F_1 de la F_1 -ATPasa de *Paracoccus denitrificans* (Figura 8), de manera similar al inhibidor mitocondrial (IF_1) (García-Trejo y cols., 2016). En este trabajo también se propuso que la subunidad ζ entra de manera acoplada a la rotación de γ en la interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$ para bloquear preferentemente el giro antihorario de γ , funcionando como la uñeta de un trinquete o matraca y así favorecer la rotación en el sentido de la síntesis del ATP, al bloquear selectivamente la rotación en el sentido de la actividad de F_1F_0 -ATPasa (García-Trejo y cols., 2016).

Este mecanismo y sitio de unión de la subunidad ζ propuesto se corroboró por la estructura cristalográfica tanto del dímero α/β de la F_1 -ATPasa de *Paracoccus denitrificans*, en colaboración del Dr. García Trejo con el Premio Nobel de Química John E. Walker, (Morales-Ríos y cols., 2015); como por la estructura cristalográfica de la F_1F_0 -ATP sintasa completa de *Paracoccus denitrificans* (Morales-Ríos y cols., 2015). En estas estructuras se encontró que efectivamente el sitio de unión del N-terminal inhibitorio de ζ está en la interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$ donde este dominio adquiere una estructura de α -hélice.

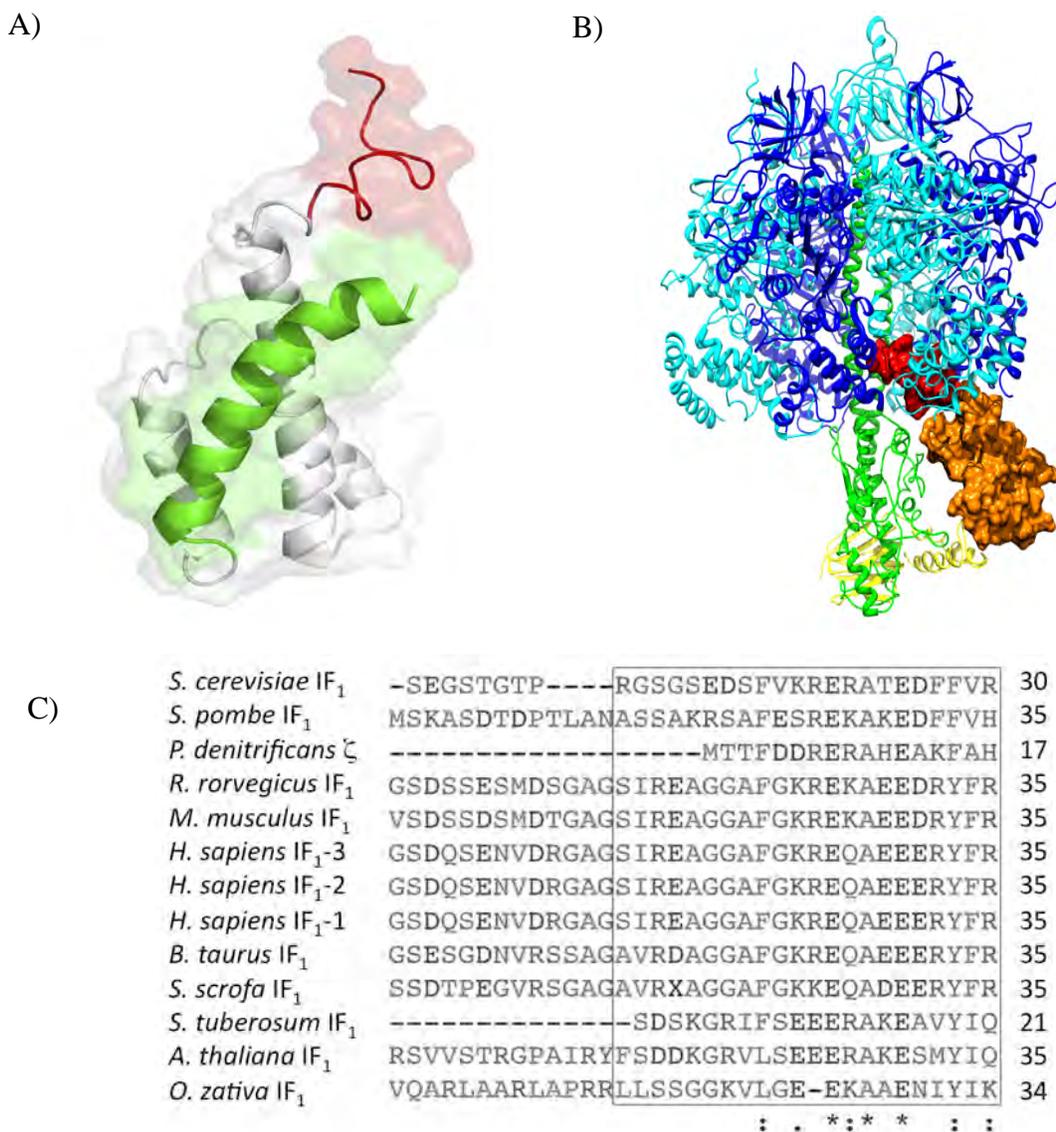


Figura 7. Estructura y sitio de unión de la subunidad ζ de *Paracoccus denitrificans*. A) Estructura de la subunidad ζ aislada y resuelta por RMN, en rojo se muestra el dominio N-terminal inhibitorio de la proteína y en verde el C-terminal (Zarco-Zavala y cols., 2014; Serrano y cols., 2014; García-Trejo y cols., 2016). B) Sitio de unión de la subunidad ζ en la F₁-ATPasa de *Paracoccus denitrificans* (García-Trejo y cols., 2016). La subunidad ζ se une en el mismo sitio que la proteína inhibitoria (IF₁) en la F₁-ATPasa mitocondrial insertando su N-terminal inhibitorio (rojo) en la interfaz α_{DP}/β_{DP}/γ y así bloquea la rotación de γ. C) Alineamiento del extremo N-terminal inhibitorio de la subunidad ζ con los dominios inhibitorios (caja negra) de las IF₁ de varias especies (ver texto). Lo asteriscos denotan identidades y los puntos son similitudes (tomado del material suplementario de Zarco-Zavala y cols., 2014).

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA INHIBIDORA DE LA F₁F₀-ATPasa MITOCONDRIAL (IF₁)

Como se ha discutido, el complejo mitocondrial F₁F₀ATP sintasa proporciona la mayoría del ATP requerido por la célula mediante el uso de Mg²⁺-ADP y Pi como sustratos. Debido a que es una enzima motor giratorio reversible, puede sintetizar o hidrolizar al ATP de acuerdo con las condiciones de trabajo en los organismos superiores. Termodinámicamente, la enzima está sesgada a la síntesis de ATP por la fuerza motriz de protones ($\Delta\mu_{H^+}$) generado por la cadena respiratoria. En mitocondrias, la F₁F₀-ATP sintasa también es accionada por el suministro constante de ADP y Pi por los transportadores de adenín nucleótidos (ANT) y de fosfato inorgánico (Pi), respectivamente. En los eventos de la hipoxia / isquemia, la enzima tiende a hidrolizar al ATP de manera acoplada a la translocación de los protones H⁺ de la matriz al espacio intermembranal, esto para restaurar la pérdida del potencial en la membrana mitocondrial ($\Delta\mu_{H^+}$). En eucariontes esta función se bloquea, gracias a la proteína IF₁ que juega un papel esencial la inhibición de la F₁F₀-ATPasa para la preservación de los niveles de ATP intracelulares (Campanella y cols., 2009).

En 1963, Pullman y Monroy enuncian la teoría de que la actividad de F₁F₀-ATPasa en las mitocondrias es controlada por un inhibidor natural *in vivo*, además de ser inhibida por oligomicina y por incubación a bajas temperaturas *in vitro*. Ellos describen estos factores ya anteriormente reportados, además de experimentos con la purificación de la proteína que conforma este complejo. El curso de ese

trabajo fue guiado por la hipótesis de que la hidrólisis del ATP por la F_1 representaba una reversa de la reacción de fosforilación de la cadena respiratoria seguido de hidrólisis del intermediario. Esta hipótesis incluía la consideración de que en mitocondrias intactas la potencialidad hidrolítica de la enzima se suprimía y el ADP era el aceptor obligatorio del grupo fosfato. En consecuencia, la actividad de F_1 -ATPasa no era esencial para su actividad de acoplamiento y en efecto representaba una actividad anormal que ocurría como resultado de su desplazamiento a partir de la organización estructural de las mitocondrias. Los resultados anteriores sugerían que las mitocondrias contenían una sustancia que inhibía la actividad hidrolítica de F_1 sin afectar a su capacidad de acoplamiento. La evidencia de esto era de dos tipos: a) se observaba una marcada activación de la actividad hidrolítica de la F_1 durante la purificación, pero no fue acompañado por un aumento en la actividad de acoplamiento; b) la actividad de ATPasa de preparaciones físicamente homogéneas de la F_1 fue notablemente estimulada cuando el enzima se expone a temperaturas elevadas, pero el aumento de la actividad no fue acompañado por un aumento en la actividad de acoplamiento. Durante esa investigación, se encontró que las preparaciones purificadas de F_1 contenían un factor termoestable no dializable que inhibía la actividad de ATPasa, el cual se podía liberar después de la desnaturalización por calor o extracción alcalina. Fue así como lograron aislar un factor que era capaz de inhibir las actividades de F_1 -ATPasa y de F_1F_0 -ATPasa de la enzima, al cual denominaron factor que inhibe a la F_1 -ATPasa o "IF₁" (Pullman y Monroy, 1963).

Durante décadas, varios laboratorios trataron de descubrir el mecanismo de inhibición que la IF₁ ejerce en esta enzima de forma específica y con técnicas moleculares que pudieran ayudar a vislumbrar el resultado concluyente de las hipótesis que especulaban respecto a la inhibición específica de la enzima. Se ha encontrado que el inhibidor mitocondrial IF₁ es una proteína pequeña, básica, estable al calor compuesta de 80-84 aminoácidos (~10 kDa) y predominantemente en compartimientos dentro de la matriz mitocondrial. Se sabe que el dominio inhibitorio de la IF₁ se encuentra hacia el extremo N-terminal de la proteína, que el dominio central funciona como sensor al pH, y el dominio C-terminal funciona como dominio de dimerización (Cabezón y cols., 2000), ver figuras 8 y 9. Además, se sabe que la unión de la IF₁ a la F₁-ATPasa no es un mecanismo simple de asociación/disociación, sino que requiere de algunas vueltas catalíticas de la F₁-ATPasa para que la IF₁ entre y se acomode dentro de su sitio final de inhibición (Tuena de Gómez-Puyou y cols., 1983), ver figuras 10 y 11.

Por otro lado, existe una controversia en cuanto a los efectos de la IF₁ en la síntesis de ATP, algunos autores indican que la IF₁ inhibe la síntesis del ATP (Gómez-Puyou y cols., 1979; Cuezvay cols., 2011) mientras que otros estudios indican que la IF₁ únicamente inhibe la hidrólisis del ATP (Gledhill y cols., 2007) sin afectar la síntesis del nucleótido. Sin embargo, no se han determinado los mecanismos estructurales que subyacen a esta acción unidireccional o bidireccional de la IF₁.

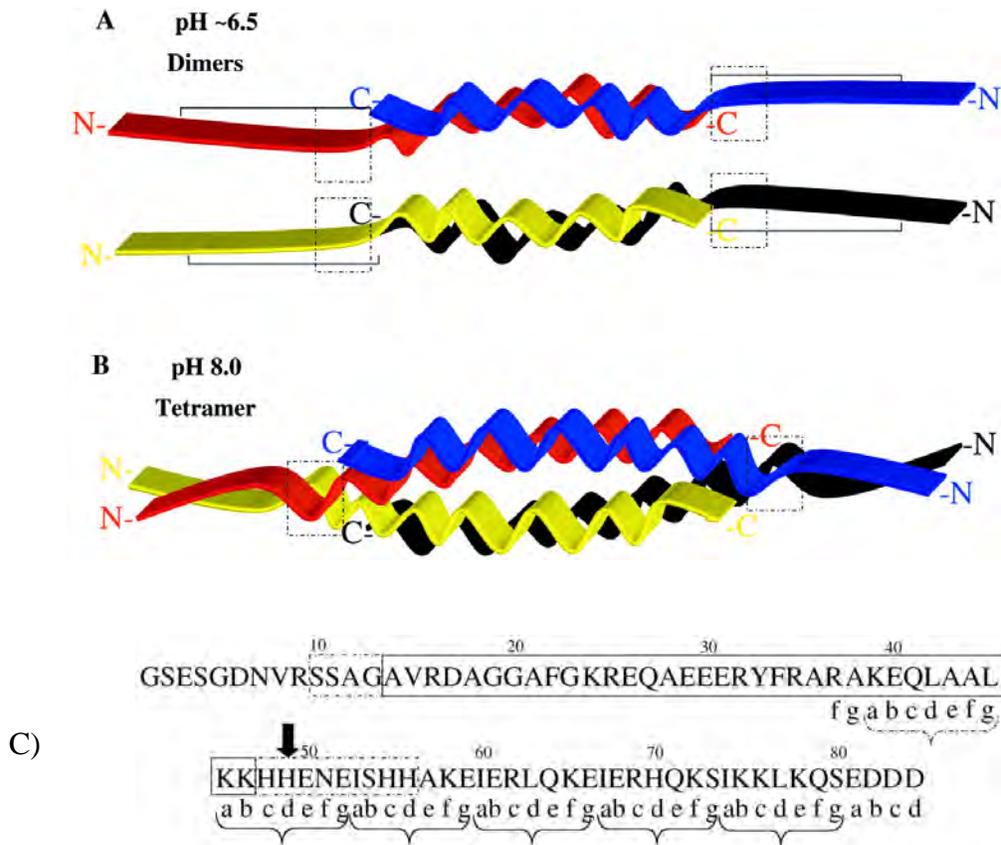


Figura 8. Secuencia y estados de agregación de la IF₁ mitocondrial.

A) Formación de dímeros de la IF₁ a pH 6.5; se muestran dos dímeros con el extremo C-terminal formando α -hélices entrelazadas antiparalelas. Cada monómero es de un color diferente. El extremo N-terminal inhibitorio queda libre para unirse a la F₁-ATPasa mitocondrial. B) Formación de tetrámeros de la IF₁ a pH 8.0. Los dos dímeros anteriores se asocian para formar un tetrámero en teoría no inhibitorio. C) Estructura primaria de la IF₁ de mitocondrias de corazón de bovino. Se muestra el dominio inhibitorio encerrado en una caja y enseguida los residuos del sensor de pH como pares de Histidinas (Flecha ↓). El dominio C-terminal muestra héptadas conservadas que promueven la dimerización por formación de α -hélices antiparalelas entrelazadas (llaves). Imágenes tomadas de Cabezón y cols., 2000.

Una posibilidad para explicar la posible función unidireccional de la IF₁ es que el gradiente de protones y el pH alcalino en la matriz mitocondrial previenen la unión inhibitoria de la IF₁ y por ende la IF₁ no se podría unir en su sitio inhibitorio en

condiciones fisiológicas como lo es una respiración y gradiente de protones normales en la mitocondria. Entonces la aparente función unidireccional de la IF₁ se puede deber a que en condiciones de síntesis de ATP, es decir con gradiente de protones, la IF₁ no puede ejercer bien su función inhibitoria debido a su sensibilidad al pH, con lo cual se explicaría cómo se inhibe de manera selectiva tanto la F₁-ATPasa como la F₁F₀-ATPasa con esta proteína a pH relativamente ácido, sin afectar a la F₁F₀-ATP sintasa (García-Trejo, 2002).

Algo que si se ha resuelto de la IF₁ mitocondrial, inicialmente por el Dr. José J. García Trejo, es que el mecanismo de inhibición de la IF₁ involucra el bloqueo de la rotación de la subunidad γ (Minauro-Sanmiguel y cols., 2002; García-Trejo, 2002) de manera similar a la subunidad ζ de *Paracoccus denitrificans* ya descrita (Zarco-Zavala y cols., 2014; García-Trejo y Morales-Ríos, 2008; García-Trejo y cols., 2016). Inicialmente se encontró que la IF₁ entrecruzaba con el carboxilo terminal de las subunidad β , en un dominio conservado llamado DELSEED por la secuencia de aminoácidos (Jackson y Harris, 1998), y además que el dominio inhibitorio se encuentra más hacia su extremo N-terminal, siendo el extremo C-terminal regulatorio y sensor de pH, además de dominio de dimerización (Cabezón y cols., 2000; García-Trejo y cols., 2006), ver Figura 8. Posteriormente, la primera evidencia de que la IF₁ podía interactuar con la subunidad γ del rotor y así bloquear la rotación de la enzima proviene del primer entrecruzamiento reportado entre la subunidad IF₁ y las subunidades γ y ϵ del rotor de la F₁-ATPasa mitocondrial (Minauro- Sanmiguel y cols., 2002). En estos estudios se encontró que el sitio de entrada del dominio inhibitorio N-terminal de la IF₁ a la F₁-ATPasa

es la interfaz α_E/β_E de la F_1 (Minauro- Sanmiguel y *cols.*, 2002; García-Trejo y Morales-Ríos, 2008).

Posteriormente se cristalizó el complejo F_1 - IF_1 de corazón de bovino y se encontró al N-terminal de la IF_1 efectivamente contactando a la subunidad γ y por lo tanto inhibiendo su rotación, pero el sitio final de inhibición se encontró en la interfaz α_{DP}/β_{DP} (Cabezón y *cols.*, 2003). Esto indica que la IF_1 entra por la interfaz α_E/β_E y la subunidad γ hace dos giros parciales de 120° y finalmente la IF_1 termina entroncada en la interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$ (García-Trejo y Morales-Ríos, 2008; Basony *cols.*, 2014). Por lo tanto este mecanismo de inhibición de la rotación propuesto inicialmente por el Dr. García Trejo, se corroboró por las estructura cristalográfica del complejo F_1 - IF_1 mitocondrial donde se encontró que la IF_1 inserta su N-terminal inhibitorio en forma de α -hélice en la interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$ de la F_1 -ATPasa mitocondrial (Basony *cols.*, 2014), ver Figura 10. El mecanismo y sitio de unión de la IF_1 se ha estudiado por muchos años en células de modelo murino, bovino y en levadura por medio de estudios bioquímicos por medio de técnicas de proteólisis limitada, de entrecruzamiento químico, y finalmente de cristalografía de proteínas (García-Trejo y *cols.*, 2011). Actualmente se sabe que IF_1 es una proteína de inhibidor endógeno de la ATP sintasa mitocondrial. Se conserva evolutivamente largo de todos los eucariotas y se ha propuesto que juegan un papel crucial en la prevención de la reacción inversa de gasto de la ATP sintasa, en el cambio metabólico de la fosforilación oxidativa para la glucólisis, en la supresión de ROS (especies reactivas de oxígeno) generación, y en la morfología mitocondrias (García y *cols.*, 2006; Nakamura y Yoshida, 2013).

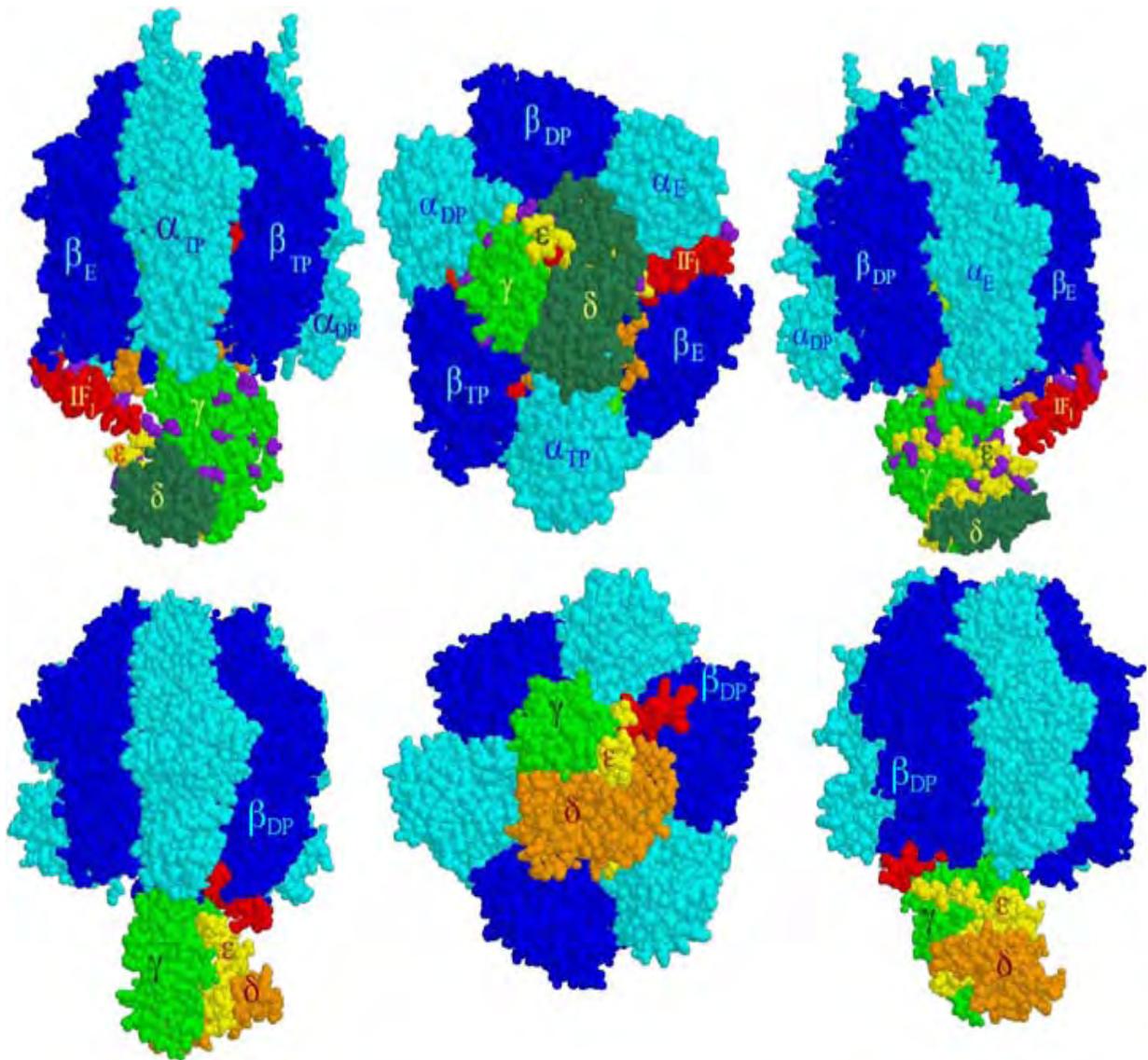


Figura 9. Sitio de entrada y unión inhibitoria de la IF₁ en la enzima mitocondrial. Se muestra el dominio inhibitorio de la IF₁ en rojo. En el panel superior se muestra el sitio de entrada encontrada por entrecruzamiento (Minauro-Sanmiguel y cols., 2003), y en el panel de abajo el sitio de unión final resuelto por cristalografía de rayos X (Cabezón y cols., 2003). El dominio inhibitorio de la IF₁ entra por la interfaz α_E/β_E , y después de dos giros parciales de γ , se entronca en la interfaz α_{DP}/β_{DP} bloqueando la rotación de γ en el estado inactivo. Figura tomada de García-Trejo y Morales-Ríos, 2008).

Se han realizado estudios IF₁-KO (knock-out) en cepas de murinos relevantes mostrando que no existen alteraciones en la anatomía del tejido o la autofagia. Las mitocondrias de los ratones IF₁-KO son normales en la morfología, en el contenido de moléculas de ATP sintasa y en la actividad de la síntesis de ATP. Por lo tanto, se podría suponer que IF₁ no es una proteína esencial para los mamíferos a pesar de su presencia generalizada en eucariotas, sin embargo se debe tomar en cuenta las consecuencias a largo plazo de no poseer esta subunidad reguladora (Ohsakaya y cols., 2011; Nakamura y cols., 2013)

También, en los estudios donde se silencia el gen se muestra el mismo crecimiento celular, el consumo de glucosa, la síntesis de ATP mitocondrial y la morfología de las mitocondrias que una célula normal. Los ratones que llegan a carecer de IF₁ no mostraron fenotipo defectuoso en las condiciones actuales. (Nakamura y Yoshida, 2013). Sin embargo en otros estudios se han mostrado resultados diferentes en IF₁-KO en levaduras ya que arrojan repercusiones donde estas se ven afectadas, ya que se muestra una disminución en el ATP celular ya que en comparación con levaduras no mutantes la generación de energía se mostró normal (Lu y cols., 2001).

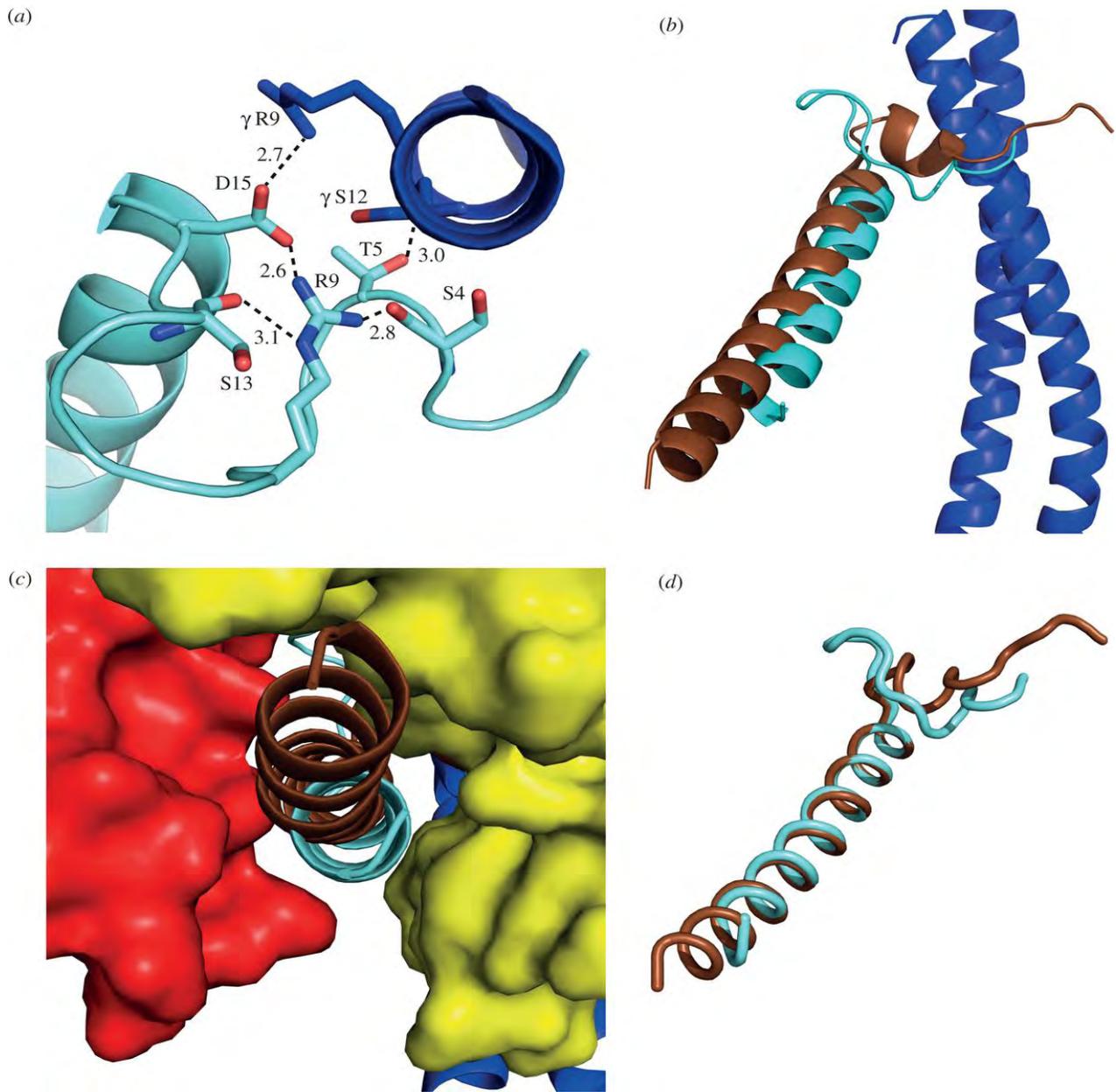


Figura 10. PROTEÍNA INHIBIDORA DE LA F_1F_0 - ATPasa MITOCONDRIAL (IF_1)
 a) y b) se muestran los residuos de interacción de la IF_1 (cian de levadura y café de bovino) con la subunidad γ (en azul). En c) y d) se muestra el dominio N-terminal inhibitorio de la IF_1 insertado en la interfaz α_{DP}/β_{DP} , con la subunidad α en rojo y la β en amarillo (tomado de Robinson y *co/s.*, 2013).

Una de las posibles explicaciones para la no esencialidad de IF_1 es que otras proteínas pueden hacerse cargo de las funciones de IF_1 en ratones KO- IF_1 . Este argumento, no es improbable, porque al menos uno (Stf1) de dos genes accesorios para el ensamblaje de la IF_1 en levaduras (Stf1 y Stf2), ejerce la misma función inhibitoria (García y cols., 2002), pudiendo éste complementar la función de la IF_1 en la mutante KO- IF_1 de ratón. Dada esta posibilidad, se han generado mutantes dobles y triples en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) donde se eliminan tanto el gen de la IF_1 ($\Delta INH1$) como el de ambos factores de estabilización ($\Delta Stf1$ y $\Delta Stf2$), dando como resultado un fenotipo similar al silvestre, dado que las mutantes sencilla ($\Delta INH1$), dobles y triples ($\Delta Stf1$ y $\Delta Stf2$), crecen de manera similar a la silvestre pero tienen aumentada la actividad de F_1F_0 -ATPasa sin un efecto claro en la velocidad de síntesis del ATP (Lu y cols., 2001).

En algunas especies como *Litopenaeus vannamei* o camarón blanco que se expone a los cambios cíclicos de la concentración de oxígeno disuelto del agua de mar a su vez debe neutralizar los efectos adversos de la hipoxia mediante el uso de ATP como fuente de energía. De nueva cuenta nos demuestra como en organismos como los crustáceos, la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial es fundamental para la homeostasis celular y la función predominantemente como un F_1F_0 -ATP sintasa (Chimeo y cols., 2015).

La estructura mitocondrial tiene un papel central tanto en la conversión de energía y en la regulación de la muerte celular. Se ha demostrado que IF_1 protege las

células de la muerte celular necrótica y soporta la estructura de crestas promoviendo la oligomerización de la F_1F_0 -ATP sintasa (Faccenda y cols., 2013) Se sabe que IF_1 es regulada en su expresión en una gran proporción de cánceres humanos, y se ha comenzado a investigar de ello ya que la contribución a la progresión de la apoptosis y un aumento de la expresión de IF_1 , con relación a la F_1F_0 -ATP sintasa, protege las células de la muerte apoptótica, como se verá en el siguiente apartado.

Finalmente, comparando las estructuras de las subunidades ϵ y ζ bacterianas, e IF_1 mitocondrial (Figuras 7-12), se ha llegado a la conclusión de que los tres inhibidores se unen de manera diferente a la misma interfaz α/β e incluso contando con estructuras diferentes, ambos inhibidores bloquean de manera similar la rotación de la subunidad γ . Además de esto, también la subunidad ζ de las α -proteobacterias se une de manera muy similar a la IF_1 mitocondrial, formando una α -hélice con su N-terminal inhibitorio, muy similar al de la IF_1 (García-Trejo y cols., 2016).

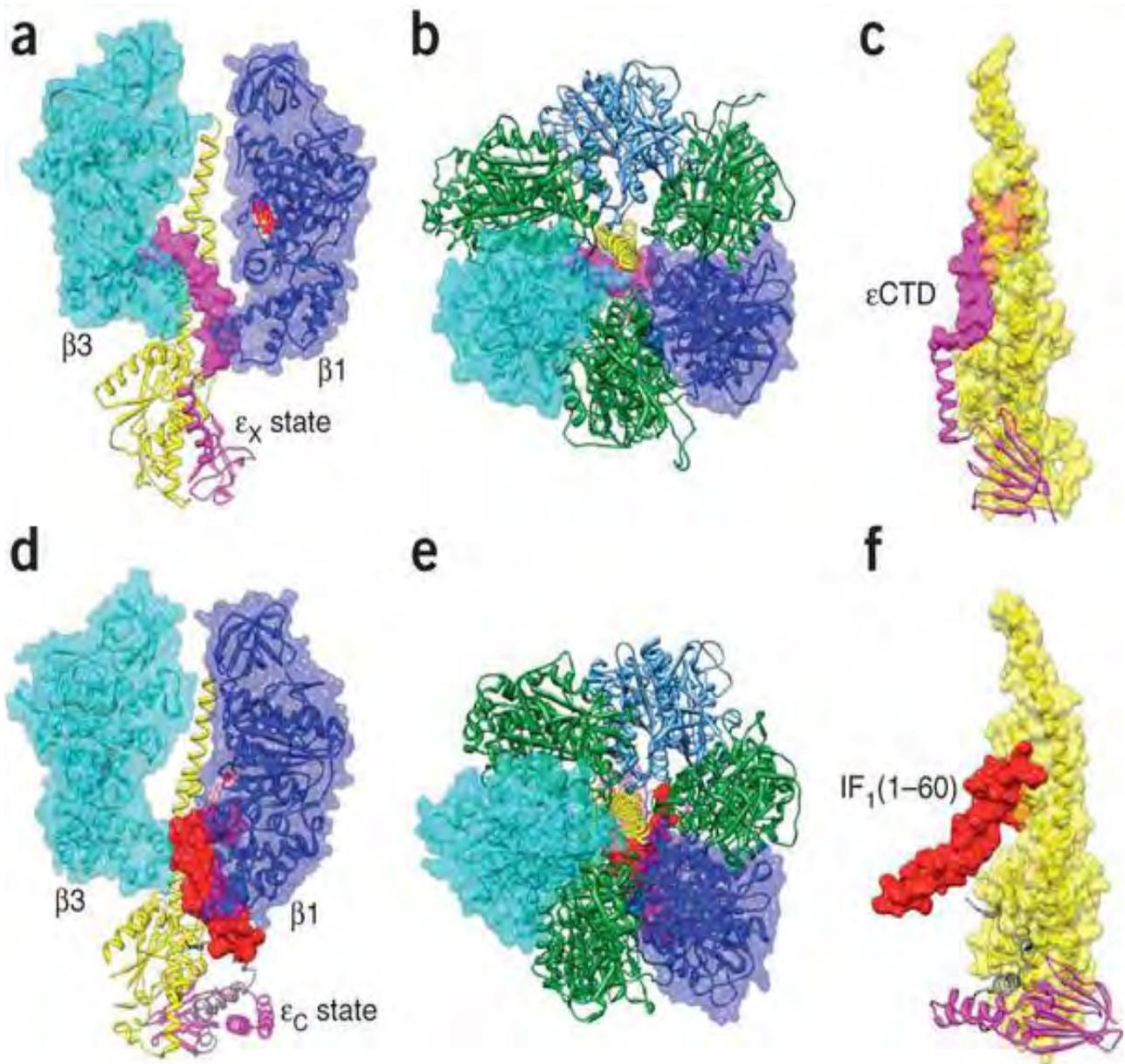


Figura 11. Comparación de la enzima ATP sintasa inactivada sus dos inhibidores naturales ϵ bacteriana e IF₁ mitocondrial. En el panel superior (a-c) se muestra la F₁-ATPasa de *E. coli*, con la subunidad ϵ extendida (morado) bloqueando la rotación de γ (amarillo). En el panel inferior, se muestra a la F₁-ATPasa mitocondrial con el extremo N-terminal inhibitorio de la IF₁ en rojo insertada en la interfaz α_{DP}/β_{DP} y bloqueando la rotación de γ (amarillo) (tomado de Cingolani y cols., 2011).

PAPEL DE LA IF₁ EN LA DIMERIZACIÓN DE LA ATP SINTASA MITOCONDRIAL

En mitocondrias, el funcionamiento de la ATP sintasa lo controla una subunidad regulatoria (IF₁) que bloquea la rotación del cuello central de la enzima y los cambios catalíticos de las subunidades β cuando el gradiente de protones disminuye como ocurre en la isquemia. Además de este papel fundamental, el complejo F₁F₀-ATP sintasa contribuye a darle forma a las crestas mitocondriales al dimerizarse y polimerizarse, incrementando la superficie membranal disponible para la fosforilación oxidativa. La dimerización de la enzima se logra por medio de las subunidades supernumerarias de F₀ como e, g y k (Arnold, I., y cols. 1998). Por otro lado, también la IF₁ y posiblemente otras subunidades del cuello lateral contribuyen a estabilizar al dímero de la ATP sintasa al conectar las porciones F₁ de la enzima (García y cols., 2006). Recientemente, algunas evidencias han demostrado que la IF₁, además de su rol como inhibidor, también controla la oligomerización de la enzima a lo largo de la membrana interna mitocondrial (García, y cols., 2006; 2011; García-Trejo, y cols., 2008; 2011; 2012), lo que aumenta el interés por la molécula. Esta presente revisión delinea el conocimiento fundamental de la ATP sintasa F₁F₀ y vincula a los mecanismos moleculares para regular su función, esto con el objetivo final de destacar la función de la IF₁ en el control de esta enzima dentro de un contexto patológico y fisiológico (Faccenda Danilo y cols., 2012).

La gran conclusión a este respecto, es que la oligomerización de la enzima a partir de sus dímeros, controla e induce la formación de las crestas mitocondriales. Es decir, que la ATP sintasa no sólo cataliza la reacción de síntesis de ATP a partir de ADP y Pi de la manera más eficiente y espectacular con su mecanismo rotacional, sino que al oligomerizarse, este proceso le da forma a las crestas mitocondriales y con ello se aumenta la superficie disponible para la fosforilación oxidativa mitocondrial.

PAPEL DE LA IF_1 EN LA FISIOLÓGÍA CELULAR Y EN CONDICIONES PATOLÓGICAS COMO EL CÁNCER.

Recientemente la hipótesis postulada por el fisiólogo alemán Otto Heinrich Warburg a principios del siglo XX sobre el origen del cáncer que sostiene la carcinogénesis es una respiración celular defectuosa causada por un daño mitocondrial ha sido cuestionada por una serie de estudios que demuestran que la fosforilación oxidativa se reprime en algunos tumores, en lugar de estar inactiva por sí misma. Dado esto en algunos tratamientos podría ser posible cambiar el metabolismo mediante la activación de vías mitocondriales esto se ha sugerido en la optimización de estrategias antitumorales (Domenis y cols., 2012).

La bioenergética de IF_1 en células cancerosas se ha investigado ampliamente, pero el papel de IF_1 (la proteína inhibidora natural de F_1F_0 -ATPasa) en el metabolismo de las células cancerosas es todavía incierto (Barbato y cols., 2015) aunque se relaciona su expresión con algunos tipos de cáncer.

Inicialmente, el grupo del Dr. García-Trejo, demostró que la IF_1 mitocondrial se sobre expresa aproximadamente al doble de su expresión normal en células de hepatoma de rata, y además que esta sobre-expresión conlleva una mayor asociación de la IF_1 con la ATP sintasa mitocondrial, postulándose por primera vez que en células cancerígenas se debe inhibir más la actividad de F_1F_0 -ATPasa (Bravo y cols., 2004).

En experimentos realizados con células de hepatocarcinoma HepG2, estas células se cultivaron con diferentes sustratos metabólicos en condiciones de activación y biogénesis, y en su contraparte en silenciamiento, y adaptación mitocondrial. Además de la esperada regulación de la biogénesis mitocondrial, la privación de glucosa provocó un aumento de la fosforilación oxidativa y de la respiración y un aumento en los niveles de expresión de la subunidad β de la ATP sintasa y del inhibidor del Factor 1 (IF_1). La hiperglucemia, por otra parte, condujo a una marcada disminución del nivel de la coactivador transcripcional PGC- α sugiriendo baja regulación de la biogénesis mitocondrial, aunque no se observaron cambios en la masa mitocondrial ni deterioro de la fosforilación oxidativa o en la respiración. En particular, la hiperglucemia causó un aumento en los niveles de expresión IF_1 , pero no alteró la cantidad de IF_1 asociado con ATP sintasa. Los resultados en diversos experimentos apuntan a un nuevo papel de IF_1 en relación con el uso elevado de glucosa por las células tumorales, además de su efecto bien conocido en la regulación de la compleja enzima motora, la ATP sintasa mitocondrial (Barbato y cols., 2015).

Se ha demostrado, una alteración inducida por la hiperglucemia en la organización supramolecular de la ATP sintasa. Esto se plantea como la causa probable de las modulaciones de glucosa inducida ampliamente reportados a la morfología mitocondrial (Barbato y cols., 2015). Se ha descubierto que un aumento de la hiperglucemia induce un aumento en los niveles de expresión IF_1 , mientras que los niveles de ATP sintasa no han sufrido modificaciones. En estos estudios en conclusión se determina que la expresión desregulada de IF_1 en las células

tumorales inducida por la hiperglucemia puede ejercer un efecto no relacionado con el conocido papel en la regulación de IF_1 ATP sintasa, o puede representar el esfuerzo de las células para controlar la actividad de la sintasa de ATP durante condiciones de estrés.

También es muy importante el estudio que se realiza en esta enzima en casos de cáncer de pulmón ya que este sigue siendo la causa más común de muerte por cáncer en todo el mundo. Los pacientes con cáncer de pulmón, tienen una mala evolución clínica con 5 años la tasa de supervivencia de 10% a 15%(Gaoy *cols.*, 2016). A pesar de varios regímenes de terapias tradicionales y novedosos tratamientos se han mejorado y desarrollado, la supervivencia global de los pacientes permanece sin mejora. La mayoría de los pacientes fueron diagnosticados en estadios avanzados y por lo tanto se perdió la mejor oportunidad para curarse. Una comprensión integrada de las moléculas de señalización bioquímica y los factores genéticos relacionados al cáncer podría proporcionar potencial parámetro pronóstico y dianas terapéuticas apropiadas.

En muchos tipos de cáncer especialmente se ha observado que la IF_1 , está supuestamente implicada en la progresión del tumor. Estudios realizados en diversos institutos indican que los niveles de expresión de IF_1 en el cáncer de pulmón son elevados. Se detectan proteínas IF_1 mediante el uso de inmunohistoquímica y otras técnicas de biología molecular. También se ha demostrado que los niveles de expresión IF_1 son significativamente mayores en los tejidos de con metástasis en comparación con los tejidos normales. Por otra parte, se sabe

que la expresión elevada de IF_1 está estrechamente relacionada con metástasis en los ganglios linfáticos y sirve como un indicador pronóstico independiente y recurrente en pacientes con cáncer de pulmón. La expresión de IF_1 puede así ser útil para la evaluación de pronóstico y el tratamiento de pacientes con cáncer (Panfoli y cols., 2011).

En otros tipos de carcinogénesis, el hepatocelular (HCC) es un tumor muy vascularizado (Songy cols., 2014) con metástasis extra hepática frecuente. Sin embargo, los mecanismos que contribuyen a la metástasis tumoral siguen sin estar claros. De nueva forma se han evaluado los efectos del inhibidor IF_1 de la ATPasa, en la angiogénesis y la metástasis. Se encontró que el aumento de la expresión de IF_1 en humanos con cáncer predice poca supervivencia y recurrencia de la enfermedad después de la cirugía. Los pacientes con cáncer que tienen tumores grandes, con la invasión vascular y metástasis, expresaron altos niveles de IF_1 . Los tumores invasivos que sobre-expresan IF_1 fueron presentados por la transición activa epitelio-mesenquimal (EMT) y el aumento de la angiogénesis.

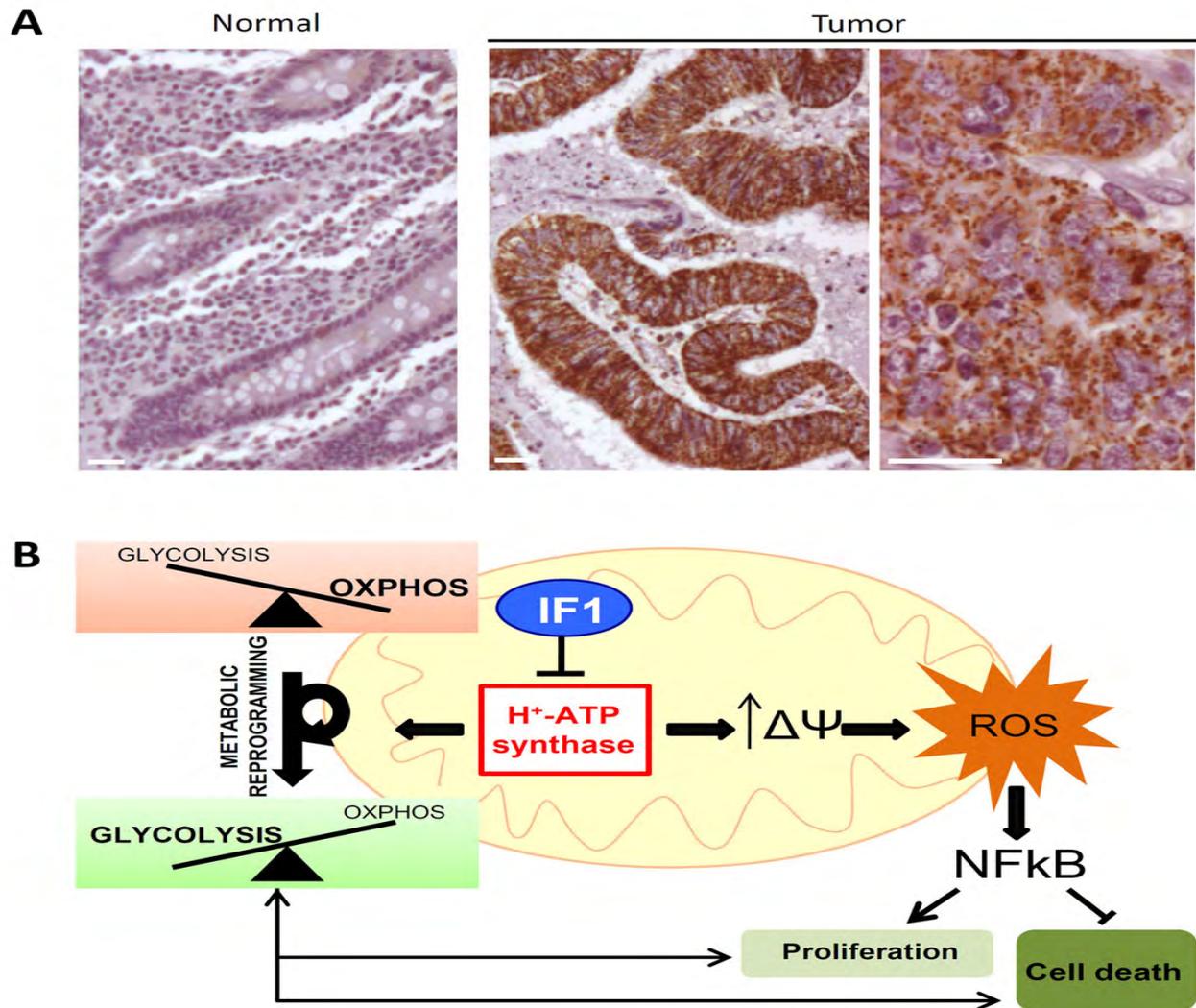


Figura 12. Respuesta celular de IF₁ en condiciones patológicas como carcinogénesis. A) Muestra del tejido epitelial del colon y la sobreexpresión de IF₁. B) La inhibición de la ATPsintasa por IF₁ desencadena la reprogramación metabólica a la glicólisis aeróbica y una respuesta celular adaptativa mediada por ROS. En este modelo la supuesta inhibición de la actividad de la ATP sintasa por la IF₁ desencadena tanto el incremento en glicólisis y la inhibición de la Fosforilación Oxidativa (OXPHOS), como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la proliferación de las células cancerígenas (tomado de Cuezva, y cols., 2011).

EFFECTOS DEL INHIBIDOR IF_1 EN LA MITOCONDRIA DE LA CÉLULA CANCERÍGENA

La IF_1 promueve la angiogénesis y la metástasis HCC (carcinoma hepatocelular) por la sobre regulación de $TNF\alpha$ o Factor de Necrosis Tumoral, proporcionando de esta manera una nueva visión de la progresión de cáncer y la función de la IF_1 .

En distintos artículos se aclara la evidencia estructural que demuestra que la sobreexpresión de la proteína inhibidora (IF_1) en células de cáncer produce una mayor cantidad de asociación con la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial que se encuentra en las células normales. Además, los experimentos de titulación Western Blot permiten la estimación de un aumento relativo de 2 veces de la expresión IF_1 en la mitocondria (Bravo y cols., 2004).

Todo el conjunto de estas investigaciones nos muestran un panorama alentador, ya que se podrá investigar la regulación y relación de manera más específica con el inhibidor IF_1 y la fase anormal de la célula que es la carcinogénesis. No está del todo claro en la actualidad cual es el mecanismo de regulación exacta entre esta importante proteína dentro de la ATP sintasa y una patología celular que causa millones de muertes al año.

F_1F_0 -ATP sintasa es un complejo enzimático estudiado intensamente esto ha permitido relevantes avances en esta molécula para definir su fascinante catálisis. A pesar de este tremendo progreso, muchos aspectos de la fisiología ATP sintasa,

tales como la biogénesis o la formación del complejo, y su papel en la patología son todavía estudiados (Dabbeni-Sala y *cols.*, 2012).

Se pretende estudiar a fondo este mecanismo, evaluar y proponer algunas posibles alternativas que puedan servir para crear tratamientos contra bacterias patógenas en el caso de los inhibidores bacterianos de la enzima, o contra el cáncer en el caso de la IF_1 mitocondrial, así como entender la bioquímica de este. Es de suma relevancia que la enzima más importante del metabolismo energético como lo es la ATPasa y su inhibidor natural IF_1 en un futuro, ayuden a seguir entendiendo aun mecanismos desconocidos y enigmas que la biología y la bioquímica han dejado aún pendientes en aras del progreso en la biomedicina.

CONCLUSIONES

- La ATP sintasa es un nanomotor reversible que requiere de mecanismos de control de la rotación intrínseca de su rotor central.
- Los mecanismos de control se resumen en proteínas inhibitoras que en bacterias son las subunidades ϵ y ζ , y en mitocondrias es la proteína IF_1 .
- Estos inhibidores se unen a un sitio general de inhibición para bloquear la rotación de la subunidad γ de la enzima y bloquear los cambios conformacionales del sitio catalítico en la interfaz α_{DP}/β_{DP} .
- La IF_1 además de su función inhibitoria ejerce un mecanismo de control de la oligomerización de la ATP sintasa que regula la formación de las crestas mitocondriales.
- La IF_1 también tiene un papel en el desarrollo de células cancerosas dado que se sobre-expresa en células neoplásicas y posiblemente tiene un papel en el cambio entre metabolismo glucolítico y metabolismo respiratorio.
- Es de relevancia biomédica el estudiar el efecto de la ablación y sobre-expresión de la IF_1 para determinar su papel en la fisiología celular normal, y en el desarrollo de células neoplásicas y desarrollo de tumor.

BIBLIOGRAFÍA

Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A., and Schägger, H. (1998). "Yeast mitochondrial F1FO-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits". *The EMBO Journal* Vol.17 No.24 pp.7170–7178.

Barbato, S., Gianluca-Sgarbi, G., Baracca, A., & Solaini, G. (2015). The inhibitor Protein (IF1) of the F1FO- ATPase Modulates Human Osteosarcoma Cell Bioenergetics . *The Journal of Biological Chemistry* ,290(10): 6338-6348.

Bason M, Fearnley I, Walker J. (2013). The estructure of F₁-ATPase from *Saccharomyces cerevisiae* inhibited by its regulatory Protein IF₁ *Open Biology*, Royal Society, 3(2):120164.

Bason, J.V., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., Walker, J.E.(2014). Pathway of binding of the intrinsically disordered mitochondrial inhibitor protein to F1- ATPase . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(31):11305-10..

Boyer, PD.(1997). The ATPsynthase a splendid molecular machine. *AnnuRev. Biochemistry.*, 1146(66): 717-749.

Bravo, C., Minauro-San Miguel, F., Morales- Ríos, E., & Rodríguez-Zavala, J. y. (2004). Over-expression of the inhibitor protein IF1 in AS-30D Hepatoma produces a higher association with mitochondrial F1FO ATP synthase compared to normal rat liver: Functional and cross- linking studies. *Journal Bionenergetics and Biomembranes* , 36(3): 257-265.

Barbato, S., Gianluca Sgarbi, G. G., Baracca, A., & Solaini, G. (2015). The inhibitor Protein (IF1) of the F1FO-ATPase Modulates Human Osteosarcoma Cell Bioenergetics. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(10): 6338-6348.

Cabezón, E., Butler, P.J., Runswick, M.J., Walker, J.E. (2000) Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *J Biol Chem*. 275(33):25460-4.

Cabezón, E., Montgomery, M., A. L., & Walker, J. (2003). The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nat Struct Biology*, 10(9): 744-750.

Campanella, M., Parker, N., Tan, C. H., & Hall, A. M. (2009). IF1: Setting the pace of the F1FO-ATP synthase. *Trends in Biochemical Sciences* (34)4: 3433-3450.

Cano-Estrada, & González-Halphen, D. (2011). F1FO-ATP Sintasa y sus diferencias estructurales. *Revedubio* 30(3): 98-108.

Chaban Y, B. E. (2014). Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1837 (4): 418-426.

Cingolani, G., & Duncan, T. (2011). Structure of the ATP synthase catalytic complex (F1) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation. *Nat Struct Mol Biol.* , 18(6): 701-707.

Chimeo C, Fernandez-Gimenez AV, Campanella M, Mendez-Romero O, Muhlia-Almazan A. (2015). The shrimp mitochondrial FO F1-ATPase inhibitory factor 1 (IF1) . *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 47(5): 383-393.

Cortés-Hernández, P., Vázquez-Memije, M., & García, J.J.. (2007). "ATP6 homoplasmic mutations inhibit and destabilize the human F1FO-ATP synthase without preventing enzyme assembly and oligomerization". *Journal of Biological Chemistry* , 282(2): 1051-1058.

Cogliati, S. E. (2016). Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Cell Press*, 41 (3): 261-273.

Couoh-Cardel SJ, Uribe-Carvajal C, Wilkens S, García-Trejo JJ. (2010). Structure of dimeric F1F0-ATP synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 285 (47): 36447-55.

Cramer, W. y Knaff, D. (1991) "Energy transduction in biological membranes". Editorial: Springer-Verlag. ISBN: 0-387-97533-0.

Dabbeni-Sala, F., Kumar Rai, A. , & Lippe, G. (2012). FOF1 ATP Syntase: A fascinating Challenge for Proteomics. *Proteomics - Human Diseases and Protein Functions*, Prof. Tsz Kwong Man (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/31082. Pag.161-188.

de la Rosa-Morales, F. (2005),“Composición de subunidades y mecanismo de regulación de la F₁F₀-ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans*”. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autonoma de Mexico (U.N.A.M.), Direccion General de Bibliotecas. Asesor: Jose J. Garcia-Trejo

Domenis, R., Bisetto, E., Rossi, D., Comelli, M., & Mavelli, I. (2012). “Glucose-Modulated Mitochondria Adaptation in Tumor Cells: A Focus on ATP Synthase and Inhibitor Factor 1”. *International Journal of Molecular Sciences* , 1422(13): 1933-1950.

Eyrich, B., Sickman, A., Zahedi, & R. (2011). Catch me if you can: Mass spectrometry based phosphoproteomics and quantification strategies. . *Proteomics*, 11(4): 554-570.

Faccenda, D., Seraphim, A., & Campanella, M. (2013). “IF1 limits the apoptotic-signalling cascade by preventing mitochondrial remodelin” . *Nature* , 20(5): 686-697.

Fernández-Morán, Efraím Racker y Maynard Pullman *J Cell Biol* 22:71, 1964

Formentini, L., Sánchez-Argó, M., Sánchez-Cenizo, L., & Cuezva, J. (2012). The mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 triggers a ROS- mediated retrograde prosurvival and proliferative response. *Cell* 45(11): 731-742.

Gao, C., Shen, Y., Jin, F., Miao, Y., Qiu, X. (2016). "Higher Dependency on Oxidative Phosphorylation and Mitochondrial Substrate-Level Phosphorylation than Non-Stem Cancer Cells". *PLoS One*. 11; 11(5):e0154576.

García-Bermúdez, C. J. and Cuezva, J.M. (2016). "The ATPase inhibitory Factor 1 (IF1) A Master Regulator of Energy Metabolism and of Cell survival". *Biochimica et Biophysica Acta* , 1857(8): 1167-1182.

García, J. J., Ogilvie, I., Robinson, B. H., and Capaldi, R. A. (2000). Structure, Functioning, and Assembly of the ATP Synthase in Cells from Patients with the T8993G Mitochondrial DNA Mutation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (15): 11075-11081.

García, J.J., Morales-Ríos, E., Cortés-Hernández, P., Rodríguez-Zavala, J.S. (2006) "The inhibitor protein (IF₁) promotes dimerization of the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase". *Biochemistry (USA)*. 45(42):12695-703

García-Trejo, J.J. (2002) "Recent Research Developments in Human Mitochondrial Myopathies". Transworld Research Network. Trivandrum, India Editor: ISBN: 81-7736-139-2. Vol. 1. 1ª Edición.

García-Trejo, J.J. (2006). "Vida y obra del monómero y del dímero de la F₁F₀-ATP sintasa mitocondrial y de sus sucursales en la membrana plasmática" . *Mensaje Bioquímico (Facultad de Medicina, UNAM)* , 30: 147-166.

García-Trejo, J.J. and Morales Ríos, E. (2008). "Regulation of the F₁F₀-ATP synthaserotarynanomotor in itsmonomeric-bacterial and dimeric-mitochondrialforms". *Journal of Biological Physics*. 34:197-212

García-Trejo, J. J., & Morales-Ríos, E. (2011). "Estructura y regulación del nanomotor que le da energía a la vida: la F₁F₀-ATP sintasa". *Mensaje Bioquímico (Facultad de Medicina)* , 35: 39-51.

García-Trejo, J., Zarco-Zavala, M., & Morales-Ríos, E. (2012). "Estructura y mecanismo de la nueva subunidad inhibitoria ζ F₁F₀ ATP sintasa de las α -proteobacterias en *Paracoccus denitrificans*". *Mensaje Bioquímico (Facultad de Medicina)* , 36: 106-126.

García-Trejo, J.J., Zarco-Zavala, M., Mendoza-Hoffmann, F., Hernández-Luna, E., Ortega, R., and Mendoza-Hernández. G. (2016) "The inhibitory mechanism of the ζ subunit of the F₁F₀-ATPase nanomotor of *Paracoccus denitrificans* and related α -proteobacteria". *The Journal of Biological Chemistry*. 291(2): 538-546.

Glendhill, J., Montgomery, M., Leslie, A., & J., W. (2007). "How the regulatory protein, IF (1), inhibits F (1)-ATPase from bovine mitochondria". *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* ,104(40): 15671-15676.

Gómez-Puyou, A., Gómez-Puyou, M., & Ernster, L. (1979). "Inactive to active transitions of the mitochondrial ATPase complex as controlled by the ATPase inhibitor". *Biochimica et Biophysica Acta* ,547(2): 252-257.

Gomis-Rüth, F.X., Moncalián, G., Pérez-Luque, R., González, A., Cabezón, E., de la Cruz, F., & Coll, M. (2001). The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature*, 409 (6820): 637-641.

Hayashi, S., Ueno, H., Rajjak, A., & Kamiya, M. (2012). "Molecular Mechanism of ATP Hydrolysis in F1-ATPase Revealed by Molecular Simulations and Single-Molecule Observations". *Journal of American Chemical Society* ,134(20): 844-847.

Houstek, J., Pícková, A., Vojtísková, A., Pecina, P., Jesina, P. (2006). Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1757 (9-10), 1400-5.

Ivanec, F., Faccenda, D., Gatliff, J., & Campanella, M. (2013). "The compound BTB06584 is an IF1-dependent selective inhibitor of the mitochondrial F1Fo-ATPase". *British Journal of Pharmacology* ,171(18): 4193-4206.

Jackson, P., & Harris, D. (1998). "The mitochondrial ATP synthase inhibitor protein binds near the C-terminus of the F1 beta-subunit". *FEBS Lett.*, 229(1):224-8.

Junge, W., & Nelson, N. (2015). ATP Synthase. *The Annual Review of Biochemistry, Universitat Osnabruck, Department of Biochemistry* 33(1): 33.27.

Kucharczyk, R., Salin, B., & di Rago, J. (2011). Introducing the human Leigh syndrome mutation T9176G into *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA leads to severe defects in the incorporation of Atp6p into the ATP synthase and in the mitochondrial morphology. *Human Molecular Genetics* , 18(15): 2889-2897.

Kucharczyk, R., Zick, R., Bietenhader, M., & Blondel, M. (2011). Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research* , 1793(1): 186-199.

Le Breton, N., & Guillaume, G. (2016). "Dimerization interface and dynamics properties of yeast IF1 revealed by Site Direct Spin Labeling EPR spectroscopy." . *Biochimica et Biophysica Acta* , 1857(1): 89-97.

Long, Q., Yang, K., & Yang, Q. (2015). Regulation of mitochondrial ATP synthase in cardiac pathophysiology. *American Journal of Cardiovascular Disease* , 5(1): 19-32.

Lu, Y., Miyazawa, K., Yamaguchi, K., & Hashimoto, T. (2001). Deletion of mitochondrial ATPase inhibitor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* decreased cellular and mitochondrial ATP levels under non-nutritional conditions and induced a respiration-deficient cell-type. *Journal Biochem* , 130(6): 873-878.

Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., & García, J. (2002). "Cross-linking of the endogenous inhibitor protein (IF1) with rotor (γ,ϵ) and stator (α) subunits of the mitochondrial ATP synthase". *Journal Bioenergetics and Biomembranes* , 34(6): 433-443.

Minauro-Sanmiguel F, Wilkens S, García JJ. (2005). Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F₀ bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 102 (35), 12356-8.

Miranda-Astudillo, H. (2012). Estructura y Función de la ATP Sintasa de las Arqueas Aeróbicas. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 2 (15): 104-115.

Mitchell, P. (1961) "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism". *Nature* 191: 144-148.

Mitchell P. (2011). "Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. 1966". *Biochim Biophys Acta. (BBA-Bioenergetics)* 1807(12): 1507-38

Morales Ríos, E., De la Rosa-Morales, F., Mendoza-Hernández, M, Rodríguez-Zavala, J.S., Celis, H., and García-Trejo, J.J. (2010) "A novel 11kDa inhibitory subunit in the F₁F₀-ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related α -proteobacteria". *The FASEB Journal*. 24(2): 599-608

Morales-Ríos, E., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., García-Trejo, J.J., & Walker J.E.(2015) Structure of a catalytic dimer of the α - and β -subunits of the F-ATPase from *Paracoccus denitrificans* at 2.3 Å resolution. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 71(Pt 10):1309-17.

Morales-Ríos E, Montgomery, M.G., Leslie, A.G. W., García-Trejo, J. J. and Walker, J.E. (2015). Structure of a catalytic dimer of the α - and β -subunits of the F-ATPase from *Paracoccus denitrificans* at 2.3 Å resolution. *Acta Cryst*, 2053 (330): 1309-1317.

Morales-Ríos E, Montgomery MG, Leslie AG, Walker JE. (2015) Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(43):13231-6.

Nakamura J. & Yoshida M. (2013). IF1, a natural inhibitor of mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice. *BIOSCIENCE REPORTS*, 33(5) 571–576.

Nakanishi-Matsui M, Sekiya M, Futai M. (2016). ATP synthase from *Escherichia coli*: Mechanism of rotational catalysis, and inhibition with the ϵ subunit and phytopolyphenols. *Biochimica et biophysica acta*, 1857 (2), 129-140.

Nelson, D.L. y Cox, M. (2017) "Lehninger Principles of Biochemistry", 7ª Edición. W.H. Freeman & Co (Editores). ISBN-10: 1464126119. ISBN-13: 978-1464126116.

Ohsakaya, S., Fujikawa, M., & Yoshida, M. (2011). Knockdown of DAPIT (diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue) results in loss of ATP synthase in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* , 283(23): 20292-20296.

Panfoli, I., Ravera, S., Bruschi, M., & Morelli, A. (2011). Proteomics unravels the exportability of mitochondrial respiratory chains. *Review Proteomics* , 8(2): 231-239.

Pullman, M., & Monroy, G. (1963). A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry* ,238: 3762-3769.

Racker, E. (1980). From Pasteur to Mitchell: a hundred years of bioenergetics . *Federation Proceedings* , 39(2): 210-215.

Reedy, P. O. (2015). Selective Elimination of Mitochondrial Mutation in the Germline by Genome Editing. *Cell*, 161: 459-469.

Ristow, M. (2014). Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS induced health benefits. *Nature Medicine* , 20(7): 709-711.

Sanchez-Aragó, M., Formentini, L., Martínez-Reyes, I., Bermúdez, G., & Sánchez-Cenizo. (2013). Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers. *Nature* ,22(2): 130-143.

Schägger, H. (2002). Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1555 : 154-159.

Seelert, H., Dencher, N. A. (2011). ATP syntase superassemblies in animals and plants: Two or more are better. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807: 1185-1197.

Serrano P, Geralt M, Wüthrich K. (2014). NMR structures of α -proteobacterial ATPase-regulating ζ -subunits. *Journal of Molecular Biology*, 426 (14), 2547–2553.

Shirakihara, Y., Shiratori, A., Tanikawa, H., & Suzuki, T. (2015). Structure of a thermophilic F1-ATPase inhibited by an e-subunit: deeper insight into the e-inhibition mechanism. *FEBS Journal* , 282(15): 238-247.

Sobti, M, Smits, C, Stock D, Sandin S, Stewart A. (2016). Cryo-EM structures of the autoinhibited. *e life sciences*, 10 (7554): 1-18.

Song R, Song H, Liang Y, Yin D, Zhang H, Zheng T, Wang J, Lu Z, Song X, Pei T, Qin Y, Li Y, Xie C, Sun B, Shi H, Li S, Meng X, Yang G, Pan S, Zhu J, Qi S, Jiang H, Zhang Z, Liu L. (2014) Reciprocal activation between ATPase inhibitory factor 1 and NF- κ B drives hepatocellular carcinoma angiogenesis and metastasis. *Hepatology*, 60(5):1659-73.

Sternweiss, P.C., & Smith, J.B. (1980). Characterization of the inhibitory (epsilon) subunit of the proton-translocating adenosine triphosphatase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 19(3): 526-531.

Suzuki T, Wakabayashi C, Tanaka K, Feniouk BA, Yoshida M. (2011). Modulation of nucleotide specificity of thermophilic F(o)F(1)-ATP Synthase by epsilon-subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (19): 16807-16813.

Symersky J., Osowski, D., Walters, D.E, Mueller, D.M.(2012) Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase. *Proc. Natl. Acad.Sci. U S A*. 109(35):13961-5.

Tuena de Gómez-Puyou MT, Muller U, Dreyfus G, Ayala G, Gómez-Puyou A. 1983 Regulation of the synthesis and hydrolysis of ATP by mitochondrial ATPase. Role of the natural ATPase inhibitor protein. *J. Biol. Chem.* 258(22):13680-4.

Tuena de Gómez-Puyou, M. y García-Trejo, J.J. (2015) "La bioenergética, las mitocondrias y la fosforilación oxidativa" *Revista Digital Universitaria* (RDU, UNAM, México, en línea). 16(1):1-15. <<http://www.revista.unam.mx/vol.16/num1/art05/index.html>> ISSN: 1607-6079.

Tsunoda, S.P., Rodgers, A.J., Aggeler, R., Wilce, M.C., Yoshida, M., y Capaldi, R.A. (2001) Large conformational changes of the epsilon subunit in the bacterial F1F0 ATPsynthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 98(12):6560-4.

Vázquez-Memije, M., & García, J. J. (2002). Human ATPase 6 mutations: molecular mechanisms of pathology. *Transworld Research Network* , 151-171.
Yi-Xing, G., Chen, L., Gang, X., Wu, H., Cui, Y., & Zhang, X. (2016). ATPase inhibitory factor 1 eexpression is an independent prognostic facor in non- small cell lung cancer . *Journal Cancer Res* , 1141-1148 .

Vazquez-Martín, B., Corominas-Faja, S., & Cufi, L. (2013). The mitochondrial H (+)-ATP synthase and the lipogenic switch: new core components of metabolic reprogramming ininduced pluripotent stem (iPS) cells. *Cell* , 12(2): 217-218.

Wei, S., Fukuhara, H., Kawada, C., Kurabayashi, A., Furihata, M., Ogura, S., (2015). Silencing of ATPase inhibitory factor 1 inhibits cell growth via cell cycle arrest in bladder cancer. *Pathobiology: Journal of Pathobiology* , 82(5): 224-232.

Wittig, I. y Schägger, H. (2008). Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochimica Biophysca et Acta*, 1777 (7-8): 592-598.

Yi-Xing, G., Chen, L., Gang, X., Wu, H., Cui, Y., & Zhang, X. (2016). ATPase inhibitory factor 1 eexpression is an independent prognostic facor in non- small cell lung cancer . *Journal Cancer Res* , 6(5): 1141-1148 .

Zarco-Zavala, M., Morales-Ríos, E., Serrano-Navarro, Wuthrich, K., Ramírez-Silva, L., & García-Trejo, J.J. (2013). The ζ subunit of the α -proteobacterial F1FO-ATP synthase in *Paracoccus denitrificans*: A novel control mechanism of the central rotor. *Biochimica et Biophysica Acta* , 28(5): 2146-2157.

Zarco-Zavala, M., E, M.-R., Mendoza- Hernández, G., & García-Trejo, J. (2014). The ζ subunit of the F1FO-ATP synthase of α -proteobacteria controls rotation of the nanomotor with a different structure. *The FASEB journal* , 28(5): 2146-2157.

Zhang, S., Shan, C., Kong, G., Du, Y., Ye, L., & Zhang, X. (2012). MicroRNA-520e suppresses growth of hepatoma cells by targeting the NF- κ B-inducing kinase (NIK). *Oncogene* , 31(31): 3607-3620.