



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización funcional de una proteína hipotética con dominio DUF1476 de *Rhodobacter sphaeroides*; posible actividad inhibitoria de la F₁F₀-ATPasa

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Jorge Brito Sánchez

TUTOR PRINCIPAL
Dr. José de Jesús García Trejo
[Facultad de Química, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Diego González Halphen
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dr. Salvador Uribe Carvajal
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. Enero, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

La presente tesis está dedicada a la memoria del Dr. Heliodoro Celis Sandoval, Q. E. P. D., quien, además de ser mi profesor durante gran parte de la licenciatura y miembro de mi comité tutor de maestría, también fue un gran amigo.

Su pasión por la ciencia, la historia, la antropología y el fútbol se veía reflejada en cada momento y cada plática que compartía con sus alumnos, colegas y amigos; cuando pensabas que ya lo habías escuchado todo, siempre había algo más, una anécdota más de cómo la nieve le llegaba hasta las rodillas en los helados días invernales de Bristol, Inglaterra, donde realizó parte de sus estudios de doctorado, una anécdota más de cómo se fundó el Instituto de Fisiología Celular en la década de 1970 a partir una iniciativa entre el Instituto de Biología y la Facultad de Medicina, una anécdota más de cómo Van Niel fue el primer científico en demostrar (utilizando bacterias púrpuras sulfurosas) que el agua es el agente reductor durante la fotosíntesis y no el CO₂, como se pensaba anteriormente, una anécdota más de cuando vio jugar al Real Madrid en el Santiago Bernabéu y quedó impresionado con la precisión y eficacia con la que el equipo manejaba el esférico y, en cuestión de segundos, pasaban de su área al arco rival.

Los variados intereses del Dr. Celis hacían de él una persona muy completa e interesante, era capaz de entablar conversación con una gran diversidad de personas y dar su sensato punto de vista acerca de una basta cantidad de temas, razón por la que siempre será recordado y su memoria siempre vivirá en todas las personas que tuvimos la grata oportunidad de convivir él.

Agradecimientos

A mi mamá, Gudelía Sánchez, gracias a ti, a tu apoyo y amor incondicional, gran parte de este proyecto ha sido posible. Muchas gracias por estar siempre ahí, al pendiente de mí salud y bienestar, gracias por apoyarme en esos días en los que mi rutina consistía en despertar, escribir la tesis y dormir. Gracias por todas tus enseñanzas vitales y esfuerzos que me han formado como persona. Eres la mejor mamá del infinito universo, te amo para siempre.

A mi papá, Jorge Brito, gracias por todos tus consejos, enseñanzas y apoyo incondicional. Gracias por estar siempre para mí y apoyarme en los días buenos y adversos. Gracias por todos tus esfuerzos para darnos a mi hermano y a mí un techo para vivir. Te amo papá.

A mis amigos del laboratorio, Gil, Joss, Sharon, Angie, Manuel y Adán. Realizar la Maestría ha sido una de las experiencias más gratificantes de mi vida y, en gran parte, ha sido gracias a que tuve la oportunidad de conocerlos y convivir con ustedes. Siempre estarán en mi memoria esas retas vespertinas de basket, las partidas de UNO, de CoD y de ajedrez, las salidas a perrekes, las rodadas en la bike, las salidas a trepar cerros, el Congreso de Bioenergética y un alud de experiencias que disfrutamos juntos. Los amo infinitamente a todos. En especial, quiero agradecer a Gil por todas las pláticas enriquecedoras que tuvimos; desde tópicos relativamente triviales (como, ¿quién es mejor? ¿Cristiano Ronaldo o Messi?) a tópicos más profundos (como, el significado e interpretación de la mecánica cuántica o si las especies son reales o son un constructo humano). Siempre es un placer platicar contigo, ya que sueles tener una posición de neutralidad (o balanceadora) y tu opinión suele apegarse a la evidencia y datos disponibles. También te quiero agradecer por enseñarme y ayudarme a purificar la proteína Rsζ; eres el mejor.

A mi tutor, el Dr. José de Jesús, por su apoyo incondicional durante toda la Maestría, por introducirme en el campo de la ATPasa, de la subunidad ζ y porque gracias a todas sus explicaciones y seminarios, ahora entiendo la gran importancia de los reguladores endógenos de la ATPasa para la bioenergética celular. Gracias por enseñarme técnicas que nunca antes había realizado, como determinar la actividad de la ATPasa espectrofotométricamente.

A los integrantes de mi Comité Tutor, el Dr. Diego González Halphen, el Dr. Salvador Uribe Carvajal y el Dr. Heliodoro Celis. Gracias por sus observaciones y consejos técnicos y metodológicos proporcionados durante los tutorales, ya que fueron de gran ayuda para la realización y terminación de este trabajo, así como para mi formación profesional. Quiero agradecer al Dr. Salvador Uribe Carvajal por aceptar integrarse a mi Comité Tutor de último momento, tras el desafortunado fallecimiento del Dr. Heliodoro Celis.

A los integrantes de mi Jurado de Examen, el Dr. Georges Dreyfus, la Dra. Leticia Haydeé Ramírez Silva, la Dra. Irma Romero Álvarez, el Dr. Héctor Riveros Rosas y la Dra. Rosa Laura Camarena Mejía, gracias, por tomarse el tiempo de leer y revisar el presente trabajo y gracias por todas sus sensatas observaciones. Fue muy enriquecedor leer sus comentarios con respecto al presente trabajo y realizar las correcciones correspondientes.

Gracias a ustedes fue posible darle una mejor estructura y una argumentación más robusta a la presente tesis. De corazón, gracias a todos.

A Claudia Peña, por el amor y apoyo incondicional que me ha brindado durante gran parte de la licenciatura y durante toda la maestría. Te quiero mucho, Clau, eres la mejor y sabes que cuentas conmigo para todo.

A Gilberto Garduño Javier por facilitarme la construcción pET3a/ RSP_2125, lo cual permitió agilizar el proceso de obtención y estudio de la proteína recombinante Rsζ. De corazón, gracias.

Al Dr. Heliodoro Celis (Q. E. P. D.), del Instituto de Fisiología Celular, por proporcionarnos las cepas de *R. rubrum* ATCC 11170 y *R. sphaeroides* 2.4.1. De corazón, gracias.

Al Dr. José Salud Rodríguez Zavala, adscrito al Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chávez", México, por facilitarnos el vector de expresión pT7-7. De corazón, gracias.

A la Dra. Gloria Alcántara Hernández, adscrita al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, por facilitarnos el vector de expresión pET3a y la enzima NdeI. De corazón, gracias.

A la Dra. Laura Ongay-Larios y a su grupo en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, por la secuenciación de las construcciones pET3a/ RSP_2125 y pJET1.2/Rru_A0714.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP), por el apoyo económico para asistir al XXI Congreso de Bioenergética y Biomembranas, el cual se llevo a cabo del 10 al 14 de noviembre del 2019 en San Luis Potosí, SLP, México.

Abreviaturas

ADP: adenosín difosfato
AMP-PNP: adenilil imidodifosfato
AMT: péptidos etiqueta de masa precisa
ATP: adenosín trifosfato
BLASTp: herramienta básica de búsqueda de alineación local en secuencias proteicas
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
dNTPs: deoxinucleósidos trifosfato
DUF1476: familia de proteínas bacterianas con dominio de función desconocida
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
F_O: dominio membranal de la ATPasa
F₁: dominio citosólico de la ATPasa
F₁F_O ATPasa: ATPasa que cuenta con ambos dominios unidos, el F₁ y el F_O
FADH: flavín adenín dinucleótido reducido
FPM: fuerza protón motriz
FT-ICR: espectrometría de resonancia ciclotrónica por transformada de Fourier
IC₅₀: concentración de inhibidor en la que se inhibe el 50 % de la actividad enzimática
IF₁: factor inhibitorio 1
IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
Jsζ: proteína inhibitoria ζ de *Jannaschia* sp.
LC: cromatografía líquida
LDAO: óxido de laurildimetilamina
LDH: lactato deshidrogenasa
LHC1: complejo antena 1
LHC2: complejo antena 2
MCS: sitio de clonación múltiple
MI: membrana interna
MS: espectrometría de masas
NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NAD(P)⁺: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
Ni-NTA: Ni²⁺-ácido nitrilotriacético
ORF: marco abierto de lectura
OSCP: proteína que confiere sensibilidad a oligomicina
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
Pdζ: proteína inhibitoria ζ de *P. denitrificans*
PEP: fosfoenolpiruvato
Pi: fosfato inorgánico
PI: punto isoeléctrico
PK: piruvato cinasa
PMT: péptidos potenciales de etiqueta de masa
PSB: partículas subbacterianas
PSM: partículas submitocondriales

Q_A: quinona primaria
Q_B: quinona secundaria
RC: centro de reacción
REDOX: proceso o estado que involucra una o múltiples reacciones de reducción-oxidación
RMSD: raíz de la desviación cuadrática media
Rr ζ : subunidad ζ de *R. rubrum*
RrF₁F₀-ATPasa: complejo F₁F₀-ATPasa de *R. rubrum*
RsF₁F₀-ATPasa: complejo F₁F₀-ATPasa de *R. sphaeroides*
Rs ζ : subunidad inhibitoria ζ de *R. sphaeroides*
RubisCO: ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/reductasa
Ta: temperatura de alineamiento
tBLASTn: herramienta básica de búsqueda de alineación local que convierte secuencias proteicas a secuencias nucleotídicas
TMAO: N-óxido de trimetilamina

Índice

| | |
|--|----|
| Dedicatoria ----- | 2 |
| Agradecimientos ----- | 3 |
| Abreviaturas ----- | 5 |
| Índice ----- | 7 |
| Resumen ----- | 9 |
| Introducción ----- | 10 |
| Importancia de la ATPasa----- | 10 |
| Distribución en la naturaleza----- | 10 |
| Estructura procarionte y eucarionte----- | 11 |
| Mecanismo catalítico y de transporte de protones----- | 14 |
| Inhibidores endógenos reguladores de la ATPasa/hidrolasa (ϵ , γ/ϵ , IF ₁ y ζ)----- | 19 |
| Subunidad ϵ ----- | 20 |
| Subunidades γ/ϵ ----- | 22 |
| Factor inhibitorio 1 (IF ₁)----- | 22 |
| Subunidad ζ ----- | 26 |
| <i>Rhodobacter sphaeroides</i> como modelo de estudio----- | 30 |
| Generalidades----- | 30 |
| Cadena respiratoria y transportadores de electrones----- | 31 |
| Aparato fotosintético y transporte cíclico de electrones----- | 32 |
| Metabolismo fotoheterótrofo----- | 34 |
| ATPasa y cromatóforos----- | 35 |
| Justificación y antecedentes ----- | 38 |
| Objetivos ----- | 40 |
| Materiales y métodos ----- | 41 |
| Análisis estructural comparativo de diferentes proteínas ζ ----- | 41 |
| Cepas y vectores plasmídicos----- | 41 |
| Cultivo y crecimiento de las cepas----- | 42 |
| Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α con la construcción pET3a/RSP_2125, digestión y visualización en gel de agarosa----- | 43 |
| Transformación de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pLysS con la construcción pET3a/RSP_2125, digestión, visualización en gel de agarosa y secuenciación----- | 43 |
| Pruebas de inducción con IPTG----- | 45 |
| Purificación de la proteína recombinante Rs ζ ----- | 45 |
| Ensayos de actividad de ATPasa e inhibición por Rs ζ ----- | 46 |
| Búsqueda bioinformática del gen que codifica para la proteína ζ <i>R. rubrum</i> (Rru_A0714)----- | 48 |
| Diseño de cebadores----- | 48 |
| Extracción y cuantificación de DNA genómico de <i>R. rubrum</i> ----- | 49 |

| | |
|---|----|
| Amplificación de Rru_A0714 mediante PCR----- | 49 |
| Visualización del amplicón Rru_A0714 en gel de agarosa----- | 50 |
| Purificación y secuenciación de Rru_A0714----- | 50 |
| Clonación de Rru_A0714 en pJET1.2 blunt y transformación de <i>E. coli</i> DH5 α ----- | 50 |
| Extracción de DNA plasmídico (pJET1.2/Rru_A0714) a partir de células transformantes----- | 50 |
| Digestión, visualización de las construcciones pJET1.2/Rru_A0714 y secuenciación----- | 51 |
| Subclonación de Rru_A0714 en pT7-7 y pET3a y transformación de <i>E. coli</i> DH5 α ----- | 51 |
| Resultados ----- | 53 |
| Análisis estructural comparativo de la proteína ζ ----- | 53 |
| Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α con la construcción pET3a/RSP_2125, digestión y visualización en gel de agarosa----- | 56 |
| Transformación de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pLysS con la construcción pET3a/RSP_2125, digestión y visualización en gel de agarosa----- | 57 |
| Pruebas de inducción con IPTG----- | 58 |
| Purificación de la proteína Rs ζ ----- | 59 |
| Cuantificación de proteína por el método de Lowry----- | 64 |
| Ensayos de actividad de ATPasa e inhibición por la proteína Rs ζ ----- | 64 |
| Amplificación y purificación del gen Rru_A0714 Rr ζ ----- | 66 |
| Clonación de Rru_A0714 en pJET1.2 y transformación de <i>E. coli</i> DH5 α ----- | 66 |
| Discusión ----- | 68 |
| Inhibición de la ATPasa por la subunidad Rs ζ ----- | 68 |
| Actividad hidrolítica de la ATPasa----- | 69 |
| Comparación estructural de las diferentes subunidades ζ e hipótesis evolutiva----- | 71 |
| Elusión inesperada de la proteína Rs ζ en los lavados de la columna DEAE----- | 74 |
| Obtención de células transformantes estables de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pLysS pET3a/RSP_2125----- | 75 |
| Dificultades asociadas a la subclonación del gen Rru_A0714 en un vector de expresión----- | 76 |
| Conclusiones ----- | 79 |
| Observaciones finales y logros ----- | 80 |
| Anexos ----- | 81 |
| Referencias ----- | 86 |

Resumen

La F_1F_0 -ATP sintasa es un complejo proteico enzimático que realiza la síntesis de ATP gracias al gradiente electroquímico de protones; este gradiente produce el giro del rotor central $\gamma\epsilon_{10-15}$ del complejo en sentido horario y es esencial para la síntesis de ATP en el dominio F_1 . Sin embargo, la F_1F_0 -ATPasa también cuenta con la capacidad de hidrolizar ATP cuando la rotación de $\gamma\epsilon_{10-15}$ ocurre en sentido antihorario.

Diferentes subunidades han adquirido la capacidad de actuar como reguladores endógenos de la actividad hidrolítica de la ATPasa, por ejemplo, la subunidad zeta (ζ) en α -proteobacterias, una proteína exclusiva de este grupo y que es identificada como una proteína con dominio DUF1476.

Ensayos cinéticos en *Paracoccus denitrificans*, una α -proteobacteria, revelaron que las subunidades Pd ζ (de *P. denitrificans*) y Js ζ (de *Jannaschia* sp), inhiben la actividad hidrolítica de la F_1 -ATPasa de *P. denitrificans*, además, se identificó a la región conservada N-terminal como responsable de esta capacidad inhibitoria. Sin embargo, la subunidad ζ de α -proteobacterias del orden de las Rhizobiales no inhibe a su propia ATPasa, lo que sugiere que la función inhibitoria de ζ se ha perdido a lo largo de la evolución de las α -proteobacterias.

En *Rhodobacter sphaeroides*, una α -proteobacteria púrpura no sulfurosa, se ha mostrado la presencia de la subunidad regulatoria ζ en su F_1F_0 -ATPasa, por lo que todos los esfuerzos del presente trabajo están enfocados en determinar si la proteína hipotética con dominio de función desconocida (DUF1476) de *R. sphaeroides* (Rs ζ) tiene una función inhibitoria sobre la F_1F_0 -ATPasa de esta bacteria. Para ello, se realizaron alineamientos de las secuencias proteicas de ζ de *R. sphaeroides* (Rs ζ) y de *Rhodospirillum rubrum* (Rr ζ) con subunidades ζ de otras α -proteobacterias, algunas en las que ya se ha confirmado la actividad inhibitoria, y se construyeron modelos estructurales *in silico* de Rs ζ y Rr ζ , con el fin de encontrar homología estructural con la subunidad Pd ζ . Además, se identificó, amplificó, purificó y clonó el marco abierto de lectura de la subunidad Rr ζ en un vector plasmídico, lo cual permitirá el estudio futuro de este polipéptido a nivel de estructura y función. Mientras que la subunidad recombinante Rs ζ fue sobreexpresada, purificada (ya se expresó y purificó la proteína) y utilizada para realizar ensayos de inhibición sobre la ATPasa en cromatóforos aislados de *R. sphaeroides*.

Los alineamientos de secuencia y la sobreposición estructural de las subunidades Rs ζ , Rr ζ y Pd ζ , revelaron altos niveles de identidad y de homología estructural; al comparar sólo los primeros 20 residuos de la región conservada N-terminal los niveles de identidad alcanzaron un máximo de 52.6 % y 90 % entre las subunidades Rr ζ -Pd ζ y Rs ζ -Pd ζ , respectivamente. Las sobreposiciones estructurales de Rs ζ y Rr ζ con Pd ζ tuvieron una RMSD de 0.956 Å y 0.916 Å, respectivamente. Estos resultados permitieron sugerir que la función inhibitoria de la subunidad ζ en bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas se conserva, por lo que se hicieron ensayos de inhibición sobre la ATPasa en cromatóforos aislados de *R. sphaeroides* utilizando la subunidad Rs ζ recombinante purificada. Los ensayos de inhibición revelaron, por primera vez, que la subunidad ζ actúa como inhibidor en las α -proteobacterias fotosintéticas, con una IC_{50} aparente de ~ 114 nM y una inhibición similar a la reportada para las subunidades Pd ζ ($IC_{50} \sim 200$ nM) y Js ζ ($IC_{50} \sim 200$ nM). En conjunto, los altos niveles de identidad, similitud estructural y ensayos de inhibición, sugieren que la función regulatoria de la subunidad ζ sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa, se conserva en el grupo de las α -proteobacterias fotosintéticas.

Introducción

Importancia de la ATPasa

El adenosín trifosfato (ATP) es una molécula con una amplia variedad de funciones, entre las cuales destaca el aporte de energía química a diferentes procesos celulares; el funcionamiento adecuado de la mayoría de las vías metabólicas celulares depende de la disponibilidad de ATP. Sin embargo, las funciones del ATP van más allá de aportar energía, este juega un papel crucial durante los procesos de replicación de DNA y transcripción de RNA y en la activación de aminoácidos durante la síntesis de proteínas, funciona como coenzima en procesos de fosforilación (Neupane *et al.*, 2019) y es una importante molécula señalizadora de diferentes procesos celulares, por ejemplo, activando receptores purinérgicos (como el P2X y el P2Y) en células nerviosas, favoreciendo un correcto funcionamiento del sistema nervioso (Khakh y Burnstock, 2009).

De acuerdo a la dieta promedio de los mexicanos (~2000 kcal diarias; Batis *et al.*, 2016), se estima un consumo energético por hora de ~83.33 kcal y un requerimiento de 85 kg de ATP diariamente. Además, la síntesis y consumo del ATP están ligadas fuertemente, ya que esta es una molécula poco estable en solución acuosa y no se puede almacenar para fines energéticos (Bonora *et al.*, 2012), lo que hace de la síntesis de este nucleótido uno de los procesos fisiológicos más frecuentes (Rich, 2003). La F₁F₀-ATPasa es considerado el complejo proteico mecanoenzimático responsable de sintetizar la mayor parte del ATP (Capaldi y Aggeler, 2002), pues, en condiciones aerobias, produce alrededor del 90 % de todo el ATP celular (Domínguez-Ramírez y Tuena, 2005).

Distribución en la naturaleza

La ATPasa es un complejo proteico mecanoenzimático ampliamente conservado en el árbol de la vida, tanto funcional como estructuralmente; más del 60 % de aminoácidos de las subunidades β -catalíticas están conservados entre ATPasas de bacterias, plantas y mamíferos (**Fig. 1**; Yoshida *et al.*, 2001). Este complejo se encuentra parcialmente embebido en la membrana interna mitocondrial de eucariontes, en la membrana tilacoidal de cloroplastos o en la membrana plasmática de bacterias (Devenish *et al.*, 2008), particularmente en invaginaciones de la membrana llamadas vesículas respiratorias, vesículas lamelares o mesosomas, las cuales cuentan con los componentes de la cadena transportadora de electrones y equivale funcionalmente a la membrana interna mitocondrial (Jurtshuk, 1996). Además, las ATPasas son clasificadas como tipo F, V, A, P o E, de acuerdo a ciertas especializaciones funcionales (p. ej., las V-ATPasas se encuentran en vacuolas eucariontes y están especializadas en el transporte de solutos y la acidificación del medio), sin embargo, todas catalizan la síntesis y/o hidrólisis de ATP. La F₁F₀-ATPasa está clasificada como tipo F, las cuales se especializan en la síntesis de ATP (Neupane *et al.*, 2019).

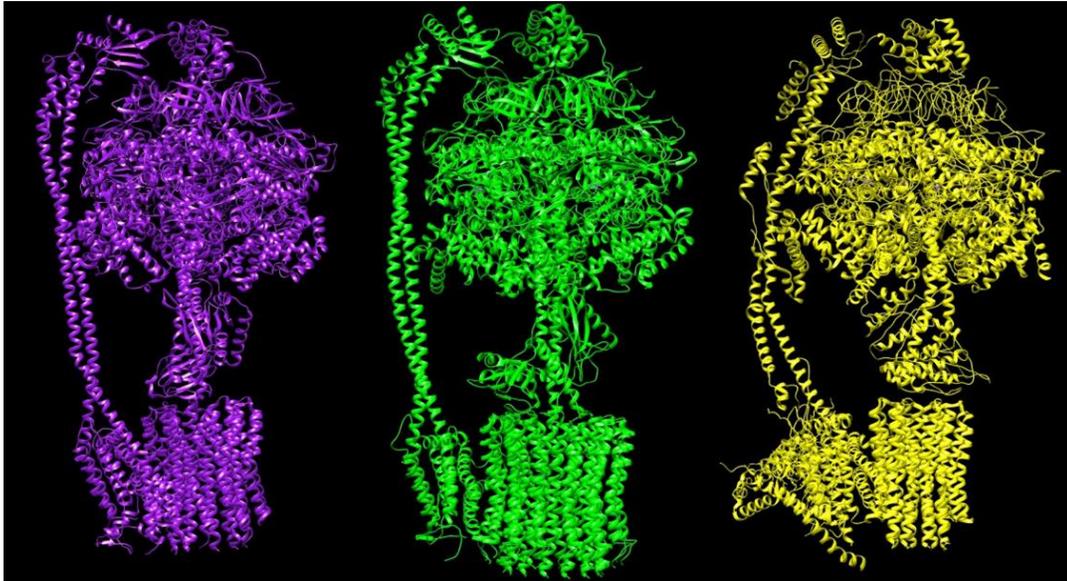


Figura 1. Comparación estructural de F₁F₀-ATPasas pertenecientes a organismos de diferentes dominios y/o reinos. Morado, ATPasa de *E. coli* (PDB: 6OQU); verde, ATPasa de cloroplasto de espinaca (*Spinacia oleracea*, PDB: 6FKF) y amarillo, ATPasa mitocondrial de bovino (*Bos Taurus*, PDB: 6ZPO). La estructura general de los 3 complejos está fuertemente conservada, a pesar de pertenecer a organismos lejanamente emparentados. Figura realizada con UCSF Chimera, un software de acceso libre desarrollado por Pettersen *et al.* (2004).

Estructura procarionte y eucarionte

La estructura y funcionamiento (desde una perspectiva mecánica) de la ATPasa es similar a la de dos motores eléctricos de inducción ensamblados, los cuales comparten un eje rotor común (Neupane *et al.*, 2019). El rotor central de este complejo tiene un diámetro de sólo 20 Å, el cual gira dentro de un barril estator de 100 Å de diámetro, por lo que la ATPasa es considerada el nanomotor rotatorio más pequeño conocido (Noji *et al.*, 1997). En perspectiva, el diámetro aproximado del complejo de anillos LP y los anillos S, M y C del cuerpo basal (motor) que genera el torque para el movimiento flagelar, en *Salmonella*, es de 250 Å, 245 Å, 300 Å, y 450 Å, respectivamente (Suzuki *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2006), mientras que en *E. coli*, la estructura formada por el apilamiento de estos anillos tiene una altura de 270 Å (DePamphilis y Adler, 1971)

La estructura bacteriana es la más simple de todas; el complejo de *E. coli* está formado por 8 subunidades distintas organizadas en dos dominios interrelacionados, un dominio hidrofílico y citosólico denominado F₁ y un dominio hidrofóbico membranal denominado F₀, con una masa molecular aproximada de 530 kDa. En el dominio F₁ bacteriano se encuentran 5 de las 8 subunidades que forman el complejo, consta de 3 subunidades alfa (α) (55 kDa), 3 subunidades beta (β) (50 kDa), 1 subunidad gamma (γ) (31 kDa), una subunidad delta (δ) (19 kDa) y una subunidad épsilon (ε) (14 kDa), mientras que el dominio F₀ está formado por las tres subunidades restantes: *a* (30 kDa), *b* (17 kDa) y *c* (8 kDa), con una estequiometría 1:2:10-15, respectivamente (**Fig. 2**; Ahmad y Cox, 2014; Boyer, 1997; Neupane *et al.*, 2019). Por su parte, el complejo eucarionte tiene una composición ligeramente más compleja; cuenta con 7-10 subunidades adicionales, pero estructuralmente mantiene la forma general de su contraparte procarionte (**Fig. 2**; Neupane *et al.*, 2019). En el dominio F₀ de la ATPasa de bovino se suman las subunidades *d*, *e*, *f*, *g*, F6, A6L, *j* (o lipoproteína 6.8) y *k* (inicialmente llamada DAPIT) mientras que en F₁ la subunidad

equivalente a la δ bacteriana, indirectamente confiere sensibilidad a oligomicina, por lo que es nombrada OSCP (por *oligomycin sensitivity-conferring protein*) y la subunidad equivalente a la ε bacteriana recibe el nombre de δ , además, se suman las subunidades ε y el inhibidor IF_1 , ambas sin equivalente bacteriano (Belogradov *et al.*, 1996; Boyer, 1997; Collinson *et al.*, 1994; Spikes *et al.*, 2020). La masa molecular total aproximada de la ATPasa eucarionte humana es de 597 kD (Belogradov *et al.*, 1996). Cabe mencionar que la estequiometría de las subunidades c y la presencia de subunidades accesorias puede variar en función de la especie, la ATPasa de *Bos taurus* cuenta con 8 subunidades c , la de *Paracoccus denitrificans* con 12 subunidades c (De la Rosa-Morales, Tesis de Maestría, 2005; Morales-Ríos *et al.*, 2015) y la de levadura cuenta con 10 subunidades c (Walker y Dickson, 2006).

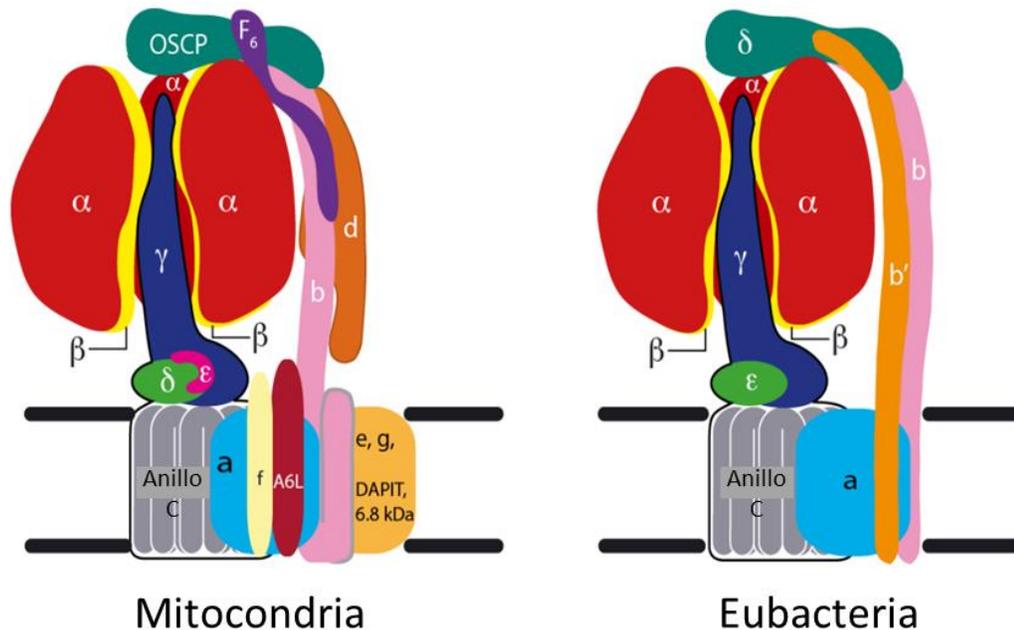


Figura 2. Estructura y composición de la F_1F_0 -ATPasa mitocondrial eucarionte (izquierda) y bacteriana (derecha). Se observa una estructura general conservada, sin embargo, el complejo eucarionte tiene 7-10 subunidades adicionales a las subunidades α , β , γ , δ , ε , a , b y c presentes en bacterias. En el dominio F_1 se suman las subunidades ε e IF_1 , mientras en el dominio F_0 se suman las subunidades d , e , f , g , F_6 , A_6L , la lipoproteína 6.8 y DAPIT (modificada de Unidad de Biología Mitochondrial, Universidad de Cambridge: <http://www.mrc-mbu.cam.ac.uk/projects/2679/subunit-composition>).

Como ya se mencionó, la estructura de la ATPasa evoca a la de dos motores mecánicos ensamblados que comparten un eje rotor común, además, cuenta con dos estatores interconectados. Uno de los estatores se encuentra en el dominio F_1 y lo conforman 3 subunidades α no catalíticas y 3 subunidades β catalíticas, las cuales alternan entre sí, formando un anillo hexamérico de subunidades α/β con una cavidad central, mientras que el segundo estator corresponde a la subunidad a del dominio F_0 (Neupane *et al.*, 2019), ambos estatores se encuentran interconectados por un tallo periférico.

En la ATPasa bacteriana, la subunidad γ se inserta en la cavidad central del anillo hexamérico de subunidades α/β . Además, γ se une a ε y ambas subunidades forman el tallo o eje central de la ATPasa. A través de ε , el eje central interacciona de manera no covalente con el anillo de subunidades c_{10-15} , formando el eje rotor. Este subcomplejo formado por las

subunidades $\gamma\epsilon\zeta_{10-15}$ tiene un papel crucial en el proceso de síntesis/hidrólisis de ATP, ya que su rotación genera cambios conformacionales en las subunidades β -catalíticas, imprescindibles para la función enzimática (Gibbons *et al.*, 2000).

La porción F_0 bacteriana es la más simple de todas, está formada por un anillo rotatorio de 10-15 subunidades c , 1 subunidad a transmembranal que rodea parcialmente al anillo de subunidades c y 2 subunidades b α -helicoidales (Neupane *et al.*, 2019).

Las 2 subunidades b forman un homodímero que, en su porción N-terminal transmembranal, interacciona con la subunidad a , mientras que la región C-terminal protruye de la membrana y se extiende hacia el dominio F_1 , donde interacciona con la subunidad δ . En conjunto, las subunidades $2b$ y δ forman el tallo periférico de la ATPasa bacteriana, el cual interconecta al dominio F_1 con F_0 , ancla la subunidad a y restringe la rotación del anillo hexamérico α/β ante el giro del eje rotor $\gamma\epsilon\zeta_{10-15}$ (Walker y Dickson, 2006). En el caso de los eucariontes, la ATPasa de cloroplastos tiene una configuración estructural y de composición similar a la de bacteria: $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ formando F_1 y ab_2c_{10-15} formando F_0 , sin embargo, en este caso la subunidad b tiene dos isoformas (Senior *et al.*, 2002). En la ATPasa mitocondrial el tallo estator está conformado por las subunidades b , d , F_6 y OSCP (Walker y Dickson, 2006) y el tallo rotor por la asociación $\gamma\delta\epsilon$, mientras que las subunidades e , f , g , A_6L , j y k se extienden en la membrana cercanas a la subunidad a (Devenish *et al.*, 2008; Spikes *et al.*, 2020). Las subunidades e y g parecen ser no esenciales para la actividad de ATPasa, pero sí para la formación de dímeros (Schagger, 2002; Paumard *et al.*, 2002), mientras que la subunidad f parece tener un papel importante en el ensamblaje de las subunidades a , c y A_6L en la ATPasa de levadura (Spannagel *et al.*, 1997). La ATPasa puede formar estructuras diméricas, triméricas y tetraméricas (Gu *et al.*, 2019; Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005; Pinke *et al.*, 2020). En la primera estructura dimérica resuelta por microscopía electrónica de alta resolución de la ATPasa mitocondrial de corazón de bovino, se propuso que las subunidades e y f formaban parte de una estructura proteica que se denominó “puente colgante”, que se localiza entre los dominios F_0 de cada monómero de ATPasas (**Fig. 3 A**; Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005). Esta predicción se confirmó recientemente en las estructuras del complejo F_1F_0 -ATPasa dimérica y tetramérica porcina (Gu *et al.*, 2019) y ovina (Pinke *et al.*, 2020), obtenidas por crio-microscopía, ya que permitieron describir la composición del puente colgante, un subdominio formado por las subunidades b , e y g , en el que las α -hélices $H2b/H3g/e$ interactúan formando una triple hélice transmembranal alargada, la cual interacciona indirectamente con la subunidad a , a través de un punto de anclaje formado por las hélices $H3b/H2f$. De hecho, una lisina C-terminal conservada en la subunidad e de mamíferos, parece unir un lípido estático (no identificado, probablemente un lípido de una sola cadena o de dos cadenas cortas) presente en el centro del anillo c por el lado del espacio intermembranal, cuyo papel puede ser el de estabilizar el anillo rotor, análogo a una rueda giratoria entorno a un eje (**Fig. 3**; Pinke *et al.*, 2020).

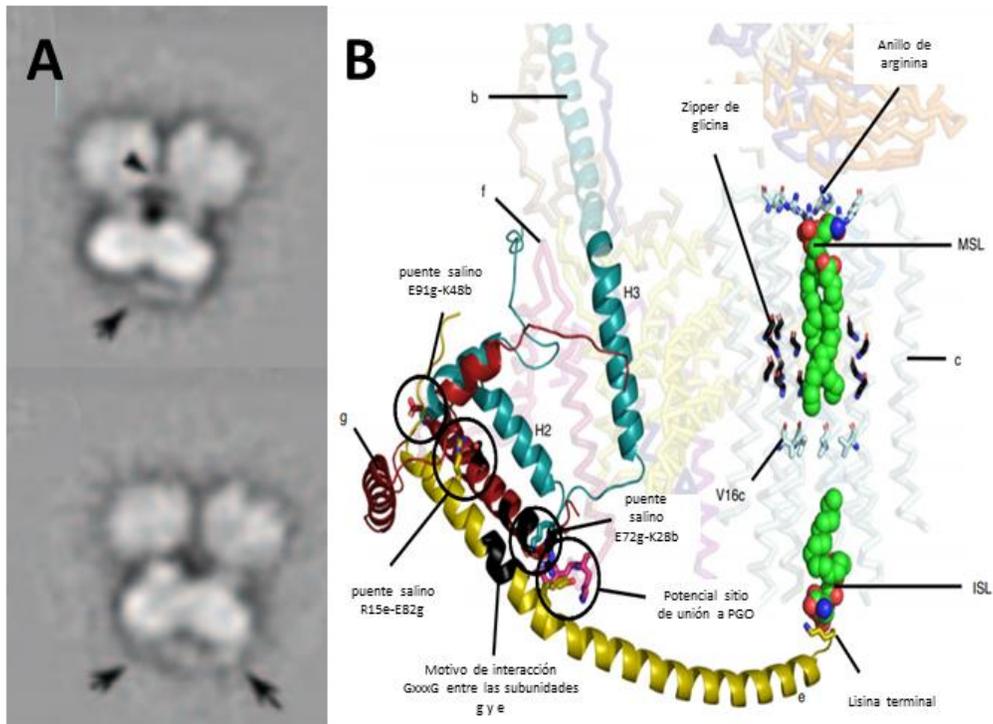


Figura 3. Estructura de puente colgante o garfio en la interfaz F_0 - F_0 de las ATPasas diméricas de bovino y en la ATPasa ovina. A, dímeros de la ATPasa mitocondrial de bovino observados por microscopía electrónica (ME), se observa una proteína en la interfaz F_1 - F_1 , cuya identidad es atribuida al inhibidor IF_1 en su estado dímérico (cabezas de flecha). Además, las flechas negras señalan la estructura de puente colgante en el dominio F_0 , la cual se sugirió que puede estar formada por las subunidades e o g (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005). La identidad de la estructura de puente colgante se determinó recientemente, como se puede observar en el panel B, donde se muestra un acercamiento del dominio F_0 de la ATPasa ovina resuelta por Crío-EM. Se observa una triple hélice transmembranal formada por las α -hélices H2b (cian)/H3g (rojo)/e (amarillo) y unida indirectamente a la subunidad a (amarillo, segundo plano) mediante el punto de anclaje H3b/H2f (magenta). Se aprecia como la subunidad e envuelve al anillo c (azul, segundo plano) a través de una estructura α -helicoidal que se asemeja a un garfio, esta estructura llega al centro del anillo rotor y, a través de una lisina, se une a un lípido (verde) estático presente en el interior (modificada de Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005 y Pinke *et al.*, 2020).

Mecanismo catalítico y de transporte de protones

De acuerdo a la teoría quimiosmótica propuesta por Peter Mitchell (1961), la síntesis reversible de ATP a partir de adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (P_i) es impulsada por la energía almacenada en forma de gradiente electroquímico de protones, es decir, un gradiente compuesto por una diferencia de concentración de protones (ΔpH) y una diferencia de carga ($\Delta \Psi$), a través de una membrana que contiene proteínas transductoras de energía, este fenómeno se conoce como fuerza protón motriz (FPM).

Este gradiente electroquímico es producido por la cadena de transporte de electrones a través de 3 de los 5 complejos respiratorios (I, III y IV), los cuales bombean protones, en el caso de eucariontes, hacia el espacio intermembranal de la mitocondria tras la oxidación de sustratos como el NADH, el succinato y el FADH. La FPM generada es utilizada para la síntesis de ATP a medida que los protones fluyen de regreso hacia la matriz a través de un canal presente en el dominio F_0 de la ATPasa (complejo V), formado en la interfaz de la proteína a y el anillo de subunidades c (Neupane *et al.*, 2019). En el caso de cloroplastos, durante la fotosíntesis oxigénica la FPM se genera en la membrana tilacoidal tras la

fotooxidación de agua en el fotosistema II y transporte de electrones hacia el fotosistema I mediante una quinona y el complejo Cyt b_6f , de tal manera que los protones se acumulan en el lumen tilacoidal y regresan al estroma a través de F_0 , lo que permite la síntesis de ATP en la porción F_1 de la ATPasa (Blankeship, 2014). Los complejos respiratorios bacterianos se encuentran en invaginaciones de la membrana plasmática llamadas vesículas respiratorias y los protones son bombeados hacia el periplasma, donde se acumulan para después regresar al citoplasma a través del canal de protones en F_0 (Jurtshuk, 1996). Se estima que la FPM para la mayoría de las membranas biológicas esté entre los 120-200 mV (Neupane *et al.*, 2019).

El mecanismo por el cual pasan los protones a través de F_0 ha sido descrito con cierto detalle utilizando un modelo ovino obtenido por crio-microscopía electrónica (**Fig. 4**; Pinke *et al.*, 2020). Como ya se mencionó, existe un canal de protones en la interfaz formada entre el anillo de subunidades c y la proteína a (Neupane *et al.*, 2019), o, más específicamente, un par de hemicanales de protones formados entre la horquilla compuesta por las α -hélices H5a y H6a de la subunidad a y el anillo rotatorio.

El hemicanal de entrada del espacio intermembranal es una cavidad hidrofílica presente en el extremo unido de la horquilla H5a-H6a, particularmente formado por los residuos H168a y H172a hasta E203a. Este último residuo, el E203a, está conservado y es clave en el transporte, pues es capaz de donar protones directamente a un glutamato transportador conservado en las subunidades c , el E58c. E58c se encuentra posicionado en el centro de la subunidad c , externamente a la hélice transmembranal y su protonación genera la rotación del anillo en sentido horario (vista de F_0 a F_1), de tal manera que la subunidad c recién protonada y neutra es expuesta a la membrana hidrofóbica. A casi 360° del hemicanal de entrada se encuentra el hemicanal de salida hacia la matriz mitocondrial, el cual está formado por el extremo bifurcado de la horquilla H5a-H6a y el anillo rotatorio. En este hemicanal de salida se encuentra conservado un glutamato clave, E145a, que devuelve la carga a E58c tras desprotonarlo antes de llegar a una arginina conservada, R159a, en la hélice H5 de la horquilla, que funciona como punto de control, asegurando que, durante la rotación del anillo de subunidades c , E58c pase sólo en su forma cargada. Sin embargo, la desprotonación de E58c también puede realizarse a través de moléculas de agua, las cuales pueden estar coordinadas por los residuos conservados Y221a y S148a justo antes del punto de control (Pinke *et al.*, 2020). En *E. coli* y *Bacillus* PS3 también se han descrito estos dos hemicanales como cavidades hidrofílicas, las cuales son funcionalmente similares a las del modelo mitocondrial (Guo *et al.*, 2019).

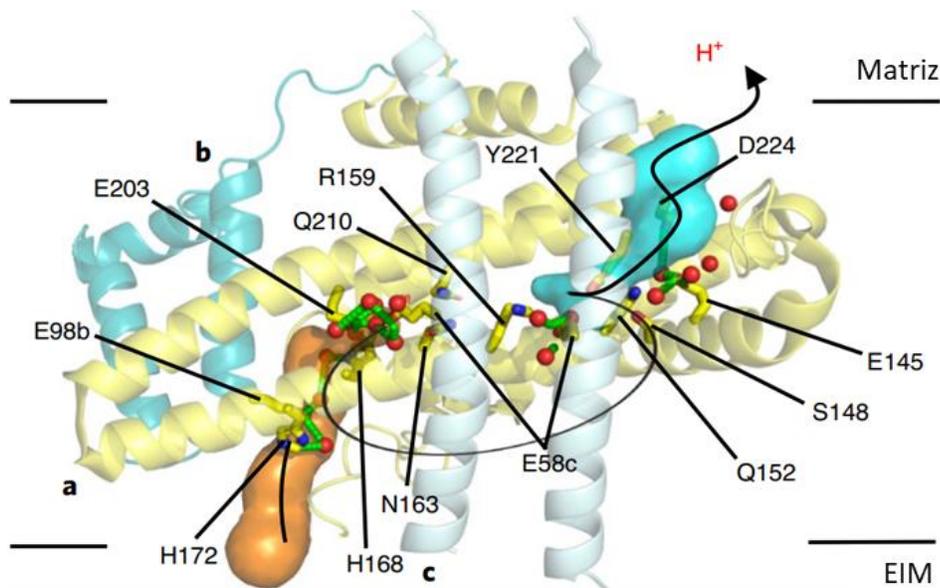


Figura 4. Hemicanales y transporte de protones a través del dominio F_0 de la ATPasa. En naranja se muestra el hemicanal de entrada del lado del espacio intermembranar (EIM) y en azul el hemicanal de salida hacia la matriz, ambos formados por residuos de la subunidad a . Además, se señalan residuos clave para el transporte, como E203 de la subunidad a (amarillo), que dona protones directamente a E58 de la subunidad c (azul claro), lo que neutraliza su carga y permite el giro del anillo a través de la membrana hidrofóbica, hasta el canal de salida, donde E145 de la subunidad a desprotona a E58c, favoreciendo que este último residuo pase el punto de control establecido en R159 (modificada de Pinke *et al.*, 2020).

El giro del eje rotor producido por el transporte de protones a través de F_0 permite la síntesis de ATP en F_1 . En 1979, Paul D. Boyer introdujo el concepto de mecanismo de cambio de unión (o de sitios alternantes) para explicar este proceso de catálisis rotacional (Boyer, 1989). El mecanismo de cambio de unión predice que una subunidad rotatoria presente en F_1 gira con respecto a las tres subunidades β -catalíticas, lo que produce cambios conformacionales que conducen a la síntesis/hidrólisis de ATP, además, cada subunidad β tiene una conformación distinta en un momento dado, de tal manera que tras un ciclo completo de 360° , todas las subunidades habrían adoptado todas las conformaciones posibles y que la síntesis de ATP ocurre tras el giro en una dirección y la hidrólisis tras el giro en la dirección opuesta. La primera estructura cristalográfica en alta resolución de F_1 (Fig. 5), obtenida en el laboratorio del Profesor John Walker en 1994, apoyó el modelo de cambio de unión, pues mostró que, efectivamente, las 3 subunidades β -catalíticas tienen conformaciones distintas en un momento dado: β_E , desprovista de nucleótido en su sitio activo; β_{DP} , unida a ADP en su sitio activo y β_{TP} , unida a adenilil imidodifosfato (AMP-PNP), un análogo del ATP. Además, en las 3 subunidades α no catalíticas se observó una molécula de AMP-PNP unida a su sitio de unión a nucleótido (Abrahams *et al.*, 1994).

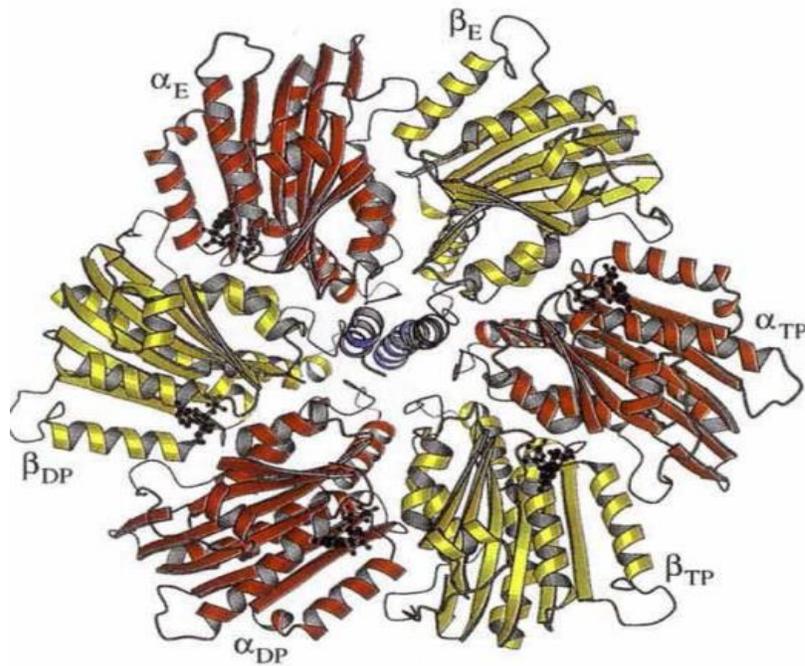


Figura 5. Estructura cristalográfica del dominio F₁ de la ATPasa mitocondrial vista desde F₀. Se observa que las tres subunidades β (amarillo) tienen conformaciones distintas: β_E, sin nucleótido unido; β_{TP}, unida a AMP-PNP (un análogo de ATP) y β_{DP}, unida a ADP. Además, las tres subunidades α (rojo) tienen AMP-PNP unido (modificada de Abrahams *et al.*, 1994).

En 1997, experimentos concluyentes de Noji y colaboradores demostraron la rotación de la subunidad γ (**Fig. 6**), para ello unieron mediante estreptavidina un filamento de actina marcado fluorescentemente y biotinilado a la subunidad γ de un subcomplejo recombinante α₃β₃γ de *Bacillus* PS3, el cual fijaron a un portaobjetos recubierto de Ni²⁺-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) a través de colas de His añadidas a la región N-terminal de la subunidad β. Para iniciar la catálisis rotacional de la F₁-ATPasa, añadieron 2 mM de Mg²⁺-ATP a las preparaciones y registraron los cambios con un microscopio de epifluorescencia. Encontraron que la subunidad γ rota en sentido antihorario (visto de F₀ a F₁) durante la hidrólisis de ATP y que esta rotación es independiente de las subunidades δ y ε (Noji *et al.*, 1997). Experimentos posteriores usando el mismo principio mostraron la rotación de γ en el dominio F₁ de *E. coli* (Omote *et al.*, 1999).

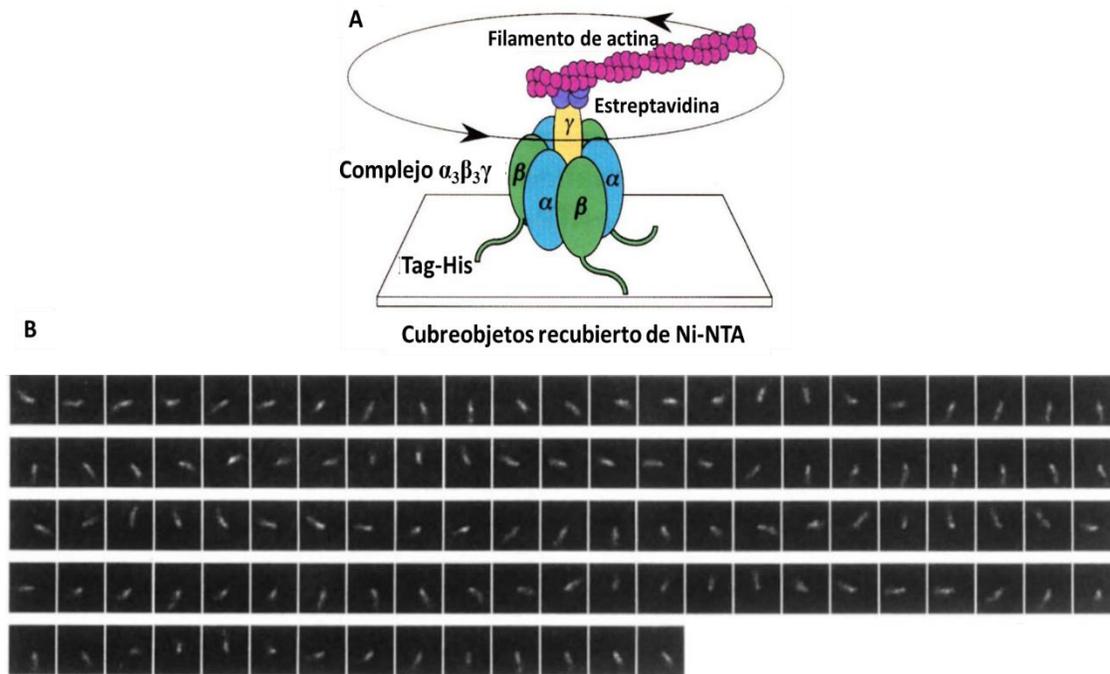


Figura 6. Rotación de la subunidad γ en el subcomplejo $\alpha_3\beta_3\gamma$ de *Bacillus* PS3. A, sistema experimental en el que la subunidad γ está biotinilada y unida a un filamento de actina marcado fluorescentemente. El subcomplejo está fijo a un portaobjetos recubierto de Ni-NTA mediante colas de histidina agregadas a la subunidad β . B, imágenes temporales de microscopía de epifluorescencia del complejo $\alpha_3\beta_3\gamma$ -filamento de actina tras la adición de 2 mM de ATP, se observa la rotación del filamento en sentido antihorario (modificada de Noji *et al.*, 1997).

El modelo general de síntesis de ATP por el mecanismo de cambio de unión, señala que, en un tiempo cero, una molécula de ADP y una de Pi se unen al sitio activo vacío de la subunidad β_E , mientras que en el sitio activo de β_{TP} se sintetiza ATP y, tras una primera rotación de 120° del eje rotor $\gamma_{\epsilon C_{10-15}}$, cambia la conformación de las subunidades; β_E adopta la conformación relajada β_{DP} , en β_{TP} se libera el ATP recién sintetizado y pasa a una conformación vacía β_E , susceptible a la unión de otra molécula de ADP y Pi y, finalmente, β_{DP} adopta una conformación cerrada β_{TP} , donde se sintetiza la molécula de ATP que será liberada en la siguiente rotación de 120° . Tras el giro completo de 360° del eje rotor, cada una de las 3 subunidades β -catalíticas ha adoptado cada una de las conformaciones posibles: β_E , β_{DP} y β_{TP} , como lo predijo Paul D. Boyer (Fig. 7). Cabe mencionar que las 3 subunidades α mantienen unido ATP y no cambian de conformación tras la rotación de $\gamma_{\epsilon C_{10-15}}$ (Abrahams *et al.*, 1994; Neupane *et al.*, 2019).

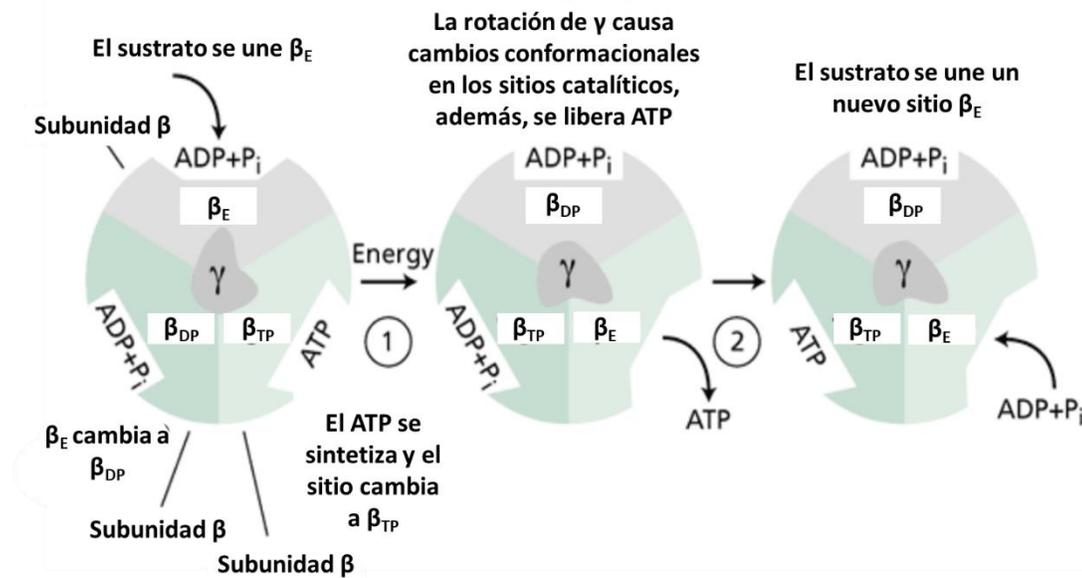


Figura 7. Mecanismo de cambio de unión para la síntesis de ATP en el dominio F_1 de la ATPasa. Al inicio de un ciclo, una molécula de ADP y una de P_i se unen a la subunidad β_E , mientras que una molécula de ATP ocupa el sitio activo de la subunidad β_{TP} y la subunidad β_{DP} tiene unido $ADP+P_i$. Tras la rotación de 120° de γ , se libera el ATP de la subunidad β_{TP} , por lo que cambia a una conformación β_E , donde se puede unir $ADP+P_i$, la subunidad β_{DP} cambia una conformación β_{TP} y se sintetiza ATP, mientras que la subunidad β_E adopta una conformación β_{DP} , donde se sintetizará ATP tras una segunda rotación de 120° . Después de un ciclo completo de 360° de rotación, cada una de las 3 subunidades β habrá adoptado las 3 conformaciones posibles y se habrán sintetizado 3 moléculas de ATP. En diferentes tonos de azul se representa cada subunidad β catalítica (modificada de Neupane *et al.*, 2019).

El cambio de conformación de las subunidades β , aunque es impulsado por el giro de $\gamma_{\epsilon C_{10-15}}$, se debe, en gran medida, a la asimetría intrínseca de la subunidad γ y la capacidad de interactuar diferencial y específicamente con cada una de las subunidades catalíticas en un momento dado (Abrahams *et al.*, 1994).

Inhibidores endógenos reguladores de actividad de la ATPasa/hidrolasa (ϵ , sistema γ/ϵ , IF_1 y ζ)

La ATPasa es un nanomotor reversible, con la capacidad de sintetizar e hidrolizar ATP, dependiendo de la dirección de rotación del eje central $\gamma_{\epsilon C_{10-15}}$ (Noji y Yoshida, 2001). La capacidad hidrolítica de ATPasa permite restaurar el gradiente electroquímico y generar FPM en diversas condiciones, como: anoxia (Ugurbil *et al.*, 1978), ausencia de un aceptor final de electrones, condiciones de oscuridad o baja intensidad luminosa o cuando no existen cadenas transportadoras de electrones alternas (Feniouk *et al.*, 2006; Mendoza-Hoffmann *et al.*, 2018; Walker, 1994). Sin embargo, se ha sugerido que la actividad no regulada de ATPasa puede conducir a un consumo deletéreo de ATP (Feniouk *et al.*, 2006; Stocker *et al.*, 2007). En este sentido, se ha observado un crecimiento menor y más lento en las mutantes que carecen de la proteína inhibitoria endógena ζ de *Paracoccus denitrificans* ($Pd\zeta$), en

comparación a la cepa silvestre (Mendoza-Hoffmann *et al.*, 2018). Diferentes subunidades han adquirido la capacidad de actuar como reguladores endógenos de la actividad hidrolítica de ATPasa; la subunidad épsilon (ϵ) en bacterias, la subunidad IF_1 en mitocondrias, la subunidad gamma (γ) (a través de puentes disulfuro) en cloroplastos y, finalmente, la subunidad zeta (ζ) en alfa-proteobacterias, cuyo reciente descubrimiento se remonta a no más de dos décadas atrás (de la Rosa-Morales, 2005; Morales-Ríos *et al.*, 2010). A continuación, se hace un breve resumen acerca de la estructura y mecanismo de cada uno de los inhibidores endógenos mencionados.

Subunidad ϵ : en diversos phyla bacterianos se ha observado la presencia de una subunidad ϵ de aproximadamente 130-140 residuos (Sielaff *et al.*, 2018). La actividad inhibitoria de esta subunidad se ha demostrado en diferentes grupos, entre ellos: γ -proteobacterias, como *E. coli* (Sternweis y Smith, 1980; Dreyfus y Satre, 1983), donde, además, análisis de diferentes fracciones de purificación revelaron que ϵ es el único inhibidor endógeno en esta γ -proteobacteria (Dreyfus y Satre, 1983); cianobacterias, como *Synechocystis* sp. PCC 6803, donde la delección de la región C-terminal de la subunidad ϵ , condujo a un incremento en la actividad de ATPasa (Imashimizu *et al.*, 2011) y firmicutes, como en *Bacillus* PS3 (Suzuki *et al.*, 2003) y *Bacillus* sp. TA2.A1, donde la subunidad trunca $\epsilon^{\Delta C}$ perdió la capacidad de inhibir la hidrólisis de ATP por la F_1 ATPasa (Keis *et al.*, 2006). Adicionalmente, en *Mycobacterium* se ha descrito una subunidad ϵ con un extremo C-terminal más corto al inhibidor de *E. coli* (121 y 139 residuos totales, respectivamente), pero que mantiene una función inhibitoria importante (Joon *et al.*, 2018).

La estructura de la subunidad ϵ reveló que está organizada en dos subdominios, uno N-terminal de 84 residuos, cuya estructura de 10 láminas β adopta una forma de emparedado de interior hidrofóbico y un dominio C-terminal de 48 residuos, el cual forma una horquilla de dos α -hélices antiparalelas (**Fig. 8 A**; Wilkens *et al.*, 1995).

Se sabe que la región N-terminal de ϵ es esencial para el ensamblaje funcional del complejo F_1F_0 (Jounouchi *et al.*, 1992), mientras que experimentos de delección (Kuki *et al.*, 1988) y entrecruzamiento (Wilkens y Capaldi, 1998; Kato-Yamada *et al.*, 2000) sugieren que la región C-terminal sufre transiciones conformacionales, cambiando de una forma contraída no inhibitoria a una extendida inhibitoria (Rodgers and Wilce, 2000; Tsunoda *et al.*, 2001); en *Bacillus* PS3 la unión cruzada de la conformación extendida en el anillo estator ha mostrado un efecto fuertemente inhibitorio sobre la hidrólisis de ATP, además, esta conformación es estabilizada por Mg^{2+} -ADP-Pi en *E. coli* (Fischer *et al.*, 2000).

Estudios en *Bacillus* PS3 han demostrado que la conformación compacta ocurre en presencia de ATP y la conformación extendida cuando hay ADP en el medio (Feniouk *et al.*, 2006). incluso se ha identificado un sitio de unión a ATP en la subunidad ϵ de *Bacillus* PS3. La formación de este sitio de reconocimiento implica a la lámina β_{10} , un asa y las dos α -hélices del dominio C-terminal y ha sido identificado como el motivo de reconocimiento I(L)DXXRA, cuya presencia está conservada en diferentes bacterias, como *B. subtilis* y *E. coli* (Yagi *et al.*, 2007). Se sugiere que este motivo funciona como sensor de ATP en las células bacterianas, el cual favorece la conformación compacta no inhibitoria en presencia

de ATP y la conformación extendida inhibitoria en ausencia de este nucleótido y en presencia de ADP (Feniouk *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2003).

En la primera estructura cristalográfica del dominio F₁ autoinhibido de *E. coli* (es decir, inhibido por una subunidad estructural de la ATPasa) se mostró que la región C-terminal de la subunidad ϵ se inserta en la cavidad central del anillo hexamérico α/β , donde interacciona con las subunidades α , β y γ de F₁ (Hausrath *et al.*, 2001). Más recientemente, la estructura cristalográfica del dominio F₁ autoinhibido de *E. coli*, obtenido por Cingolani y Duncan (2011), reveló tres regiones de contacto entre ϵ y las subunidades α , β y γ : en la región 1, el asa 1 y la α -hélice 1 de ϵ interaccionan sólo con γ , particularmente con el plegamiento de Rossmann de γ ; en la región 2, el asa 2 y la α -hélice 2 de ϵ interaccionan con α_{DP} , α_E , β_{DP} , β_{TP} y γ , en este caso, la α -hélice 2 de ϵ se inserta en la cavidad central del rotor, donde forma una hélice superenrollada y antiparalela con el extremo N-terminal de la subunidad γ , la cual es estabilizada por puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas. En esta región de contacto, la α -hélice 2 de ϵ (ubicada entre los C-terminal de las subunidades β) impide contactos entre β y γ , importantes para la catálisis rotacional. Finalmente, la región 3 corresponde al “gancho” de la subunidad ϵ , el cual va de los residuos 126 a 138 e interacciona con las regiones N y C-terminal de γ , además, envuelve parcialmente a la hélice 1 de la región C-terminal de la subunidad β_{TP} (Fig. 8 B y C; Cingolani y Duncan, 2011).

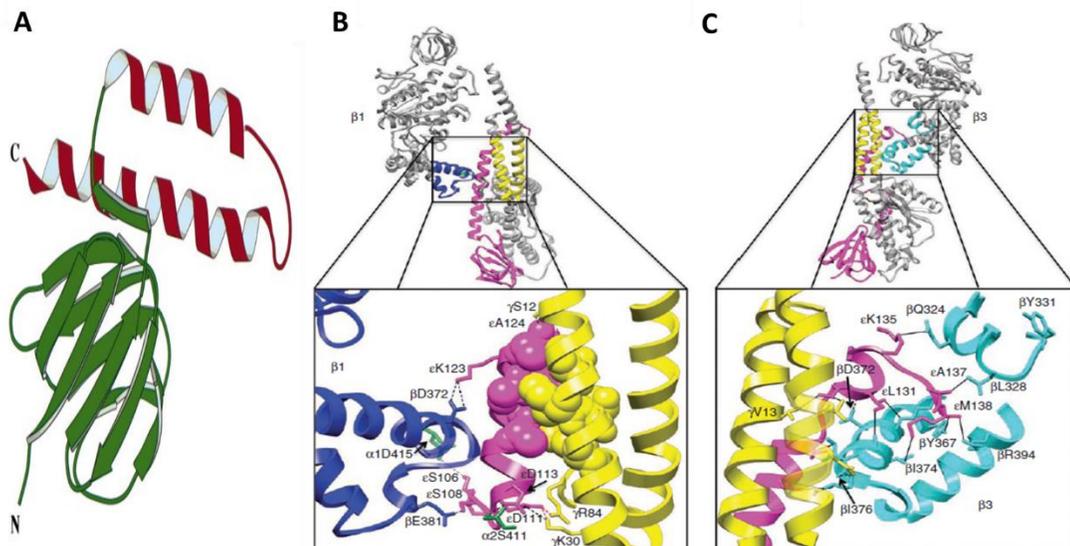


Figura 8. Estructura tridimensional de la subunidad ϵ (PDB: 1BSH) de *E. coli* en su conformación contraída y extendida al interior de la cavidad central del dominio F₁. A, subunidad ϵ contraída, se observa una proteína compuesta por dos dominios, un dominio inhibitorio C-terminal (rojo) cuyas dos α -hélices forman una horquilla y sufren transiciones conformacionales y un dominio N-terminal (verde), el cual adopta una forma de sándwich a través de 10 láminas β . B y C, subunidad ϵ insertada en la cavidad central del dominio F₁; líneas sólidas, contactos de van der Waals; líneas punteadas negras, puentes de hidrógeno; líneas punteadas rojas, interacciones electrostáticas. B, se aprecia la región 2 de contacto entre la subunidad ϵ (rosa) y las subunidades β_{DP} (azul oscuro) y γ (rosa), los átomos representados como esferas participan en la formación de la hélice superenrollada y antiparalela formada por la interacción entre la α -hélice 2 de ϵ y la región N-terminal de γ . C, corresponde a la región 3 de contacto entre la subunidad ϵ (rosa) y las subunidades β_{TP} (azul claro) y γ (rosa), se puede apreciar la estructura de gancho formada por los residuos 126 a 138 de la subunidad ϵ , el cual interacciona con las

regiones C- y N-terminal de la subunidad γ y envuelve parcialmente a la hélice 1 de subunidad β_{TP} (modificada de Cingolani y Duncan, 2011 y Wilkens y Capaldi, 1998).

Subunidades γ/ϵ : la actividad inhibitoria de ϵ fue observada en cloroplastos antes que en bacterias; la adición de etanol al 20 % al “factor de acoplamiento 1” o dominio F_1 de cloroplastos de espinaca unido a una columna de intercambio iónico, permitió la liberación de la subunidad ϵ del complejo, además, se observó que los subcomplejos carentes de ϵ son capaces de hidrolizar ATP, mientras que la reconstitución de esta subunidad inhibe la actividad hidrolítica del dominio F_1 (Richter *et al.*, 1984). Sin embargo, en la subunidad γ de cloroplastos de espinaca también se ha descrito un dominio conservado que cuenta con dos cisteínas regulatorias: Cys199 y Cys205 (Richter, 2004). La reducción del puente disulfuro formado por estos residuos conduce a un incremento en la actividad basal de hidrólisis de ATP (Nalin y McCarty, 1983), ya que estas cisteínas funcionan como un sensor redox que, en condiciones oxidantes (p. ej., en oscuridad), forman un puente disulfuro que inhibe la actividad catalítica, mientras que en condiciones reductoras (p. ej., durante la fotosíntesis activa) se rompe el puente disulfuro gracias a la reducción mediada por tiorredoxina, lo que activa a la enzima y permite, la síntesis de ATP. Cabe destacar que la regulación por la subunidad γ y la inhibición por ϵ están estrechamente relacionadas (Sielaff *et al.*, 2018). Experimentos con anticuerpos han mostrado que la FPM dependiente de luz genera cambios conformacionales en ϵ , particularmente en la región C-terminal, de tal manera que, en presencia de luz y gradiente electroquímico, ϵ se expone al reconocimiento por anticuerpos, lo cual no ocurre en membranas mantenidas en oscuridad (Richter y McCarty, 1987; Johnson y McCarty 2002), al mismo tiempo, la tasa de reducción de γ incrementa fuertemente, lo que conduce a una activación total de la ATPasa (Richter, 2004).

Factor inhibitorio 1 (IF₁): el factor inhibitorio 1 (IF₁) mitocondrial fue inicialmente descrito por Pullman y Monroy (1963), quienes lo purificaron a partir de músculo cardiaco de bovino y observaron que a pH de 6.5 IF₁ ejerce una inhibición máxima sobre la actividad de ATPasa, mientras que a pH alcalino, esta propiedad se ve fuertemente reducida. Experimentos de inmunodetección revelaron una activación en la actividad de ATPasa inducida por FPM, la cual fue relacionada con un cambio de posición de la proteína IF1 en la ATPasa mitocondrial (Dreyfus *et al.*, 1981). Además, la observación de un lag previo al estado de equilibrio dinámico del intercambio Pi-ATP, así como una menor actividad de síntesis de ATP en partículas submitocondriales en estado “Mg-ATP” (un estado caracterizado por una baja actividad de ATPasa y baja inmunodetección de la proteína IF1) con respecto a partículas en “estado 3” (un estado caracterizado por una alta actividad de ATPasa y alta inmunodetección de la proteína IF₁), sugieren que el inhibidor IF₁ tiene un papel importante en la conservación de la energía por fosforilación oxidativa (Tuena *et al.*, 1983).

La presencia de IF₁ fue confirmada en muchas otras especies eucariontes, entre las cuales destacan mamíferos (Cintrón y Pedersen, 1979), incluyendo humano y ratón (Xu *et al.*, 2009), en levadura (Hashimoto *et al.*, 1981), mitocondrias de plantas (Norling *et al.*,

1990), *Caenorhabditis elegans* (Ichikawa *et al.*, 2006) y artrópodos como el camarón (Chimeo *et al.*, 2015). El IF₁ de bovino consta de 84 aminoácidos y su estructura terciaria reveló que la región N-terminal es intrínsecamente desordenada, mientras que la región C-terminal tiene una estructura de α -hélice y es un dominio de dimerización (**Fig. 9 B**; Gordon-Smith *et al.*, 2001). Análisis cromatográficos y de microscopía electrónica han mostrado que a pH 6.5 o menor, la IF₁ se asocia en dímeros inhibitorios a través de la región C-terminal, de tal manera que se forma una hélice superenrollada antiparalela entre dos monómeros (Cabezón *et al.*, 2000), mientras que, a un pH alcalino, los dímeros interactúan a través de su región N-terminal inhibitorias, formando tetrámeros funcionalmente inactivos (Cabezón *et al.*, 2001); sin embargo en levadura la forma dimérica parece ser inactiva, siendo la forma monomérica la inhibitoria (Le Breton *et al.*, 2015). Información estructural de la ATPasa inhibida ha revelado contactos clave de IF₁ con las subunidades del dominio catalítico y se ha propuesto un mecanismo inhibitorio que se describe a continuación: IF₁ se inserta en un sitio de unión presente en la interfaz catalítica entre α_E y β_E , particularmente a través de su región N-terminal (residuos 1 a 60), alineándose con la α -hélice presente en la región C-terminal de las subunidades del anillo e interactuando con la subunidad γ para formar una hélice superenrollada (García-Trejo and Morales-Ríos, 2008; Minauro-Sanmiguel, 2002). Tras la interacción clave inicial de IF₁ con α_E y β_E , la hidrólisis de 2 moléculas de ATP provoca dos giros en γ de 120° cada uno, lo que genera el cambio conformacional de α_E y β_E a la conformación cerrada α_{DP} y β_{DP} . Estos cambios afectan directamente a IF₁, cuya región N-terminal adopta una forma de α -hélice dentro de la interfaz α_{DP}/β_{DP} , donde interactúa también con γ (**Fig. 9 A**; Bason *et al.*, 2014). Además, experimentos de mutagénesis en *Saccharomyces cerevisiae*, donde se modificaron 3 residuos de la subunidad β (R408, R412 y E454), revelaron que la interacción $\alpha E399$ - $\beta R408$ es esencial para el funcionamiento de la ATPasa, particularmente para la formación de la conformación α_{DP}/β_{DP} , y que esta interacción es interrumpida por la presencia del inhibidor IF₁ y para su crecimiento (Ichikawa *et al.*, 2005).

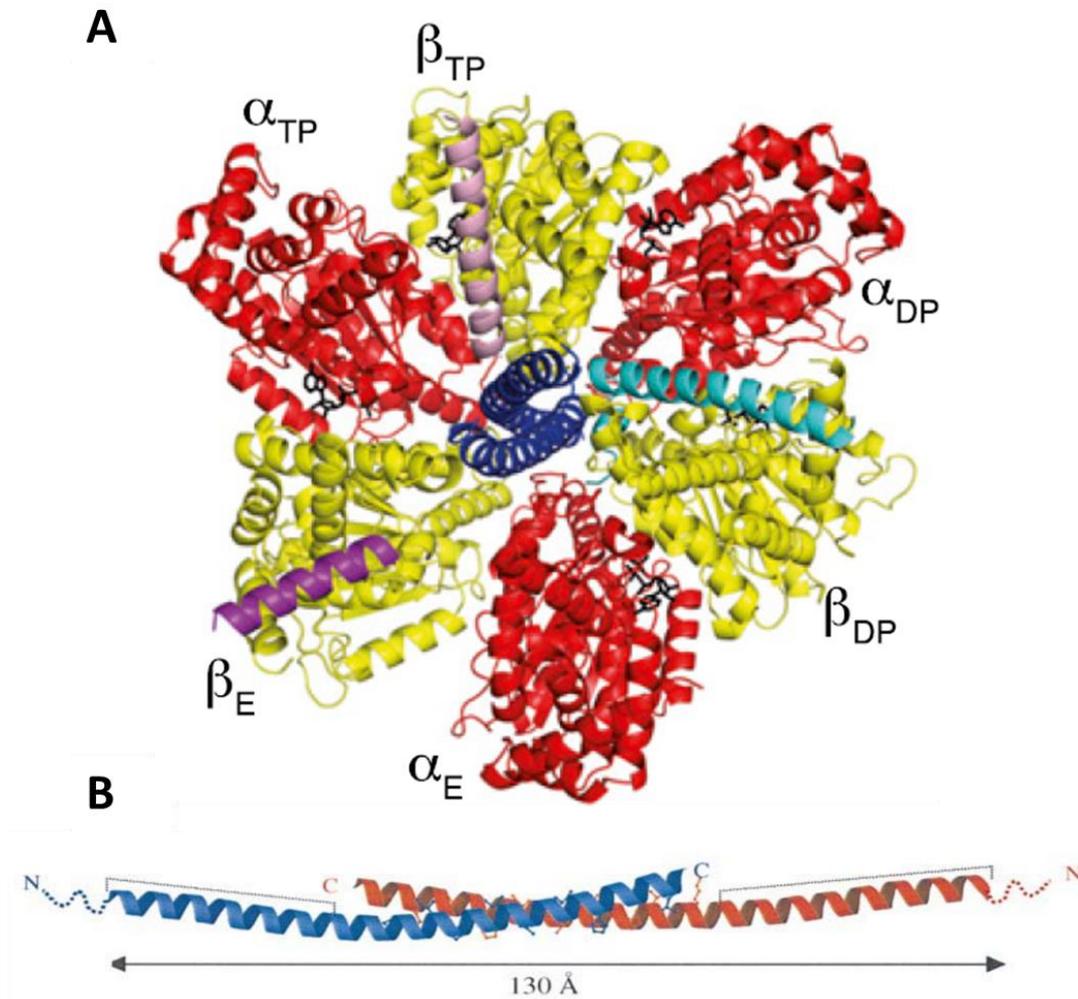


Figura 9. Estructura cristalográfica del inhibidor mitocondrial IF₁ y su interacción con el dominio F₁. A, dominio F₁ de la ATPasa inhibido por la subunidad IF₁ monomérica reconstituida *in vitro*. Se aprecia a la IF₁ en sus tres sitios posibles: entre la interfaz $\alpha_E\beta_E$ (morado), entre $\alpha_{TP}\beta_{TP}$ (rosa) y entre $\alpha_{DP}\beta_{DP}$ (azul claro). Nótese que la α -hélice formada por IF₁ en su sitio inhibitorio final ($\alpha_{DP}\beta_{DP}$) es más larga que la hélice formada en los otros dos sitios, lo cual es un reflejo de la ruptura y formación de interacciones específicas (dependientes de ATP) entre el inhibidor y el dominio F₁, necesarias para el plegamiento final de IF₁ en la interfaz $\alpha_{DP}\beta_{DP}$. B, estructura cristalográfica de un dímero inhibitorio de la subunidad IF₁ mitocondrial de bovino. Se observa que la región C-terminal adopta una conformación de α -hélice, a través de la cual se une a una segunda subunidad para formar un homodímero, particularmente mediante los residuos 44 a 84, mientras que los residuos 1 a 18 de la región N-terminal tienen una conformación intrínsecamente desordenada. Las líneas punteadas representan la región mínima inhibitoria (residuos 14 a 47; Van Raaij *et al.*, 1996). (modificada de Bason *et al.*, 2014 y Cabezón *et al.*, 2001).

Se han descrito diferentes mecanismos regulatorios de la forma inhibitoria activa de IF₁, entre las cuales destacan la presencia de 5 histidinas (H48, H49, H55, H56 y H70) conservadas en el reino animal, las cuales confieren sensibilidad a pH, pues su protonación y deprotonación facilita la transición entre estados activos e inactivos; la mutación H49K produjo una proteína relativamente insensible a pH, con una alta actividad inhibitoria a pH 8 (Schnizer *et al.*, 1996). Adicionalmente, se ha descrito el papel regulatorio de la fosforilación

de la serina S39 de IF₁. En experimentos de inmunoprecipitación en líneas celulares humanas han mostrado que la fosforilación dependiente de proteína cinasa A en S39 de IF₁, impide la unión del inhibidor a la ATPasa, mientras que su desfosforilación promueve su unión al complejo catalítico F₁. Se sugiere que la fosforilación tiene un efecto sobre el plegamiento de IF₁, de tal manera que se pierde la estructura intrínsecamente desordenada esencial durante las etapas iniciales de la inhibición. En músculo cardiaco de ratón se han encontrado grandes cantidades de IF₁ defosforilada (García-Bermúdez *et al.*, 2015).

Finalmente, IF₁ ha sido sugerido como un factor de dimerización de la ATPasa. Evidencia de microscopía electrónica ha revelado la formación de dímeros de F₁ tras la adición de un exceso molar del inhibidor IF₁ a muestras purificadas del complejo catalítico (Cabezón *et al.*, 2000). Experimentos de sobreexpresión y reconstitución que evaluaron la relación dímeros (D)/monómeros (M) de la F₁F₀ ATPasa en partículas submitocondriales (PSM) de hepatoma de rata y de corazón de bovino, mostraron una correlación entre un incremento en la relación D/M y la sobreexpresión de IF₁, la disminución de la relación D/M tras la remoción de IF₁ y el restablecimiento parcial de dicha relación tras la reconstitución con IF₁ recombinante (García *et al.*, 2006).

En contraste, experimentos de electroforesis, microscopía electrónica y de fluorescencia en células HeLa con una expresión reducida de IF₁, mostraron que la cantidad de dímeros de F₁F₀-ATPasas es similar entre las células depletadas de IF₁ y las células control, además de que la topografía de la membrana interna mitocondrial no se ve afectada (Fujikawa *et al.*, 2012).

Adicionalmente, la primera estructura dimérica de la ATPasa (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005) y las estructuras diméricas y tetraméricas analizadas recientemente por criomicroscopía electrónica (Gu *et al.*, 2019; Pinke *et al.*, 2020), mostraron la presencia de dos asociaciones fisiológicas: dímeros independientes de IF₁, cuya asociación ocurre a través de contactos específicos que involucran las subunidades *a*, *e*, *f*, *g*, 6.8pl (también conocida como subunidad *j*) y DAPIT (también conocida como Atp5mk) del dominio F₀ y tetrámeros inhibidos, los cuales se forman a partir de dos dímeros de ATPasa y dependen de dos inhibidores IF₁ diméricos; se sugiere que ambas superestructuras son fisiológicamente relevantes, pues, los dímeros son catalíticamente activos y los tetrámeros están inhibidos por IF₁, además los ángulos formados entre las regiones F₀ asociadas concuerdan con los ángulos de las crestas mitocondriales, lo que pone de manifiesto la relevancia de estas superestructuras en el modelado topográfico de la membrana interna (Gu *et al.*, 2019; Pinke *et al.*, 2020).

A pesar de los reportes anteriores, existe evidencia *in vitro* de la función dimerizante y oligomerizante de la IF₁ mitocondrial, la cual se obtuvo por medio de experimentos de reconstitución homóloga, donde el IF₁ se añadió a PSM de hígado de rata y se observó que al remover la IF₁ se perdía la ATPasa dimérica y se enriquecía el monómero de la enzima y, además, al reconstituir la IF₁ no sólo se restableció la estructura dimérica sino que además se recuperaron formas oligoméricas de la ATPasa mitocondrial incluyendo tetrámeros y formas superiores de oligomerización (García *et al.*, 2006). Estos experimentos concuerdan con los

resultados de microscopía electrónica donde se observa que la IF₁ mitocondrial forma parte de interfases dimerizantes y oligomerizantes de la ATPasa mitocondrial dimérica y oligomérica (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005) que le da forma a las crestas mitocondriales (Arselin *et al.*, 2004).

Subunidad ζ : la sospecha sobre la existencia de una proteína inhibitoria en *P. denitrificans*, una α -proteobacteria que ha sido asociada al protoendosimbionte mitocondrial (John y Whatley, 1975), se generó a partir de experimentos en los que se sugería la existencia de una proteína inhibidora de la ATPasa de *Rhodospirillum rubrum*, una bacteria púrpura no sulfurosa del grupo de las α -proteobacterias fotosintéticas, (Romero Álvarez, Tesis de Licenciatura, 1982). Experimentos de tripsinólisis limitada en membranas de *P. denitrificans* revelaron un incremento en la actividad de ATPasa (Pacheco-Moisés *et al.*, 2000). Sin embargo, dado que aún no se descubría la subunidad ζ , en ese trabajo se adjudicó dicho incremento a la proteólisis de la subunidad ϵ , el autoinhibidor bacteriano conocido a la fecha de la publicación. Posteriormente, se descubrió y caracterizó la subunidad inhibitoria ζ gracias a experimentos pioneros de purificación del dominio F₁ y de la F₁F₀-ATPasa de *P. denitrificans*, que revelaron la presencia en F₁ de una subunidad extra de 11 kDa, no canónica y diferente a las descritas previamente en modelos bacterianos (de la Rosa-Morales, 2005). La secuenciación de la región N-terminal de esta nueva subunidad permitió determinar un alto grado de similitud (casi del 90%) con una proteína hipotética de función desconocida (DUF1476) de *R. sphaeroides*, una bacteria púrpura cercanamente emparentada con *P. denitrificans* (Ohkubo *et al.*, 1986) y una similitud mayor al 50 % con la región inhibitoria de la proteína IF₁ de humano (de la Rosa-Morales, 2005). Esta nueva proteína recibió el nombre de ζ y tras su clonación y sobreexpresión se realizaron ensayos de inhibición sobre la actividad hidrolítica y sintética de la F₁F₀ ATPasa en partículas subbacterianas (PSB) de *P. denitrificans* y en el complejo F₁ puro (parcialmente carente de las subunidades ϵ y ζ). Cabe destacar que *P. denitrificans* cuenta con el gen que codifica a la subunidad ϵ y la presencia de esta proteína ha sido detectada en la F₁-ATPasa de *P. denitrificans*. Sin embargo, la subunidad ϵ no tiene actividad inhibitoria sobre la F₁-ATPasa de *P. denitrificans* (Zarco-Zavala *et al.*, 2014) y el análisis filogenético de la subunidad ϵ de α -proteobacterias, bacterias de otros grupos (como γ -proteobacterias y Bacilli) y eucariontes (donde se denomina δ), reveló diferencias que sugieren una divergencia evolutiva relacionada con la pérdida de la función inhibitoria en eucariontes y α -proteobacterias (**Fig. 10**; Zarco-Zavala, tesis de Doctorado, 2014).

La estructura tridimensional de la proteína inhibitoria ζ de *P. denitrificans* obtenida por resonancia magnética nuclear (NMR) reveló que ésta se compone por 4 α -hélices, tiene forma de haz y que su región N-terminal (residuos 1 a 19) es altamente flexible y sufre movimientos de bisagra (**Fig. 11**; Serrano *et al.*, 2014). Además, la presencia de ATP y ADP, genera cambios conformacionales importantes (Zarco-Zavala *et al.*, 2013, Zarco-Zavala *et al.*, 2014), esto de manera similar a lo que sucede en la subunidad ϵ de *E. coli*, donde la forma compacta no inhibitoria se ve favorecida en presencia de ATP y la forma extendida en presencia de ADP y ausencia de ATP (Feniouk *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2003).

La sobreposición de la estructura de Pd ζ con la ζ de *Jannaschia* sp. mostró una raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) de 1.3 Å (Serrano *et al.*, 2014). Además, alineamientos de más de 200 secuencias diferentes de la proteína ζ y análisis de predicción de estructura mostraron una alta identidad en las hélices α_1 , α_2 y α_3 , un alto grado de conservación de la estructura tridimensional y que el dominio N-terminal es la región más conservada de la proteína (Serrano *et al.*, 2014; Zarco-Zavala *et al.*, 2013; Zarco-Zavala *et al.*, 2014).

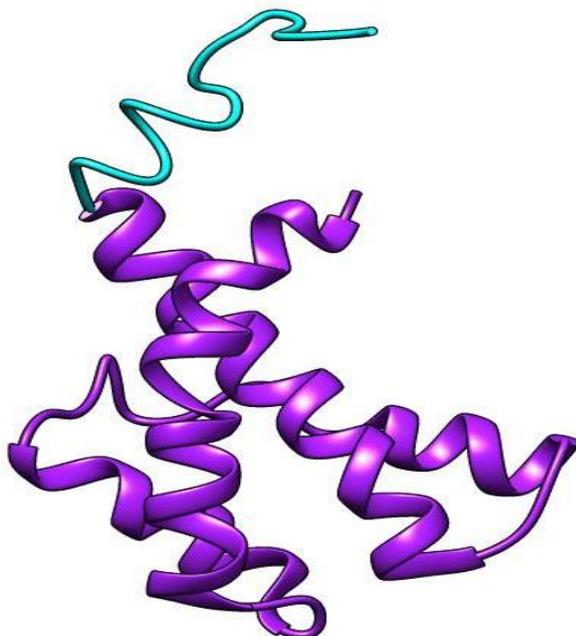


Figura 11. Estructura tridimensional de uno de los conformeros de la proteína inhibitoria ζ de *P. denitrificans* obtenida por resonancia magnética nuclear (PDB: 2LL0). Se observa una proteína en forma de haz compuesta de 4 α -hélices (morado) con un dominio N-terminal inhibitorio (cian) intrínsecamente desordenado y altamente flexible. Figura realizada con UCSF Chimera a partir de los datos estructurales de Serrano *et al.* (2014).

Experimentos de delección e inhibición mostraron que proteínas truncas Pd $\zeta^{\Delta NT}$ y Js- $\zeta^{\Delta NT}$ carentes de 14 y 19 residuos en la región N-terminal, respectivamente, no tienen capacidad inhibitoria sobre la actividad hidrolítica de la F₁-ATPasa de *P. denitrificans* purificada, además, por ensayos de cinética y cromatografía, se verificó que esta pérdida de la capacidad inhibitoria no se debe a un plegamiento anómalo de las proteínas truncas (Zarco-

Zavala *et al.*, 2014). El mecanismo inhibitorio de la proteína Pd ζ se dilucidó con gran exactitud a partir de experimentos de entrecruzamiento (Zarco-Zavala *et al.*, 2014), modelos *in silico* y ensayos de inhibición heteróloga IF₁-F₁-ATPasa de *P. denitrificans* (García-Trejo *et al.*, 2016) antes de que se conociera la estructura tridimensional de la F₁F₀ ATPasa de *P. denitrificans* (PDB: 5DN6; Morales-Ríos *et al.*, 2015). En breve: la región N-terminal intrínsecamente desordenada de la proteína inhibitoria Pd ζ se inserta en la interfaz α_E/β_E , interactuando también con la subunidad γ , la cual, tras dos giros de 120° dependientes de ATP, bloquea a Pd ζ en la “región central de inhibición general”, una zona formada por la interfaz entre $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$, mientras que la región globular no inhibitoria está relacionada con el anclaje y el mantenimiento de Pd ζ en su sitio de unión a F₁ (**Fig. 12 B**; García Trejo *et al.*, 2016). La estructura cristalográfica de la F₁F₀-ATPasa de *P. denitrificans* unida a Pd ζ , además de confirmar el mecanismo de inhibición propuesto (García-Trejo *et al.*, 2016), también confirmó la predicción de García-Trejo *et al.* (2016), de que la región N-terminal pasa de una conformación intrínsecamente desordenada (IDPr) a una de α -hélice tras insertarse en la región central de inhibición general (**Fig. 12 A**; Morales-Ríos *et al.*, 2015), tal como ocurre con la región N-terminal del inhibidor mitocondrial IF₁ (Bason *et al.*, 2014).

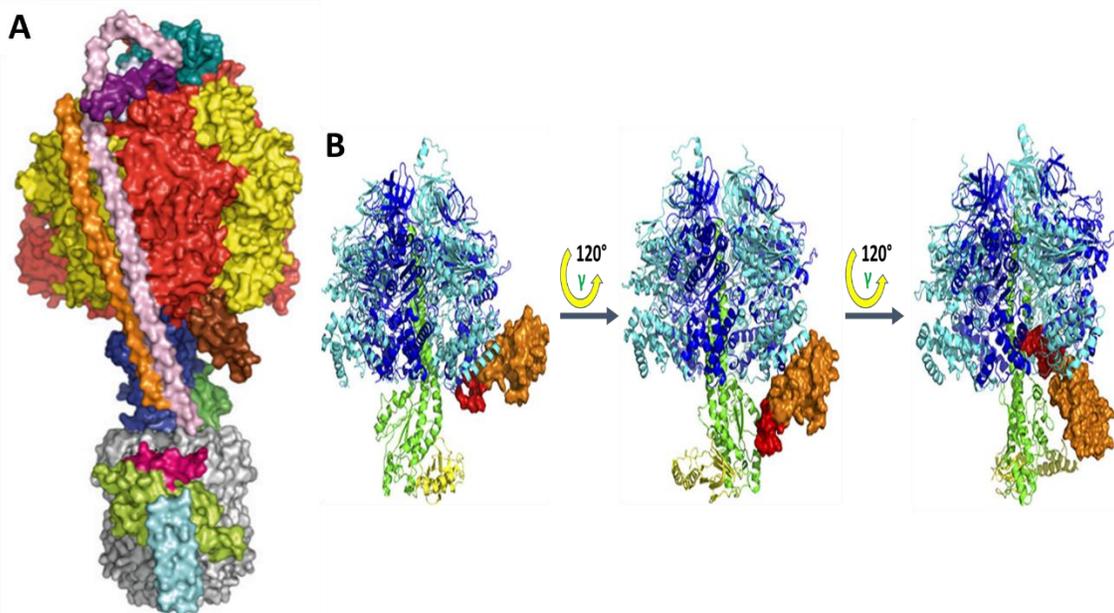


Figura 12. Mecanismo inhibitorio de la subunidad ζ de *P. denitrificans*. A, estructura cristalográfica de la F₁F₀-ATPasa autoinhibida de *P. denitrificans*, en café se observa la subunidad ζ insertada en la región central de inhibición general $\alpha_{TP}/\beta_{TP}/\gamma$. B, mecanismo inhibitorio de la subunidad ζ sobre un modelo de homología estructural construido *in silico* del dominio F₁ de *P. denitrificans*, en un inicio, la subunidad ζ (naranja) se inserta a la interfase α_E/β_E a través de su región N-terminal (rojo) y, tras dos giros de 120° dependientes de ATP de la subunidad γ , la región N-terminal de la subunidad ζ queda bloqueada en la región central de inhibición general $\alpha_{TP}/\beta_{TP}/\gamma$, inhibiendo la actividad hidrolítica del complejo. Cabe mencionar que este mecanismo se describió antes de que hubiera datos cristalográficos disponibles de la ATPasa de *P. denitrificans* (modificada de García-Trejo *et al.*, 2016 y Morales-Ríos *et al.*, 2015).

***Rhodobacter sphaeroides* como modelo de estudio**

Generalidades: *R. sphaeroides* es una bacteria púrpura fotosintética no sulfurosa perteneciente al grupo de las α -proteobacterias (Imhoff *et al.*, 2005), es decir, puede tolerar cantidades ≤ 0.5 mM de compuestos reducidos de azufre (como el ácido sulfhídrico) y oxidarlos a S^0 . Sin embargo, a diferencia de las bacterias púrpuras sulfurosas, las cuales pueden soportar concentraciones mayores de compuestos reducidos de azufre, el S^0 formado no es almacenado en gránulos citoplasmáticos, en lugar de ello, es depositado extracelularmente (Hansen y van Gernerden, 1972). Análisis filogenéticos utilizando el gen ribosomal 16s colocan al género *Rhodobacter* como grupo hermano del género *Paracoccus* (Fig. 13; Imhoff *et al.*, 2005), además, se ha mostrado que existe una gran cantidad de genes altamente conservados entre *R. sphaeroides* y *P. denitrificans* (la primera bacteria en la que se describió la proteína ζ como regulador de la ATPasa; de la Rosa-Morales, 2005; Morales-Ríos *et al.*, 2010), lo que ha llevado a proponer que *P. denitrificans* es una versión no fotosintética de *R. sphaeroides* (Imhoff *et al.*, 2005; Mackenzie *et al.*, 2007).

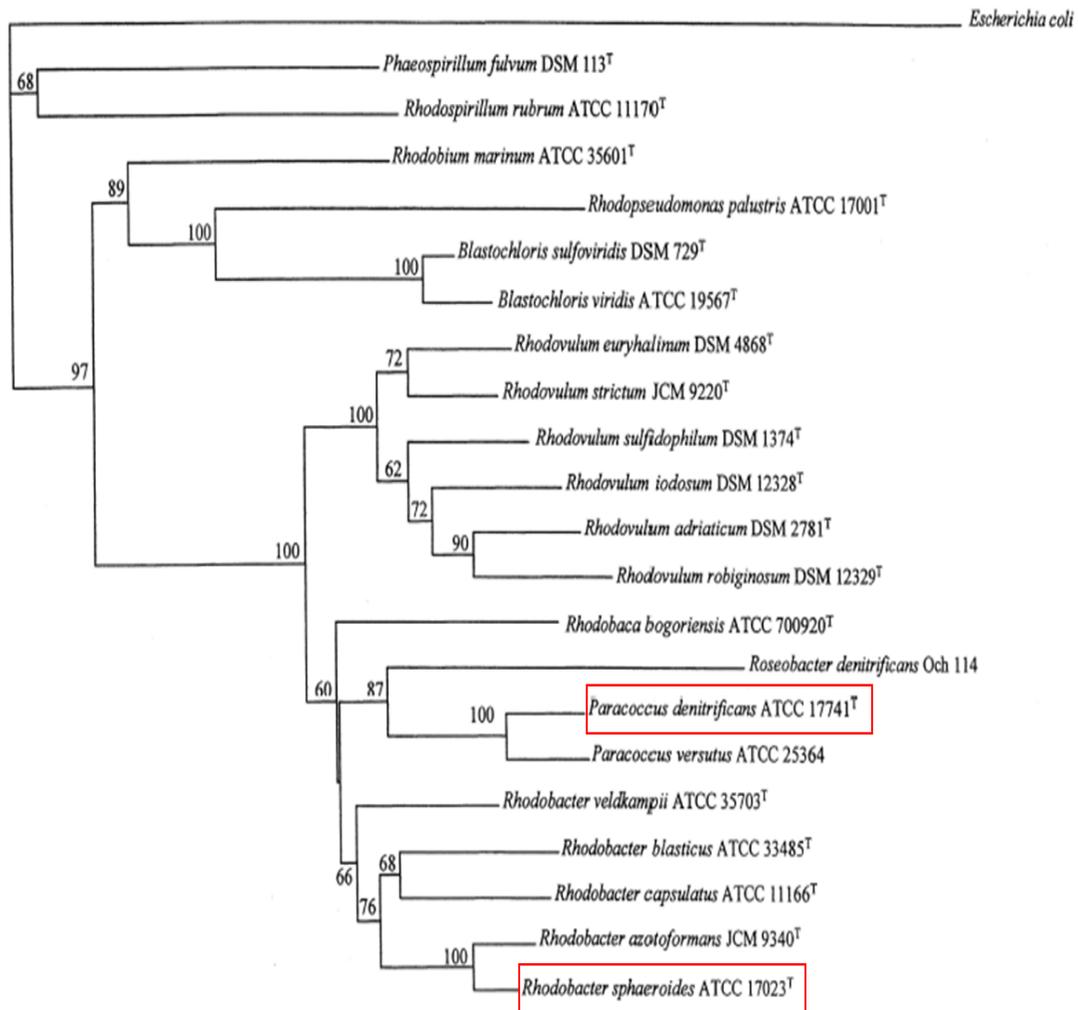


Figura 13. Árbol filogenético de diferentes especies del género *Rhodobacter* y otras α -proteobacterias, construido a partir del gen ribosomal 16S. Los rectángulos rojos encierran a *R. sphaeroides* y *P. denitrificans*.

Nótese que los géneros *Rhodobacter* y *Paracoccus* son grupos hermanos y comparten un ancestro común inmediato. *E. coli* fue utilizada como grupo externo (modificada de Imhoff *et al.*, 2005).

Esta bacteria, *R. sphaeroides*, puede ser aislada a partir de muestras de agua donde las concentraciones de compuestos reducidos de azufre son muy bajas o indetectables (Madigan *et al.*, 2009). Interesantemente, su presencia, junto con la de otras bacterias púrpuras no sulfurosas, ha sido detectada en aguas residuales en concentraciones de hasta 10^6 células/mL (en contraste, bacterias púrpuras sulfurosas fueron detectadas a concentraciones de sólo 10^3 células/mL; Siefert *et al.*, 1978) y en lagunas de desecho, donde las condiciones de crecimiento son óptimas (poco o nulo oxígeno y presencia de luz), lo que ha permitido observar la formación de afloramientos rojizos intensos de bacterias púrpuras no sulfurosas, asociados a una reducción en el olor fétido característico de las lagunas de desecho (Madigan *et al.*, 2009).

En términos metabólicos, *R. sphaeroides* es uno de los organismos más versátiles que se conocen, puede crecer en condiciones aerobias y anaerobias; en luz y oscuridad. Es capaz de llevar a cabo respiración aerobia y anaerobia, fermentación (Schultz y Weaver, 1982), quimiosíntesis (autótrofa y heterótrofa) y fotosíntesis anoxigénica (autótrofa y heterótrofa), además, es una bacteria fijadora de nitrógeno. En el caso de la fotosíntesis heterótrofa y quimiosíntesis heterótrofa, compuestos orgánicos simples, entre ellos piruvato y malato, son utilizados como fuente de carbono y donadores de electrones, pero cuando estos procesos se llevan a cabo en condiciones autótrofas, el CO_2 es la única fuente de carbono y el hidrógeno molecular o compuestos reducidos de azufre son utilizados como agentes reductores (Hansen and van Gemerden, 1972; Mackenzie *et al.*, 2007; Madigan *et al.*, 2009). Cabe destacar que la mayoría de las bacterias púrpuras no sulfurosas crecen mejor como fotoheterótrofas y con amoníaco como única fuente de nitrógeno (Sojka, 1978), sin embargo, el crecimiento de *R. sphaeroides* es óptimo cuando N_2 es la única fuente de nitrógeno (Madigan *et al.*, 1984).

Diferentes razones han hecho de *R. sphaeroides* la bacteria fotosintética más estudiada, una ellas es su aparato fotosintético y regulación. La expresión del aparato fotosintético de *R. sphaeroides* está controlada por diferentes vías de señalización celular, las cuales conducen a la transcripción de genes del fotosistema tras la remoción de oxígeno en el medio. Esta inducción implica la formación de invaginaciones de la membrana plasmática llamadas membranas intracitoplásmicas o cromatóforos, donde se encuentra el aparato fotosintético y los complejos transportadores de electrones (Zeilstra-Ryalls *et al.*, 1998). El oxígeno es el principal regulador ambiental de la expresión del aparato fotosintético, mientras que la intensidad de luz controla la abundancia de los complejos formadores del fotosistema, particularmente del complejo antena 2 (LHC2; Kiley y Kaplan, 1988). Cabe mencionar que los complejos transportadores de electrones son compartidos por las vías fotosintéticas y las vías respiratorias (Melandri y Zannoni, 1978).

Cadena respiratoria y transportadores de electrones: *R. sphaeroides* tiene una cadena respiratoria ramificada, ya que puede aceptar electrones a través de la NADH

deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa (Ferguson *et al.*, 1987). También, cuenta con un citocromo *bc*₁, el transportador de electrones citocromo *c*₂, la citocromo *c* oxidasa tipo-*aa*₃ y la citocromo *c* oxidasa tipo-*cbb*₃. El citocromo *bc*₁ y el *c*₂ se expresan constitutivamente, mientras que la citocromo *c* oxidasa tipo-*aa*₃ y la citocromo *c* oxidasa tipo-*cbb*₃ están reguladas por la concentración de oxígeno. La citocromo *c* oxidasa tipo-*aa*₃ tiene baja afinidad por el oxígeno y se expresa cuando la presión parcial de este gas incrementa, en contraste, la citocromo *c* oxidasa tipo-*cbb*₃ tiene alta afinidad por el oxígeno y se expresa sólo cuando hay poca disponibilidad de oxígeno (Mackenzie *et al.*, 2007; Mouncey *et al.*, 2000). Algunos aceptores finales de electrones durante la respiración anaerobia son N-óxido de trimetilamina (TMAO), dimetilsulfóxido (DMSO), nitrato y óxido nitroso (Ferguson *et al.*, 1987).

Cabe destacar que el TMAO y el DMSO son compuestos presentes en el ambiente, producidos, en parte, por procesos metabólicos diversos. El DMSO, por ejemplo, forma parte del ciclo del azufre y se genera a partir del dimetilsulfuro (DMS), el cual, a su vez, se forma a partir del dimetilsulfoniopropionato (DMSP; Schafer *et al.*, 2009). La fuente más importante de DMS es el océano, con una producción del 80% del DMS total observado en la atmósfera, mientras que el otro 20% proviene de suelos, estuarios, plantas y actividades antrópicas (Watts, 2000). En el océano, el DMS se forma a partir de DMSP, un metabolito producido por algas macroscópicas y fitoplancton (Malin y Kirst, 1997; Van Alstyne y Puglisi, 2007). La formación de DMS dependiente de DMPS involucra diferentes vías y enzimas bacterianas de diferentes familias (Johnston *et al.*, 2008). El DMS liberado a la atmósfera es fotooxidado, produciendo DMSO (Zhu *et al.*, 2003). Sin embargo, la producción de DMSO dependiente de DMS, también puede ocurrir metabólicamente por bacterias de diferentes grupos: bacterias fotosintéticas verdes sulfurosas (Vogt *et al.*, 1997), bacterias heterótrofas como *Pseudomonas acidovorans* (Zhang *et al.*, 1991), bacterias marinas (González *et al.*, 1997) etc. En *Rhodovulum sulfidophilum* se ha descrito una DMS deshidrogenasa como responsable de la oxidación del DMS a DMSO (McDevitt *et al.*, 2002).

Aparato fotosintético y transporte cíclico de electrones: el aparato fotosintético de *R. sphaeroides* se encuentra en invaginaciones de la membrana plasmática conocidas como membranas intracitoplásmicas o cromatóforos (Zeilstra-Ryalls *et al.*, 1998). Este aparato consta de tres complejos proteicos multiméricos y el transportador de electrones citocromo *c*₂. Los complejos proteicos multiméricos son los complejos antena LHC1 (o B₈₇₅) y LHC2 (o B₈₀₀₋₈₅₀), un centro de reacción (RC) y el complejo citocromo *bc*₁ (Drews, 1985). El LHC1 rodea al centro de reacción en una estequiometría fija 12:1-15:1 (Mackenzie *et al.*, 2007), mientras que el LHC2 rodea al LHC1 con una estequiometría variable e inversamente proporcional a la intensidad luminosa (Aagaar y Siström, 1972). Los complejos LHC1, LHC2 y RC están asociados de manera no covalente a pigmentos fotosintéticos como bacterioclorofilas y carotenoides, se estima que existen al menos 100 bacterioclorofilas por cada RC (Verméglio y Joliot, 1999).

Los LHC funcionan como antenas que capturan la energía fotónica proveniente de la luz solar y la transfieren hasta el RC, donde ocurre la separación de carga. El RC está formado por tres proteínas distintas: L, M y H. Particularmente, L y M tienen asociados componentes esenciales para la separación de cargas: 4 bacterioclorofilas, de las cuales, dos se asocian en un dímero que funciona como donador primario de electrones, dos bacteriofeofitinas, una quinona primaria (Q_A), que funciona como aceptor primario, una ubiquinona secundaria (Q_B), que funciona como aceptor secundario y un centro de hierro ferroso (Drews, 1985). La reducción de la ubiquinona a partir de la fotoexcitación de los LHC es un fenómeno con un rendimiento cuántico cercano a 1, es decir, casi por cada fotón absorbido se transfiere un electrón a la ubiquinona (Verméglio y Joliot, 1999). En cromatóforos de *R. sphaeroides* se ha estimado un rendimiento cuántico del 91 % (Cartron *et al.*, 2014).

La secuencia cíclica de procesos transductores de energía y óxido-reductores, en *R. sphaeroides*, ocurre como se describe a continuación: (1) el LHC2 es fotoexcitado y la energía se transduce a través de los pigmentos fotosintéticos hasta el LHC1 (2) el LHC1 fotoexcitado, transfiere la energía al dímero de bacterioclorofilas presente en el RC, donde se inicia la separación de cargas. (3) El dímero de bacterioclorofilas dona un electrón (casi por cada fotón absorbido) a la bacteriofeofitina, (4) la cual transfiere el electrón a la Q_A y esta (5) a la Q_B , produciendo una semiquinona que, tras una segunda transducción fotoinducida, será reducida por completo a ubiquinol. (6) El ubiquinol toma dos protones citoplasmáticos y (7) es liberado del RC, pasando a la poza de quinonas membranales, para después (8) ser oxidada en el centro Fe_2S_2 del complejo citocromo bc_1 , liberando 2 protones al periplasma (útiles para la fotofosforilación por la ATPasa). (9) El dominio $cyt\ c_1$ del complejo bc_1 , transfiere los electrones al transportador periplásmico citocromo c_2 oxidado, el cual (10) reduce al dímero de bacterioclorofilas fotoexcitadas del RC, lo que cierra el ciclo y permite que el dímero de bacterioclorofilas pueda reoxidarse tras un evento de fotoexcitación subsecuente (Fig. 14; Fecher *et al.*, 1989; Gennis *et al.*, 1993; Verméglio y Joliot, 1999).

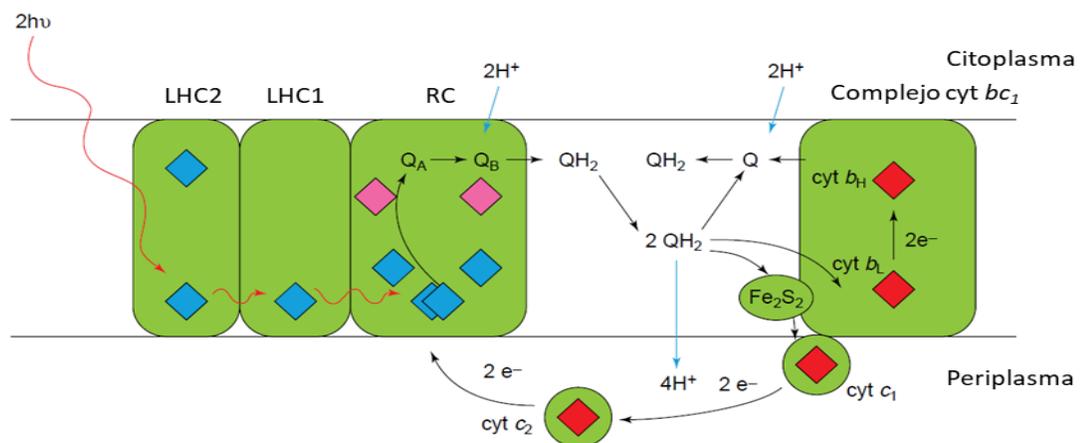


Figura 14. Fototransducción y transporte cíclico de electrones por el aparato fotosintético de *R. sphaeroides*. Los rombos azules representan moléculas de bacterioclorofila, los rombos rosas representan moléculas de

bacteriofeofitina y los rombos rojos representan grupos hemo. El proceso de transducción de energía inicia con la fotoexcitación del LHC2, el cual transfiere la energía luminosa al LHC1 y este último al RC, donde un dímero de bacterioclorofilas inicia la separación de cargas. El dímero de bacterioclorofilas transfiere 1 electrón (casi por cada fotón) a una bacteriofeofitina, la cual, a su vez, reduce a una ubiquinona primaria Q_A y esta a una ubiquinona secundaria Q_B . La reducción total de la Q_B provoca que el ubiquinol resultante se separe del RC y se mueva al interior de la membrana, para después ser oxidada en el complejo bc_1 , en un proceso dependiente del citocromo c y que genera FPM. El citocromo c reducido regresa al RC, donde se oxida, donando sus electrones al dímero de bacterioclorofilas, lo cual concluye el ciclo y permite que un nuevo evento de separación de cargas ocurra (modificada de Verméglio y Joliot, 1999).

Metabolismo fotoheterótrofo: durante el crecimiento fotoheterótrofo, el comportamiento “cíclico” de esta cadena se rompe, ya que diversos compuestos son capaces de donar electrones a la cadena, independientemente de la excitación luminosa y utilizando a la poza de ubiquinonas como intermediario esencial (Ferguson *et al.*, 1987). En condiciones fotoheterótrofas, diversas fuentes de carbono pueden funcionar como donadores de electrones, p. ej., glucosa, succinato, acetato, fructosa, ácidos dicarboxílicos etc. (Imam *et al.*, 2013). En este caso, la actividad de la succinato deshidrogenasa conlleva a la producción de ubiquinol, el cual puede aportar electrones directamente a la cadena “cíclica” fotosintética tras ser oxidada en el complejo citocromo bc_1 o ser utilizada por la NADH deshidrogenasa para la producción de NADH a partir de NAD^+ en un proceso dependiente del flujo reverso de electrones y FPM (Klemme, 1969). Además, moléculas inorgánicas también pueden funcionar como donadores de electrones, p. ej., el H_2 producido durante la fijación del N_2 , el cual es oxidado por una hidrogenasa membranal (una hidrógeno-ubiquinona óxidoreductasa) y los electrones son transferidos a una ubiquinona (Vignais *et al.*, 1985). Moléculas reducidas de azufre también pueden ser utilizadas como donadores de electrones, generando como producto azufre elemental que es depositado extracelularmente (Hansen and van Gemerden, 1972).

El NADH producido durante el crecimiento fotoautótrofo por flujo reverso de electrones puede ser utilizado para producir NADPH. La producción de NADPH ocurre gracias a la NAD(P)⁺ transhidrogenasa, una enzima que cataliza la transferencia de un anión de hidrógeno al NADP⁺, utilizando como donador de electrones al NADH y FPM como fuente de energía. Este NADPH puede ser utilizado en el ciclo de Calvin para la fijación del CO_2 (McEwan, 1994).

El ciclo de Calvin es la vía metabólica a través de la cual ocurre la fijación del CO_2 en condiciones de crecimiento fotótrofas. En *R. sphaeroides*, los genes que codifican para las 2 isoformas de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/reductasa (RubisCO), están apagados en condiciones aerobias, mientras que su expresión incrementa en condiciones fotosintéticas (Jouanneau y Tabita, 1986). Además, se han observado mayores niveles de las enzimas del ciclo de Calvin a medida que las fuentes de carbono están más reducidas (Tabita, 1988). Se ha propuesto que la función fisiológica del ciclo de Calvin es mantener el balance REDOX, ya que permite aprovechar el exceso de poder reductor proveniente de la oxidación de sustratos (Ferguson *et al.*, 1987). Esta visión se ha visto reforzada por diferentes experimentos: el crecimiento fotoheterótrofo de *R. capsulatus* en medio adicionado con

donadores de electrones altamente reducidos, como butirato y propionato, requiere de la adición de aceptores de electrones externos adicionales, como bicarbonato o aceptores respiratorios, mientras que el crecimiento con malato o succinato no requiere la adición de ningún aceptor externo (Richardson *et al.*, 1988), en este caso, los aceptores respiratorios, al igual que el ciclo de Calvin, ayudan a mantener un ambiente REDOX en homeostasis, ya que evitan que la poza de ubiquinonas se sobre-reduzca (McEwan, 1994). Otro experimento clave fue la construcción de mutantes de *R. sphaeroides* en las que se eliminó la expresión de ambas isoformas de la RubisCO y se observó un crecimiento nulo en condiciones fotoheterótrofas con succinato como fuente de carbono. El crecimiento se recuperó tras la adición de DMSO como aceptor de electrones (Falcone y Tabita, 1991). Además, células mutantes de *R. sphaeroides* carentes de la NAD(P)⁺ transhidrogenasa, fueron incapaces de crecer o mostraron un crecimiento fuertemente reducido en más del 90 % de 61 fuentes de carbono ensayadas, por lo que se considera que esta es una enzima esencial para el crecimiento fotoheterótrofo y su eliminación tiene un efecto deletéreo sobre el crecimiento, condicionado a la fuente de carbono que tiene a disposición (Imam *et al.*, 2013). Cabe destacar que durante el crecimiento fotoheterótrofo, el aporte de energía a través de la oxidación de compuestos reducidos del carbono tiene un impacto menor y su metabolismo está relacionado, principalmente, con reacciones anapleróticas y biosintéticas (McEwan, 1994). En parte por que la actividad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa es muy baja, hasta 5 veces menor que en condiciones aerobias (Beatty y Gest, 1981).

ATPasa y cromatóforos: el análisis por espectrometría de masas de diferentes fracciones subcelulares, incluyendo los cromatóforos aislados de *R. sphaeroides*, reveló la presencia de proteínas relacionadas con la síntesis de ATP, transporte de electrones y complejos fotosintéticos, entre las cuales destacan subunidades de la ATPasa, proteínas de complejos antena y del centro de reacción, así como el citocromo *bc₁* y la citocromo *c* oxidasa tipo-*cbb₃* (Zeng *et al.*, 2007). Además, análisis cinéticos en cromatóforos de *Rhodobacter capsulatus* han estimado la presencia de 1 complejo F₁F₀-ATPasa por cromatóforo (Feniouk *et al.*, 2002). Sin embargo, análisis de microscopía electrónica, microscopía de fuerza atómica y espectrometría de masas cuantitativa en cromatóforos aislados de *R. sphaeroides*, han llevado a la construcción de un modelo con 2 F₁F₀-ATPasas por cromatóforo (**Fig. 15 A**; Cartron *et al.*, 2014). Cabe destacar que los cromatóforos *in vivo* se comportan como una red vesicular interconectada o un retículo que ocupa la mayor parte del volumen citoplasmático y no como vesículas discretas independientes (**Fig. 15 B**; Scheuring *et al.*, 2014).

La presencia de dos ATPasas por cromatóforo en *R. sphaeroides* (**Fig. 15 A**; Cartron *et al.*, 2014) puede ser explicada por los datos de espectrometría de masas de la membrana interna (MI), los cuales muestran que esta última es una fracción celular enriquecida en ATPasas, con una cantidad de 2 a casi 10 veces más con respecto al número estimado en cromatóforos (Zeng *et al.* 2007). Además, la MI (rica en ATPasas) y la membrana correspondiente a los cromatóforos están interconectadas en una manera dependiente de la

etapa de desarrollo (Tucker *et al.*, 2010). Durante etapas tempranas de desarrollo el número de contactos entre la MI y la membrana de los cromatóforos es mayor que durante etapas tardías más maduras (al final de la fase log de crecimiento; Scheuring *et al.*, 2014). Es posible que en estos puntos de contacto la cara externa de la membrana de los cromatóforos esté directamente expuesta al espacio periplásmico (Tucker *et al.*, 2010), por lo que se puede sugerir que la FPM generada en los cromatóforos por el aparato fotosintético puede ser utilizable por las ATPasas de la MI, en una medida dependiente del número de contactos y por, ende, de la etapa de desarrollo.

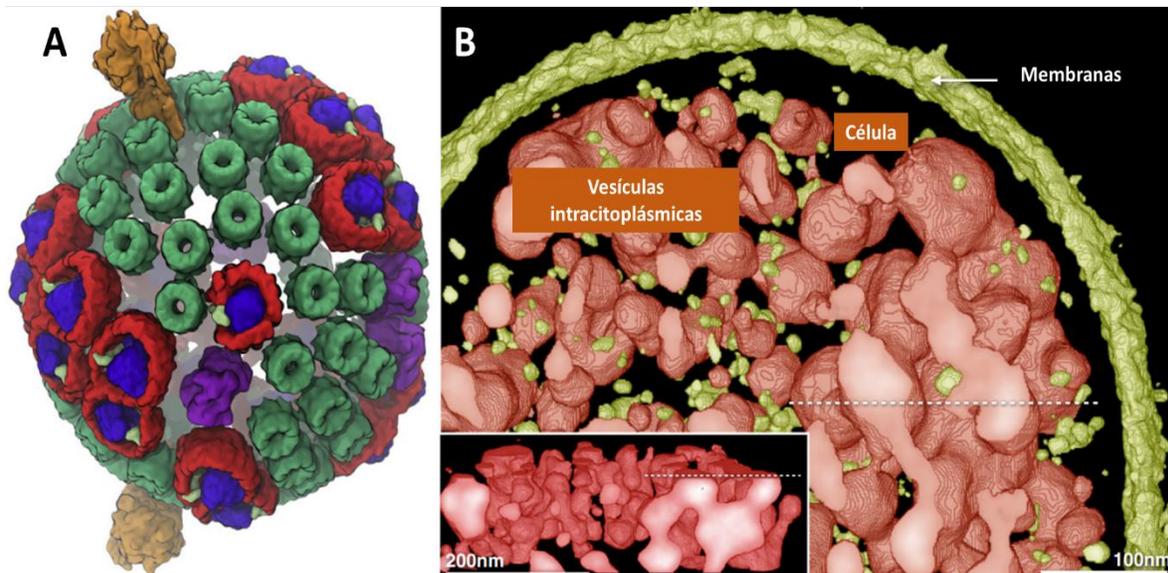


Figura 15. Cromatóforos de *R. sphaeroides*. A, modelo estructural de un cromatóforo purificado, se observa la presencia de 2 ATPasas (naranja), así como centros de reacción (mayoritariamente diméricos, azul) rodeados por el complejo antena I (rojo), complejos antena II (verde) y el citocromo *bc1* (morado). B, modelo estructural de la organización en red vesicular de los cromatóforos en células de *R. sphaeroides*, construido a partir de diferentes secciones tomográficas (en dos ejes) analizadas por microscopía electrónica. (A, modificada de Cartron *et al.*, 2014 y B, modificada de Scheuring *et al.*, 2014).

Finalmente, es notable destacar que los análisis de espectrometría de masas de Zeng *et al.* (2007) se realizaron bajo un esquema de espectrometría de resonancia ciclotrónica por transformada de Fourier (FT-ICR), utilizando un enfoque de identificación basado en péptidos etiqueta de masa precisa (AMT). Este enfoque combina la alta resolución de la cromatografía líquida (LC) con la alta resolución, sensibilidad y precisión ofrecida por la FT-ICR para la determinación de la masa e identificación de péptidos en mezclas con hasta 10^5 componentes. La alta resolución, sensibilidad y precisión del método se debe, en parte, al uso de péptidos calibrantes internos de masa conocida, el uso de un programa que considera múltiples estados de carga para los péptidos ionizados y, en gran medida, a la resolución, sensibilidad y precisión inherente a la detección por resonancia de ciclotrón (Smith *et al.*, 2002). Estas características hacen del FT-ICR una técnica ideal para estudiar proteomas de diferentes regiones subcelulares (membrana plasmática, membrana interna, citoplasma,

cromatóforos, etc.), ya que, junto con técnicas de fraccionamiento celular y proteico, se pueden identificar proteínas exclusivas y compartidas de cada región subcelular (Zeng *et al.* 2007).

Además, el uso de AMTs bajo el esquema FT-ICR tiene diversas ventajas sobre métodos convencionales de identificación de péptidos, como el método por 2D (intercambio iónico/fase reversa)-LC acoplada a una primera detección por espectrometría de masas (MS), la subsecuente disociación de los péptidos y una segunda detección por MS (LC-MS/MS), utilizando una trampa iónica convencional. Algunas ventajas de la FT-ICR usando AMTs son que (1) el número de fraccionamientos previos al análisis por FT-ICR se minimiza a una LC por fase reversa, lo que implica una menor pérdida de la muestra y ahorro de tiempo, (2) la identificación de proteínas requiere un solo paso de detección por MS en lugar de dos, lo que incrementa el rendimiento en una manera casi proporcional al número de péptidos presentes en cada detección. Además, en análisis por LC-MS/MS los péptidos de menor abundancia no suelen ser analizados, por lo que (4) la identificación por FT-ICR es un método de mayor cobertura. Si en análisis por LC-MS/MS se desase analizar a los péptidos de menor abundancia, su señal debe ser mayor, por lo que es necesario incrementar el tiempo de acumulación de la señal, lo que (5) haría del FT-ICR una técnica con un rendimiento aun mayor (Smith *et al.*, 2002).

Sin embargo, el uso de AMTs requiere su validación inicial (y única) a partir de péptidos potenciales de etiqueta de masa (PMT). Para un PMT, esta validación consiste en su identificación previa por LC-MS/MS y la subsecuente detección de alguna especie con la masa predicha para el PMT en un tiempo de elución de la LC congruente con el PMT tras su análisis por FT-ICR. Experimentos subsecuentes con AMT validados no requieren el paso previo de LC-MS/MS (Smith *et al.*, 2002).

Justificación y antecedentes

R. sphaeroides es una de las bacterias fotosintéticas más estudiadas debido a sus características fotosintéticas, versatilidad metabólica, capacidad de fijar CO₂ y N₂, diversidad de sistemas de transporte de electrones y posibles aplicaciones biotecnológicas y de biorremediación; una búsqueda (realizada el 15/01/2021 y el 03/05/2021) en la base de datos MEDLINE a través de PubMed con las entradas “*Rhodobacter sphaeroides*”, “*Rhodobacter capsulatus*”, así como las cianobacterias “*Synechococcus elongatus*” (de interés biotecnológico por su rápido crecimiento; Ungerer *et al.*, 2018), “*Arthrospira platensis*” (de interés alimenticio por su contenido nutricional; Wu *et al.*, 2005), “*Lyngbya majuscula*” (de interés biotecnológico por la producción de compuestos bioactivos; Abed *et al.*, 2009) y “*Prochlorococcus marinus*” (el organismo fotosintético dominante en el océano; Dufrense *et al.*, 2003), condujo a 4,152, 1,609, 796, 377, 166 y 112, respectivamente, mientras que la búsqueda con el motor de Google Académico usando las mismas entradas, condujo a 37,900, 24,000, 14,900, 19,300, 6,940 y 5,610 resultados, respectivamente. Sin embargo, poco se conoce acerca de la regulación endógena de su F₁F₀-ATPasa. Experimentos pioneros de purificación y caracterización de las subunidades que componen al dominio F₁ de la ATPasa de *R. sphaeroides* revelaron la presencia de las 5 proteínas canónicas conocidas en otros modelos bacterianos, α , β , γ , δ y ϵ , además, se determinó que la enzima tiene una K_m para Mg²⁺-ATP cercana a 1 mM y una actividad específica de 53 nmoles/min/mg de proteína en extracto crudo (Müller *et al.*, 1982). Por otro lado, análisis comparativos por BLAST, ensayos electroforéticos y ensayos de Western blot realizados a partir de cromatóforos de *R. sphaeroides*, han revelado la presencia de la subunidad regulatoria ζ (Rs ζ) en su F₁F₀-ATPasa (Morales-Ríos *et al.*, 2010; Zarco-Zavala *et al.*, 2014), cuya estructura, mecanismo inhibitorio y papel fisiológico han sido bien caracterizados en *P. denitrificans* (García-Trejo *et al.*, 2016; Mendoza-Hoffmann *et al.*, 2018; Morales-Ríos *et al.*, 2010; Morales-Ríos *et al.*, 2015; Serrano *et al.*, 2014; Zarco-Zavala *et al.*, 2014). Además, el gen que codifica para la proteína Rs ζ fue identificado, amplificado, clonado (construcción putativa pET3a/RSP_2125) e introducido en células de *E. coli* DH5alfa y *E. coli* BL21(DE3)-pLysS para llevar a cabo la sobreexpresión de la subunidad Rs ζ . Sin embargo, las células transformantes fueron inestables, por una razón independiente de la construcción (ver: “Obtención de células transformantes estables de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS pET3a/RSP_2125” de la sección de “Discusión”), pues se observó una reducción importante en la expresión de la proteína Rs ζ durante experimentos ulteriores (Gilberto Garduño y J. J. García-Trejo, comunicación personal).

Adicionalmente, aunque la alta similitud entre la proteína ζ de *R. rubrum* (Rr ζ), Rs ζ y Pd ζ (ver “Análisis estructural comparativo de la proteína ζ ” de la sección de “Resultados”) sugiere que se debe conservar la función inhibitoria de la subunidad Rs ζ , experimentos en nuestro laboratorio con subunidades ζ de α -proteobacterias rizobiales no fotosintéticas, han mostrado que la función inhibitoria de ζ se ha perdido a lo largo de la evolución de las α -proteobacterias (Mendoza-Hoffmann, tesis de Doctorado, 2018), de tal modo que no hay garantía de que la función inhibitoria de Rs ζ se conserve. Aunque se ha corroborado que ζ

está presente en *R. sphaeroides* unida a la RsF_1F_0 -ATPasa (Morales-Ríos, *et al* 2010), no se ha demostrado que la $\text{Rs}\zeta$ conserve su función inhibitoria. De confirmarse esta función inhibitoria, será la primera evidencia de que ζ es un inhibidor natural de la F_1F_0 -ATPasa en α -proteobacterias fotosintéticas.

Objetivos

Objetivo general

- Determinar la posible función inhibitoria de la proteína hipotética con dominio DUF1476 (ζ) de bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas sobre la actividad hidrolítica de la F_1F_0 -ATPasa de este grupo de bacterias

Objetivos particulares

- Determinar si existe homología estructural entre la subunidad ζ de *Paracoccus denitrificans* (Pd ζ), *Rhodospirillum rubrum* (Rr ζ) y *Rhodobacter sphaeroides* (Rs ζ).

- Obtener células transformantes estables de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS con la construcción pET3a/RSP_212. Es decir, células en las que la expresión de la proteína Rr ζ no se pierda y sea reproducible a lo largo de todos los experimentos.

- Sobreexpresar y purificar la proteína recombinante Rs ζ a partir de células transformantes de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS pET3a/RSP_2125.

- Determinar si la proteína Rs ζ recombinante tiene función inhibitoria sobre la actividad hidrolítica de la F_1F_0 -ATPasa de *R. sphaeroides*.

Materiales y métodos

Análisis estructural comparativo de diferentes proteínas ζ

Mediante Clustal Omega y Jalview, se realizó el alineamiento múltiple de las secuencias proteicas completas: Rr ζ de *R. rubrum* (no. de acceso: WP_011388472), Rs ζ de *R. sphaeroides* (no. de acceso: WP_002719280), Pd ζ de *P. denitrificans* (no. de acceso: 2LL0), Ja ζ de *Jannaschia* sp. (no. de acceso: WP_011455667) y la Rc ζ de *R. capsulatus* (no. de acceso: WP_013067880.1) y de los primeros 20 aminoácidos del extremo N-terminal de estas secuencias proteicas.

Adicionalmente, se hizo un modelo *in silico* de la estructura tridimensional de Rr ζ y de Rs ζ mediante el software gratuito de predicción y análisis Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015; disponible en: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). La visualización del modelo y su comparación con la subunidad ζ de *P. denitrificans* se realizó en Chimera.

Cepas y vectores plasmídicos

En la tabla 1 se resumen algunas características principales de las cepas y vectores plasmídicos utilizados durante el presente trabajo. El pJET1.2/blunt se compró a la compañía Thermo Scientific™, mediante el kit *CloneJET PCR Cloning Kit*, mientras que el pT7-7 y el pET3a fueron amablemente donados por el Dr. José Salud Rodríguez Zavala (adscrito al Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chávez", México) y la Dra. Gloria Alcántara Hernández (adscrita al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM), respectivamente. Las cepas *R. rubrum* ATCC 11170 y *R. sphaeroides* 2.4.1, fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Heliodoro Celis, del Instituto de Fisiología Celular.

Tabla 1. Cepas y vectores plasmídicos utilizados en el presente trabajo.

| Cepa o plásmido | Características principales | Referencias |
|------------------------------------|--|--|
| <i>E. coli</i> DH5 α | Cepa para mantenimiento de vectores plasmídicos. F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ - | Hanahan <i>et al.</i> (1983) |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3)- pLysS | Cepa para sobreexpresión de proteínas bajo el control del promotor T7. F-, ompT, hsdSB (rB-, mB-), dcm, gal, λ (DE3), pLysS, Cmr. | Studier y Moffattf (1985) |
| <i>R. rubrum</i> ATCC 11170 | Cepa tipo de <i>R. rubrum</i> y del género <i>Rhodospirillum</i> Tamaño del genoma: 4.4 Mpb (no. de ensamble NCBI: GCA_000013085.1) Cromosomas: 1 (4.35 Mpb; 65 % GC) Plásmidos: 1 (53.7 kpb; 60 % GC) | Munk <i>et al.</i> (2011); Pfennig y Truper (1971) |

| | | |
|-----------------------------|--|---|
| | Cepa silvestre de <i>R. sphaeroides</i> | |
| <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 | Tamaño del genoma: 4.62 Mpb (no. de ensamblaje NCBI: GCA_003324715.1) Cromosomas: 2 (3.19 Mpb; 69 % GC y 0.94 Mpb; 69 % GC) Plásmidos: 4 (pA, 0.12 Mpb; 69.6 % GC, pB, 0.11 Mpb; 70.1 % GC, pC 0.11 Mpb; 63.8 % GC y pDE, 0.15 Mpb; 64.2 % GC) | Van Niel (1944); Leidenfrost <i>et al.</i> (2020) |
| pJET1.2/blunt | Vector para clonación y mantenimiento. origen (pMB1) bla (Ap ^R) PlacUV5 eco47IR promotor-T7 | Thermo Scientific, patente: US 2009/0042249 A1, no. de acceso Genbank NCBI: EF694056.1 |
| pT7-7 | Vector para subclonación y sobreexpresión. Promotor-T7 terminador-T7 origen (pBR322) bla (Ap ^R) | Tabor y Richardson (1985) |
| pET3a | Vector para subclonación y sobreexpresión. Promotor-T7 terminador-T7 origen (pBR322) bla (Ap ^R) Tag-T7 | Rosenberg <i>et al.</i> , (1987) |
| pET3a/RSP_2125 | pET3a con el gen RSP_2125 insertado entre las secuencias reconocidas por BamHI y NdeI del sitio de clonación múltiple (MCS). Promotor-T7 terminador-T7 origen (pBR322) bla (Ap ^R) Tag-T7 | Presente trabajo; construcción realizada por Gilberto Garduño Javier |
| pJET1.2/Rru_A0714 | pJET1.2/blunt con el gen Rru_A0714 (más 15 bp río abajo del codón de paro) insertado entre los extremos romos producidos por el corte con EcoRV en el MCS. origen (pMB1) bla (Ap ^R) PlacUV5 eco47IR promotor-T7 | Presente trabajo |

Cultivo y crecimiento de las cepas

E. coli DH5a y *E. coli* BL21(DE3)-pLysS fueron crecidas en medio LB (triptona 1 % m/v, NaCl 1 % m/v y extracto de levadura 0.5 % m/v) a 37 °C y con agitación a 180 rpm. Además, para la selección de transformantes fue necesario añadir al medio ampicilina a 100 µg/mL y/o cloranfenicol a 25 µg/mL. En los ensayos de sobreexpresión con IPTG se añadió, además de ampicilina y cloranfenicol, rifampicina a 25 µg/mL.

Para la preparación de cromatóforos, *R. sphaeroides* se creció hasta alcanzar la fase estacionaria (10 días de crecimiento) en condiciones fotoheterótrofas (en ausencia de oxígeno y presencia de luz, utilizando una lámpara de tungsteno de 40 W a 30 cm de distancia) en 10 L del medio descrito por Cohen-Bazire *et al.* (1957). Para 1 L de este medio se mezclan 20 mL de la solución 1 (fosfato de potasio 1 M, pH 6.8), 20 mL de la solución 2 (malato de amonio 1 M, pH 6.8) y 20 mL de la solución 3 (para 1 L: 10 g de ácido nitrilotriacético, 14.45 g de MgSO₄, 3.335 g de CaCl₂*2H₂O, 9.25 mg de (NH₄)₆Mo₇O₂₄*4H₂O, 99 mg de

FeSO₄*7H₂O, 50 mg de ácido nicotínico, 25 mg de tiamina, 0.5 mg de biotina y 50 mL de “solución de metales 44” (para 100 mL: 250 mg de EDTA, 1095 mg de ZnSO₄*7H₂O, 500 mg de FeSO₄*7H₂O, 154 mg de MnSO₄*H₂O, 39.2 mg de CuSO₄*5H₂O, 24.8 mg de Co(NO₂)₂*6H₂O, 17.7 mg de Na₂B₄O₇*10H₂O) y se afora con 940 mL de agua destilada. Tras la cosecha y lavado de las células con una solución de MOPS 50 mM y KCl 50 mM, pH 7.5. se prepararon los cromatóforos por sonicación y centrifugación de acuerdo al método de Behrens y Meis (1985).

Transformación de *E. coli* DH5α con la construcción pET3a/RSP_2125, digestión y visualización en gel de agarosa

El plásmido pET3a/RSP_2125 fue obtenido anteriormente por Gilberto Garduño Javier (miembro del laboratorio del Dr. García Trejo) quien identificó la secuencia del gen RSP_2125, el cual codifica para la proteína ζ de *R. sphaeroides* (Rsζ), para posteriormente amplificar y clonar RSP_2125 en el vector de expresión pET3a. Incluso, realizó pruebas de inducción utilizando células transformantes de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS, donde se observó la inducción de una proteína con una masa similar a la esperada para la proteína Rsζ (11.8 kDa). Sin embargo, tras la repetición de las pruebas de inducción, la banda correspondiente a la subunidad Rsζ se vio fuertemente disminuida, posiblemente por un problema relacionado con la falta de cloranfenicol en el medio (ver “Obtención de células transformantes estables de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS pET3a/RSP_2125” de la sección de “Discusión”). Además, la secuencia de la construcción no fue verificada en su momento. El plásmido pET3a/RSP_2125 fue amablemente facilitado por Gilberto Garduño Javier, lo que permitió acelerar el proceso de sobreexpresión, purificación y ensayos de inhibición sobre la ATPasa de *R. sphaeroides* y de *P. denitrificans*.

Se transformó a *E. coli* DH5α con la construcción pET3a/RSP_2125, bajo el protocolo de choque térmico descrito anteriormente, utilizando 200 ng de DNA plasmídico; se seleccionaron colonias transformantes y se sembraron en 10 mL de LB/ampicilina (100 µg/mL). Los cultivos se crecieron durante toda la noche a 37 °C y 180 rpm, para la posterior preparación de gliceroles y extracción de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina (Green y Sambrook, 2016).

Los plásmidos se digirieron con BamH y NdeI, las mezclas de digestión se incubaron a 37 °C durante toda la noche y las enzimas se inactivaron a 65 °C por 10 min.

Los 20 µL de cada una de las digestiones (mezclados con 4 µL de amortiguador de carga 6x) se cargaron y corrieron en un gel de agarosa al 1.5%, el cual se tiñó y visualizó como fue descrito anteriormente y tras la confirmación de peso de los fragmentos de restricción, las construcciones se utilizaron para transformar a *E. coli* BL21. Para ello fue necesario preparar células competentes por el método de CaCl₂.

Transformación de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS con la construcción pET3a/RSP_2125, digestión, visualización en gel de agarosa y secuenciación

Se utilizó la construcción pET3a/RSP_2125 purificada a partir de células transformantes de *E. coli* DH5α para transformar células competentes de *E. coli* BL21(DE3)-

pLysS (obtenidas por el método de CaCl₂ y almacenadas a -70 °C). La transformación se realizó por el método de choque térmico de células tratadas con CaCl₂. Sin embargo, al cultivar las células transformantes en LB/ampicilina (100 µg/mL)/cloranfenicol (25 µg/mL) para hacer pruebas de inducción, no hubo crecimiento, por lo que se hicieron pruebas de resistencia y se determinó que las células transformantes de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS pET3a/RSP_2125 eran sensibles a cloranfenicol (lo que indica pérdida del plásmido pLysS) y resistentes a ampicilina (lo que indica presencia de la construcción pET3a/RSP_2125). Lo anterior es relevante porque con estas células transformantes (que deberían ser resistentes a cloranfenicol) se hicieron pruebas de inducción con IPTG, creciendo a *E. coli* BL21(DE3)-pLysS pET3a/RSP_2125 en LB/ampicilina (100 µg/mL), únicamente, tal como había sido realizado anteriormente por Gilberto Garduño, sorpresivamente, no se observó ninguna banda inducida (datos no mostrados), tal como le sucedió a Gilberto Garduño tras la repetición de los experimentos de inducción. Esto motivó a generar nuevas células competentes de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS y nuevas células transformantes, pero utilizando en todo momento cloranfenicol (25 µg/mL) en el medio de cultivo.

Las células competentes se obtuvieron por el método de CaCl₂, para ello se creció un preinóculo de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS en 5 mL de LB/cloranfenicol (25 µg/mL) a 37 °C y 180 rpm, durante toda la noche. A partir de este preinóculo se obtuvieron las células competentes.

Se utilizó la construcción pET3a/RSP_2125 purificada a partir de células transformantes de *E. coli* DH5α para transformar estas nuevas células competentes. Esto se hizo por el método de choque térmico, sin embargo, ahora fueron plaqueadas en LB agar/ampicilina (100 µg/mL)/cloranfenicol(25 µg/mL).

Se seleccionaron colonias transformantes, las cuales fueron sembradas en LB agar/ampicilina (100 µg/mL)/cloranfenicol(25 µg/mL) y en 10 mL de LB/ampicilina (100 µg/mL)/cloranfenicol(25 µg/mL) a 37 °C y 180 rpm, durante toda la noche, para posteriormente preparar gliceroles y extraer el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina (Green y Sambrook, 2016).

Los plásmidos fueron digeridos con NdeI y HindII, durante toda la noche a 37 °C y las enzimas inactivadas incubando a 70 °C durante 10 min. Posteriormente, se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % y se visualizaron los fragmentos de restricción, tal como ha sido descrito anteriormente. Todas las colonias analizadas presentaron un mapa de restricción acorde a la secuencia de RSP_2125 y del vector pET3a.

Una de estas colonias fue seleccionada para experimentos subsecuentes de inducción y purificación de la proteína Rsζ. Además, el plásmido obtenido de un cultivo de la colonia seleccionada fue secuenciado en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, utilizando cebadores específicos para el promotor T7, el cual está presente en el vector de expresión pET3a.

Pruebas de inducción con IPTG

Para conocer la concentración de IPTG óptima de inducción para la sobreexpresión de la proteína Rsζ, se hicieron ensayos utilizando diferentes concentraciones de IPTG (0.1, 0.2, 0.3, 0.5 y 0.75 mM), además, se añadió rifampicina (25 µg/mL) para inhibir la síntesis de proteínas intrínsecas de *E. coli*, como se describe a continuación. Se creció un preinóculo en LB/ampicilina (100 µg/mL)/cloranfenicol (25 µg/mL) a partir de glicerol de una de las colonias transformantes de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS pET3a/RSP_2125 durante toda la noche a 37 °C y 180 rpm, el cual se utilizó como punto de partida para inocular 5 mL de LB ampicilina (100 µg/mL)/cloranfenicol (25 µg/mL) a una dilución 1:50; se inoculó un cultivo por cada concentración de IPTG.

Los cultivos se crecieron a 37 °C y 180 rpm hasta una D. O. a 600 nm de 0.5-0.6, entonces, se añadió IPTG suficiente para obtener una concentración final de 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 o 0.75 mM, así como rifampicina a una concentración final de 25 µg/mL. Los cultivos se dejaron incubando toda la noche a 37 °C y 180 rpm, después, se centrifugaron y la pastilla (células), se resuspendió en 500 µL de agua miliQ.

Posteriormente, 25 uL de cada muestra se mezclaron con 25 uL amortiguador de carga (glicerol 15 % v/v, SDS 2 % m/v, azul de bromofenol 0.02 % m/v, amortiguador Schægger - Von Jagow 3x 12.5 % v/v, DTT 1 mM y β-mercaptoetanol 5 % v/v), se calentaron a 95 °C durante 10 min y se analizaron por electroforesis tricina-SDS PAGE (Schægger y Von Jagow, 1987), la cual se corrió a 120 V (voltaje constante) durante 2 h, para después teñir las proteínas con azul de Coomassie (azul de Coomassie 0.1 %, metanol 40 % y ácido acético 10 %) y desteñir el gel con una solución acuosa de metanol al 50 % y ácido acético al 7.5 %. Mediante un análisis de densitometría se determinó que 0.3 mM de IPTG es la condición óptima para sobreexpresar la proteína Rsζ, por lo que es la que se utilizó en experimentos posteriores.

Purificación de la proteína recombinante Rsζ

Se purificó la proteína Rsζ a partir de 4 L de cultivo (repartidos en 8 matraces de 2 L de capacidad) de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS pET3a/Rsζ crecida durante toda la noche (16 h) en LB ampicilina (100 µg/mL)/ cloranfenicol (25 µg/mL) a 37 °C y 180 rpm, al cual se le añadió IPTG 0.3 mM y rifampicina (25 µg/mL) como se describió anteriormente; en la mitad de la fase exponencial (D. O._{600nm} ~ 0.6).

Una vez crecido el cultivo durante toda la noche, para la purificación de la proteína Rsζ se utilizó el siguiente protocolo: (1) las células se cosecharon por centrifugación a 6,000 rpm y 4 °C durante 15 min, después (2) fueron lavadas con ~150 mL de búfer A (Tris base 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5) y resuspendidas en amortiguador B (KH₂PO₄ 20 mM, EDTA 1mM, PMSF 0.017 %, pH 7). Las células resuspendidas y mantenidas en hielo (3) se rompieron por sonicación y, tras la adición de MgCl₂ (concentración final 10 mM) y una pizca de DNAsa (4) se centrifugaron a 12, 000 rpm y 4 °C durante 15 min, (5) se rescató el sobrenadante (extracto proteico), se le añadió EDTA (concentración final 10 mM) y (6) las proteínas se precipitaron por *salting out*; primero hasta una saturación del 50 % y, tras

centrifugar a 12, 000 rpm y 4 °C durante 15 min, el sobrenadante obtenido al 50 % de saturación, (7) se llevó al 80 % de saturación con sulfato de amonio. Este extracto proteico (8) se centrifugó a 12, 000 rpm y 4 °C durante 15 min y la pastilla de proteínas obtenida al 80 % de saturación (9) se resuspendió en 5 mL de amortiguador B + cOmplete (1/2 tableta por cada 200 mL), para después (10) ser dializada toda la noche en 1 L de amortiguador B, utilizando una membrana con tamaño de poro de 3 kDa. El extracto proteico dializado (11) se cargó en una columna de intercambio iónico dietil aminoetil-Sefarosa (DEAE-Sefarosa) previamente equilibrada con amortiguador B y, antes de eluir las proteínas, (12) se lavó 2 veces con 50 mL de amortiguador B. Las proteínas unidas a la columna (13) fueron eluidas por gradiente de KH_2PO_4 (de 100 a 500 mM). (14) Las fracciones fueron analizadas por electroforesis reductora tricina-SDS PAGE en geles Schagger-von Jagow. (15) Se seleccionaron las fracciones con la proteína Rs ζ , en este caso, los lavados con amortiguador B y el volumen muerto, (16) se mezclaron y (17) se concentraron secuencialmente mediante amicones con filtros de 30 kDa y 10 kDa. Esta mezcla proteica (18) se inyectó en una columna Superdex® 75 de exclusión molecular previamente equilibrada con amortiguador B. (19) Se recolectaron fracciones de 1 mL y (20) se analizaron por electroforesis reductora tricina-SDS PAGE en geles Schagger-von Jagow. A la fracción con la subunidad Rs ζ más enriquecida y pura y (21) se le añadió glicerol (concentración final del 20 %) y (22) se almacenó a -70 °C hasta su uso. Este protocolo ha sido previamente utilizado para purificar las subunidades ζ de *P. denitrificans* y otras α -proteobacterias (Morales-Ríos, *et al* 2010; Zaro-Zavala, *et al*, 2014). Sin embargo, en este caso particular, la Rs ζ no se unió a la resina DEAE, de tal modo que se eluyó relativamente limpia en los lavados con amortiguador B.

Se cuantificó la concentración de la proteína Rs ζ pura y de cromatóforos de *R. sphaeroides* por el método de Lowry-TCA (Lowry *et al.*, 1951; Peterson, 1977).

Ensayos de actividad de ATPasa e inhibición por Rs ζ

Se realizaron ensayos de actividad de ATPasa utilizando el método acoplado de piruvato cinasa (PK)-lactato deshidrogenasa (LDH), que basa en monitorear la oxidación del NADH a 340 nm de, la cual es equimolar a la hidrólisis de ATP por la ATPasa. La PK transfiere el grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) al ADP para producir ATP, mismo que es utilizable por la ATPasa. Mientras que el fosfoenolpiruvato pasa a su tautómero piruvato y este es reducido a lactato por la LDH, a expensas del poder reductor del NADH (**Fig. 16**; Ebel y Lardy, 1975; Pullman *et al.*, 1960). Además, se añadió LDAO al 0.15 % como activador de la ATPasa (Vázquez-Laslop y Dreyfus, 1986; Montero-Lomelí y Dreyfus, 1987).

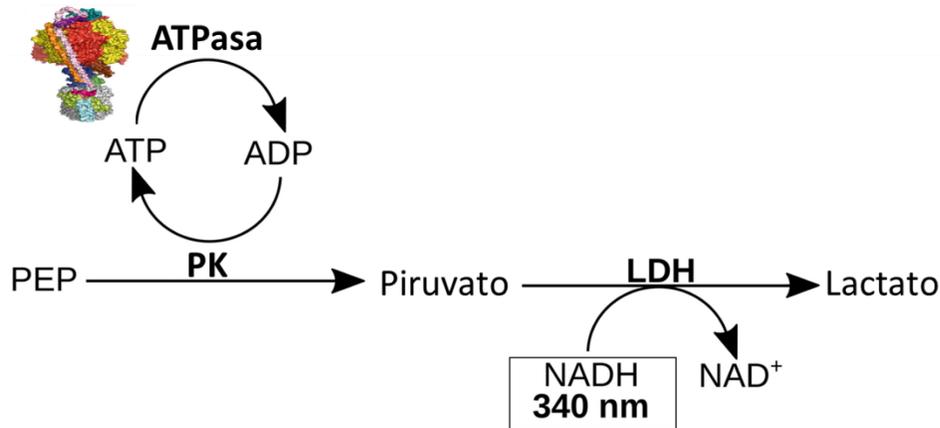


Figura 16: Ensayo acoplado de la piruvato cinasa (PK)-lactato deshidrogenasa (LDH). El fosfoenol piruvato (PEP) es desfosforilado a piruvato por la PK, produciendo ATP en el proceso. El piruvato es reducido a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH), utilizando NADH como donador de electrones. En este ensayo se mide el decaimiento en la Abs_{340nm} por el consumo de NADH, el cual es equimolar al consumo de ATP por la ATPasa (modificada de McFarlene y Murray, 2020).

Los ensayos de actividad de ATPasa e inhibición se realizaron en cromatóforos de *R. sphaeroides*, que fueron preparados por sonicación de células crecidas en condiciones fotosintéticas heterótrofas hasta la fase estacionaria y posterior centrifugación diferencial, de acuerdo al método de Behrens y Meis (1985).

Para realizar los ensayos de inhibición primero se reconstituyó $Rs\zeta$ en la F_1F_0 -ATPasa, para lo cual se re mezclaron 150 μg de cromatóforos (proteína), 17.09 μg de la proteína $Rs\zeta$ purificada, 0.3 μL de ATP-MgCl₂ 100 mM (concentración final 1 mM), 0.3 μL de rotenona 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (concentración final 0.001 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y amortiguador de reconstitución (sacarosa 250 mM, tris-HCl 20 mM, sulfito 60 mM, pH 8) suficiente para un volumen final de 30 μL . Al control negativo se le añadió buffer de reconstitución en lugar de proteína $Rs\zeta$. Se incubó a temperatura ambiente durante 20 min para favorecer la unión de la proteína $Rs\zeta$ a la ATPasa.

En celdas de plástico de 1 mL, se juntaron y homogeneizaron los 30 μL de la mezcla de pre-incubación con 720 μL de mezcla de reacción (tris 500 mM, sacarosa 250 mM, MgCl₂ 3 mM, acetato de potasio 300 mM, PEP 1.5 mM, LDAO 0.15 %, ATP 3 mM, NADH 200 μM , PK 4 U/mL, LDH 4 U/mL, pH 8). Inmediatamente después de haberse mezclado ambos componentes, en un espectrofotómetro se siguió la absorbancia durante 10 min a 340 nm y 37 °C. Se registraron las pendientes de cada curva y se calculó la actividad específica de ATPasa utilizando la ecuación 1, la cual refleja la Ley de Beer-Lambert.

$$Act. específica = \frac{\text{volumen de reacción}(mL) \times \Delta Abs_{340nm} \text{min}^{-1}}{\text{cantidad de proteína}(mg) \times 6.22} \quad (1)$$

Donde,

Act. específica: actividad específica de ATPasa, la cual queda expresada como $\mu\text{mol ATP}/\text{mg de proteína}/\text{min}$.

$m_{340nm}min^{-1}$: pendiente obtenida a 340 nm en un minuto promedio.

6.22: coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm.

Adicionalmente, con el fin de determinar la IC₅₀ de la proteína Rs ζ , se realizó una curva de inhibición con concentraciones crecientes de la proteína inhibitoria.

Búsqueda bioinformática del gen que codifica para la proteína ζ *R. rubrum* (Rru_A0714)

Durante nuestro estudio de la inhibición de la ATPasa por la subunidad ζ en α -proteobacterias fotosintéticas, decidimos también analizar el papel funcional de la subunidad ζ de *R. rubrum* (Rr ζ). El primer paso fue determinar la secuencia de la proteína Rr ζ mediante un análisis por BLASTp, utilizando como secuencia *query* (o secuencia de consulta) a la proteína Pd ζ (no. de acceso: 2LL0_A) contra la base de datos de proteínas no redundantes de *R. rubrum* ATCC 11170. Se encontró un solo blanco; una proteína hipotética con dominio de función desconocida (DUF1476), con una longitud de 112 residuos e identidad del 38.83 % (*E-value*: 5×10^{-15} ; no. de acceso: WP_011388472), la cual será nombrada como Rr ζ de aquí en adelante. Un segundo análisis por BLAST, ahora en la modalidad tBLASTn, permitió encontrar el gen que codifica para la proteína hipotética Rr ζ , para ello se utilizó como secuencia consulta a la proteína Rr ζ (no. de acceso: WP_011388472) y se comparó contra la colección de nucleótidos de *R. rubrum* ATCC 11170. Esto condujo a un solo blanco de 339 pares de bases desde el codón de inicio hasta el codón de paro, en la región 841,394-841,732 del genoma (no. de acceso: CP000230) y está anotado como el gen Rru_A0714. Observamos que la región 3' del gen cuenta con un alto contenido de GC (70 % en las últimas 30 pb, como referencia, el DNA cromosómico de *R. rubrum* tiene 65 % de GC), lo que puede influir negativamente sobre su amplificación, así que para el diseño de cebadores se descargó una secuencia con 15 pares de bases extra río abajo del codón de paro (región 841,394-841,747 del genoma), con una longitud total de 354 pb y que se muestra a continuación (verde, codón de inicio; rojo, codón de término; amarillo, región de 15 pb extra río abajo del codón de paro):

```
5' ATGAGCAATGTCTTTGACGACCGCAAGAAAGCTTTCGAAGCGAAGTA  
TCAACACGACGAGGAACAGCGTTTTTCGTCTGGTCTCTCATCGCAACCATTTGTT  
CGGGTTATGGGCGGCCGAAGCCCTGGGATTGACCGGGGCGGACGCGGAAACCT  
ATGCCCGGGCGTGGTTCGAAGTCGAAGTACTGACCGCCCGGGGCGAGGATGCGGTG  
ATCGGCCGGTTCTCGGCGATCTCGCGGCCCGGGGCATTGATATCGGTGAAGG  
TCGGCTGCGCATCAAGCTTGAGAAATGTCAGGGGCAGGCCGAGGCCCGCGAAA  
GGGCCACCCCGCGAGCCGTTCTTGAGAGTGGCTTGAAAAG 3'
```

Diseño de cebadores

El diseño de cebadores para amplificar el gen Rru_A0714 se hizo de forma manual, además, se agregaron sitios de corte para las enzimas NdeI (5'CATATG 3') y BamHI (5'GGATCC 3') en el *primer forward* y *reverse*, respectivamente. Los cebadores resultantes

tuvieron una longitud de 31 bp cada uno, incluyendo los sitios de corte para NdeI y BamHI. Con ayuda de la herramienta en línea *Tm Calculator* (disponible en: <https://tcalculator.neb.com/#!/main>), se determinó que la Tm para el cebador sentido es de 68°C y para el cebador antisentido es de 72°C, lo que significa que existe una diferencia de sólo 4 °C entre ellas, además los porcentajes de GC calculados son de 45% y 55%, respectivamente (en verde se muestran los sitios de corte para las enzimas de restricción):

Sentido: 5' **CATATG**AGCAATGTCTTTGACGACCGCAAGA 3'

Antisentido: 5' **GGATCC**CTTTTCAAGCCACTCTCAGAACGGC 3'

La longitud esperada del amplicón que incluye la zonas del sitio de restricción es de 363 bp.

Extracción y cuantificación de DNA genómico de *R. rubrum*

Se utilizaron 10 mg (peso húmedo) de células de *R. rubrum* crecidas hasta la fase estacionaria en el medio descrito por Cohen-Bazire *et al.* (1957) y bajo condiciones fotosintéticas (en ausencia de oxígeno y presencia de luz, utilizando una lámpara de tungsteno de 40 W a 30 cm de distancia). La obtención de DNA genómico se realizó mediante el kit Wizard® de Promega, siguiendo el protocolo del fabricante.

La cuantificación y pureza se determinó espectrofotométricamente por absorbencia a 230, 260, 280 y 320 nm. Esto se realizó en una celda de cuarzo utilizando como blanco agua miliQ y para las determinaciones una dilución 1:100 del DNA genómico de *R. rubrum*. Se obtuvieron 23.2 µg de DNA genómico a partir de los 10 mg de células.

Amplificación de Rru_A0714 mediante PCR

La mezcla de reacción de PCR se preparó con los siguientes componentes: cebadores *forward* y *reverse* diluidos a una concentración de trabajo de 10 pmol/µL, *Pfu*-DNA polimerasa de BioBasic® (que tiene una concentración de 5U/µL y que se recomienda usar 1.25 U/50 µL de volumen de reacción) junto con su buffer 10x (200 mM Tris-HCl, pH 8.8, 100 mM de KCl, 100 mM de (NH₄)₂SO₄, Tritón X-100 1% y 1 mg/mL de BSA), dNTPs a una concentración final de 0.2 mM y 1 ng de DNA genómico de *R. rubrum* como molde. Todos los componentes se mantuvieron en hielo durante la preparación de la mezcla.

La amplificación se realizó utilizando un programa de termociclado bajo un esquema de gradiente de temperaturas, las cuales variaron de 58 °C a 70 °C con diferencias de 4 °C entre cada una, con el fin de determinar la mejor condición de amplificación para el gen Rru_A0714:

Programa de termociclado

Desnaturalización inicial ----- 95 °C/5 min/x1
Desnaturalización ----- 95 °C/30 seg/x35
Alineamiento ----- Δ °C/30 seg/x35

Elongación ----- 72 °C/30 seg/x35
Elongación final ----- 72 °C/10 min/x1

La temperatura de alineamiento en la que se observó un producto de PCR más enriquecido fue 58 °C, por lo que es la que se utilizó para experimentos posteriores.

Visualización del amplicón Rru_A0714 en gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 5x, pH 8.2 (Tris 53.9 g/L, ácido bórico 27.51 g/L, EDTA 20 mL/L a 0.5 M, pH 8). Se cargaron 2 µL de marcador de peso molecular (mpm), 10 µL de cada reacción de PCR + 2 µL de amortiguador de carga 6x y un control negativo de PCR al que no se le añadió DNA polimerasa. Se corrió a 4 °C en una cámara de electroforesis a 90 V (voltaje constante) durante 1h 10 min, usando TBE como amortiguador de corrida. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó exponiéndolo a luz UV.

Purificación y secuenciación de Rru_A0714

Se añadieron 6 µL de amortiguador de carga 6x a 16.7 µg (30 µL) del amplicón obtenido a una temperatura de alineamiento de 58 °C y la mezcla se cargó en un gel de agarosa al 1%, el cual se corrió, tiñó y visualizó tal como se describió anteriormente. Se escindió la banda y se purificó mediante el kit QIAquick® de QIAGEN, siguiendo el protocolo del fabricante.

La pureza y concentración del DNA purificado se determinó midiendo la absorbencia a 230, 260, 280 y 320 nm. Además, se hizo una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, utilizando 10 µL de PCR purificado + 2 µL de amortiguador de carga 6x, el cual se corrió a 90 V durante 1h 20 min y se tiñó y visualizó tal como se ha descrito anteriormente.

El amplicón fue secuenciado en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, utilizando los cebadores específicos para el gen Rru_A0714.

Clonación de Rru_A0714 en pJET1.2 blunt y transformación de *E. coli* DH5α

El gen Rru_A0714 previamente purificado fue clonado en el plásmido pJET1.2 blunt, para su posterior subclonación en los vectores de expresión pT7-7 y pET3a. Las construcciones fueron utilizadas para transformar células competentes de *E. coli* DH5α.

Para ligar Rru_A0714 al pJET1.2 blunt se utilizó una relación inserto-vector 14:1, posteriormente la transformación con la construcción pJET1.2/Rru_A0714 se realizó mediante choque térmico en células competentes de *E. coli* DH5α previamente tratadas con CaCl₂ y almacenadas a -70 °C.

Extracción de DNA plasmídico (pJET1.2/Rru_A0714) a partir de células transformantes

Se seleccionaron colonias transformantes de *E. coli* DH5α pJET1.2/Rru_A0714 y cada una fue crecida en 2 mL de LB/ampicilina (100 µg/mL) durante toda la noche, a 37 °C

y 180 rpm. Estos cultivos se utilizaron para extraer DNA plasmídico por el método de lisis alcalina (Green y Sambrook, 2016).

Digestión, visualización de las construcciones pJET1.2/Rru_A0714 y secuenciación

Los plásmidos purificados a partir de las colonias transformantes *E. coli* DH5 α pJET1.2/Rru_A0714 fueron digeridos con BglII; las mezclas de digestión se prepararon en microtubos de plástico. Las mezclas fueron incubadas a 37 °C durante 1 h y después toda la noche a temperatura ambiente. La enzima fue inactivada a 65 °C durante 15 min. Para visualizar la restricción, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 %, el cual se tiñó con bromuro de etidio, como fue descrito anteriormente. Se cargaron los 20 μ L de cada una de las digestiones (mezcladas con 4 μ L de amortiguador de carga 6x) y el marcador de peso molecular.

Uno de los candidatos de la construcción pJET1.2/Rru_A0714 fue seleccionado y enviado a secuenciar para confirmar la identidad del inserto y descartar cualquier alteración de la secuencia nucleotídica con respecto a la reportada. La secuenciación se realizó en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, utilizando los cebadores específicos para el promotor T7, el cual está presente en el vector de clonación.

Subclonación de Rru_A0714 en pT7-7 y pET3a y transformación de *E. coli* DH5 α

Una vez verificada la secuencia del inserto Rru_A0714 en el plásmido pJET1.2, la construcción se digirió con NdeI y BamHI y el inserto se purificó utilizando los protocolos antes mencionados. El gen Rru_A0714 purificado fue subclonado en el vector de expresión pT7-7, sin embargo, para la ligación primero fue necesario digerir (con NdeI y BamHI) el plásmido pT7-7 y purificarlo utilizando los protocolos antes mencionados.

La ligación del fragmento correspondiente al gen Rru_A0714 en el vector de expresión pT7-7 se repitió en más de 10 ocasiones, ya que la mayoría de las construcciones putativas pT7-7/Rru_A0714 obtenidas mostraron fragmentos de restricción incongruentes con la secuencia del gen y del plásmido, mientras que en las pocas construcciones que sí mostraron un mapa de restricción congruente, la secuenciación reveló que el gen clonado correspondía a la subunidad ζ de *P. denitrificans* o de *Sinorhizobium meliloti* (datos no mostrados), probablemente por alguna contaminación durante el proceso de clonación o de transformación (para más detalles ver “Dificultades asociadas a la subclonación del gen Rru_A0714 en un vector de expresión” de la sección de “Discusión”)

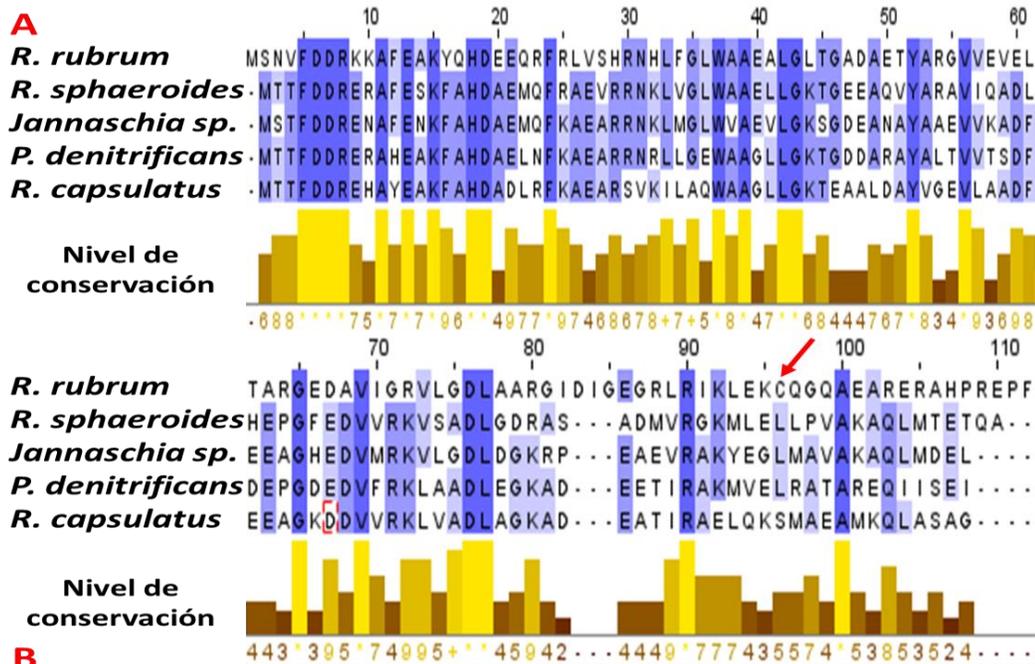
Los resultados negativos de la clonación de Rru_A0714 en el plásmido pT7-7 motivaron a cambiar de vector de expresión, por lo que ahora se intentó clonar en el plásmido pET3a, obteniendo mapas de restricción inesperados y construcciones poco concluyentes, tal como sucedió en el pT7-7 (datos no mostrados). Finalmente, se optó por comprar la construcción pET3a/Rru_A0714, la cual se pidió a la compañía biotecnológica GenScript®, desafortunadamente, aún no se tiene fecha de entrega, por lo que los experimentos de

sobreexpresión y ensayos de inhibición utilizando la proteína Rr ζ no podrán ser tratados en el presente trabajo y los experimentos concluyentes con respecto a la subunidad Rr ζ estarán limitados a la obtención de la construcción pJET1.2/Rru_A0714.

Resultados

Análisis estructural comparativo de la proteína ζ

El alineamiento entre las 5 α -proteobacterias estudiadas (*R. sphaeroides*, *R. rubrum*, *R. capsulatus*, *P. denitrificans* y *Jannaschia* sp.) múltiple mostró que la proteína Rr ζ es la subunidad más larga de todas las proteínas comparadas, con 112 aminoácidos, además, es la única cuya secuencia contiene un residuo de Cys en su composición. Esta Cys se ubica en la posición 96 de la región C-terminal (**Fig. 17 A**). El máximo porcentaje de identidad se observó entre las subunidades Rs ζ y Js ζ (62 %), mientras que los niveles de identidad más bajos (entre 30 % y 40 %) ocurrieron en las comparaciones de la subunidad Rr ζ con las demás proteínas ζ , entre Rs ζ y Pd ζ se obtuvo un 58 % de identidad (**Fig. 17 A y B**), lo cual se ve reflejado en el árbol filogenético construido por el método de unión de vecinos (**Fig. 17 C**). La región N-terminal de todas las proteínas ζ analizadas es la más conservada y la comparación de sólo los primeros 20 residuos generó un incremento en los porcentajes de identidad, que llegaron hasta el 90 %, en el caso de las proteínas Rs ζ y Pd ζ (**Fig. 18 B y D**). Predeciblemente, los niveles de similitud entre las secuencias superaron a los niveles de identidad. En este sentido la proteína Rs ζ tiene una similitud del 54 % con la proteína Pd ζ , entre Rs ζ y Pd ζ hay una similitud del 77 % y entre Rs ζ y Rc ζ la similitud es del 65 %. Finalmente, hay un total de 22 residuos conservados en las 5 secuencias analizadas: F5, D6, D7, R8, A11, E13, K15, H18, D19, F24, W37, A39, L42, G43, Y52, V56, G65, V69, D76, L77, R90 y A100, de los cuales, el 41 % (9 residuos) se encuentran entre los primeros 20 residuos de la región N-terminal.



B

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------------------------|-----|------|-----|-----|-----|
| <i>R. rubrum</i> (1) | 100 | 40 | 38 | 35 | 30 |
| <i>R. sphaeroides</i> (2) | 40 | 100 | 62 | 58 | 46 |
| <i>Jannaschia sp.</i> (3) | 38 | 62.5 | 100 | 59 | 53 |
| <i>P. denitrificans</i> (4) | 35 | 58 | 59 | 100 | 60 |
| <i>R. capsulatus</i> (5) | 30 | 46 | 53 | 60 | 100 |

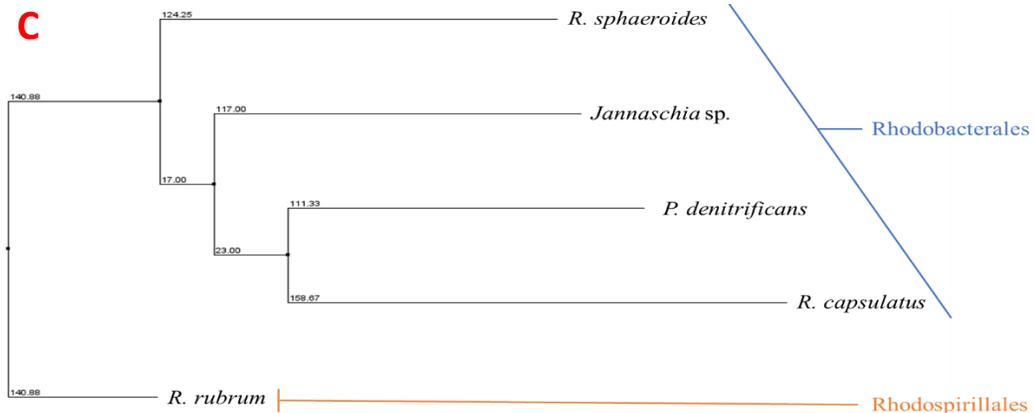
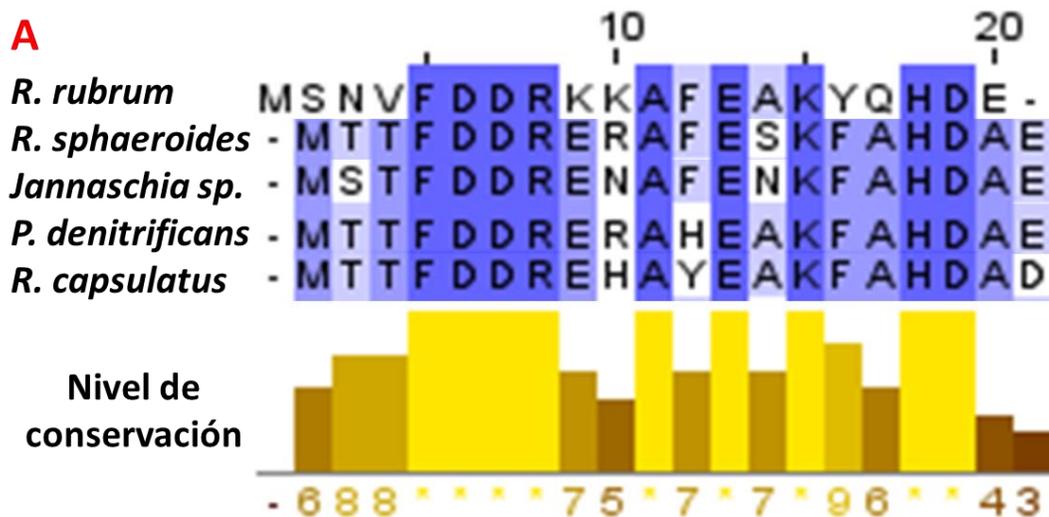


Figura 17. En el panel A se muestra el alineamiento múltiple de la subunidad ζ de 5 α -proteobacterias: *R. rubrum* (1), *R. sphaeroides* (2), *Jannaschia sp.* (3), *P. denitrificans* (4) y *R. capsulatus* (5), la flecha roja señala la C96 de la subunidad $Rr\zeta$, la única secuencia con Cys en su composición. Los residuos más conservados se muestran en color azul oscuro o amarillo claro, los menos conservados en tonos decrecientes de azul o crecientes de amarillo a café y los nada conservados en blanco o café oscuro. Alineamientos visualizados con Jalview. B, matriz de los valores de identidad del alineamiento. Los rectángulos rojos señalan los porcentajes de identidad entre $Pd\zeta$ y $Rr\zeta$ y entre $Pd\zeta$ y $Rs\zeta$, C, árbol filogenético de las subunidades ζ analizadas, construido por el método de unión de vecinos. Se observa una clara agrupación de acuerdo al orden al que pertenece cada bacteria (Rhodobacterales y Rhodospirillales). Las dos ramas iniciales del árbol (de izquierda a derecha) fueron reducidas a una cuarta parte de su longitud original para un mejor ajuste adecuado de la figura en el texto.



B

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>R. rubrum</i> (1) | 100 | 53 | 53 | 53 | 53 |
| <i>R. sphaeroides</i> (2) | 53 | 100 | 85 | 90 | 80 |
| <i>Jannaschia sp.</i> (3) | 53 | 85 | 100 | 80 | 75 |
| <i>P. denitrificans</i> (4) | 53 | 90 | 80 | 100 | 85 |
| <i>R. capsulatus</i> (5) | 53 | 80 | 75 | 85 | 100 |

Figura 18. Alineamiento múltiple de los primeros 20 residuos N-terminal de las 5 secuencias subunidad ζ , correspondientes a las α -proteobacterias: *R. rubrum* (1), *R. sphaeroides* (2), *Jannaschia sp.* (3), *P. denitrificans* (4) y *R. capsulatus* (5). El código de colores es el mismo que la figura 1. B, matriz de los valores de identidad del alineamiento. Los rectángulos rojos señalan los porcentajes de identidad entre Pd ζ y Rr ζ y entre Pd ζ y Rs ζ ,

Las estructuras de las proteínas Rr ζ y Rs ζ generadas *in silico* utilizaron como molde la estructura de subunidad ζ de *P. denitrificans* obtenida por RMN (PDB: 2LL0; Serrano *et al.*, 2014). Ambos modelos tuvieron un *score* de confianza del 100%, lo que significa que las proteínas realmente son homólogas a Pd ζ y que es altamente probable que las proteínas Rr ζ y Rs ζ adopten la conformación tridimensional modelada. Las estructuras generadas presentan las 4 α -hélices descritas en *P. denitrificans*, sin embargo, Rr ζ cuenta con un giro α -helicoidal de 3 residuos (I82-D83-I84) entre las hélices α 3 y α 4, el cual está ausente en la subunidad ζ de *P. denitrificans*, además, la α -hélice 4 de Rr ζ y Rs ζ está interrumpida en la mitad por un residuo C96 y L92, respectivamente, de estructura desordenada. A este último respecto, los datos de predicción de estructura obtenidos con Phyre², señalan, con un alto nivel de confianza, que esta región de estructura desordenada corresponde, en realidad, a una α -hélice (Fig. 19). La superposición de Rr ζ y Rs ζ con uno de los confórmers de la subunidad ζ de

P. denitrificans muestra una RMSD de 0.956 Å y 0.916 Å, respectivamente, lo que refleja gran similitud estructural (Fig. 19).

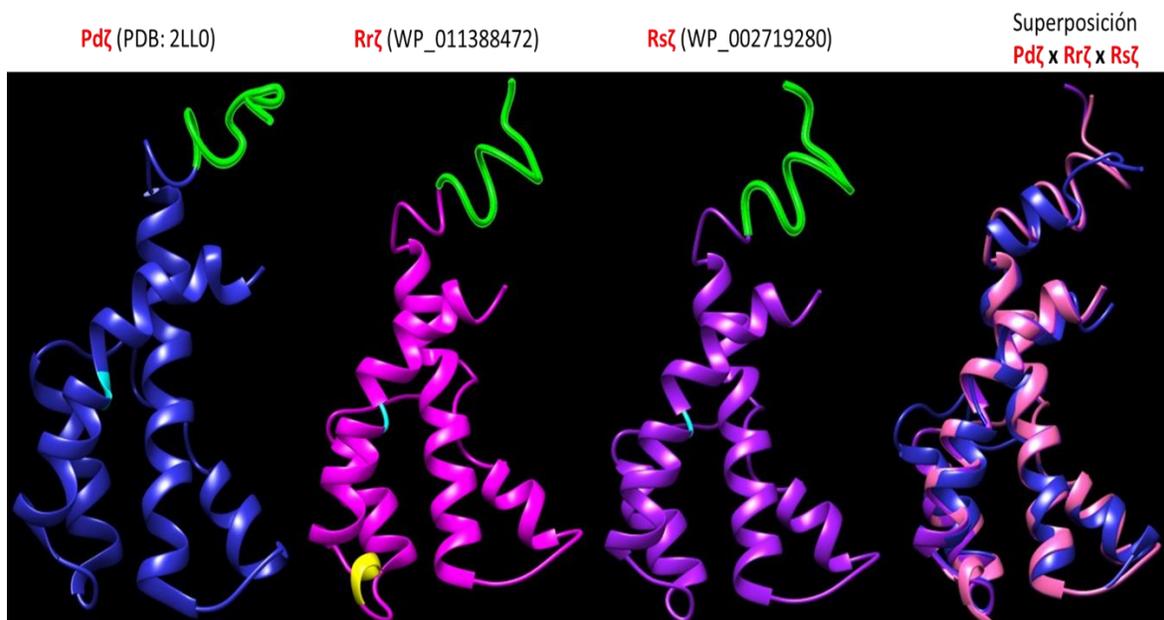


Figura 19. Estructura tridimensional de la proteína Pdζ (azul) de *P. denitrificans* obtenida por NMR (Serrano *et al.*, 2014) y modelos estructurales de Rrζ (rosa) y Rsζ (morado) generados *in silico* con Phyre2, solos o sobrepuestos con Pdζ. En verde se señalan los primeros 14 residuos de la región inhibitoria N-terminal, en cian se señalan los residuos RrζC96 y RsζL95, los cuales carecen de estructura definida y cortan a la mitad la hélice 4 de Rrζ y Rsζ, respectivamente. PdζL95 también se marca en cian, sin embargo, en este caso adopta una conformación de α -hélice. En amarillo se señala el giro α -helicoidal I82-D83-I84 extra de Rrζ, el cual se encuentra entre las hélices 3 y 4 y está ausente en Pdζ y Rsζ. La superposición de las subunidades Pdζ, Rrζ y Rsζ mantiene el mismo código de colores que el de las subunidades individuales. Figura realizada con UCSF Chimera.

Transformación de *E. coli* DH5 α con la construcción pET3a/RSP_2125, digestión y visualización en gel de agarosa

Se transformó la cepa de *E. coli* DH5 α con el plásmido pET3a/RSP_2125 y se seleccionaron colonias para la preparación de gliceroles y extracción de DNA plasmídico. Este DNA fue digerido con BamHI y NdeI. El mapa de restricción de los plásmidos mostró los fragmentos correspondientes al gen RSP_2125 (330 bp) y al pET3a vacío (4640 bp). El plásmido proveniente de una de las colonias fue utilizado para transformar a *E. coli* BL21(DE3)-pLysS (Fig. 20).

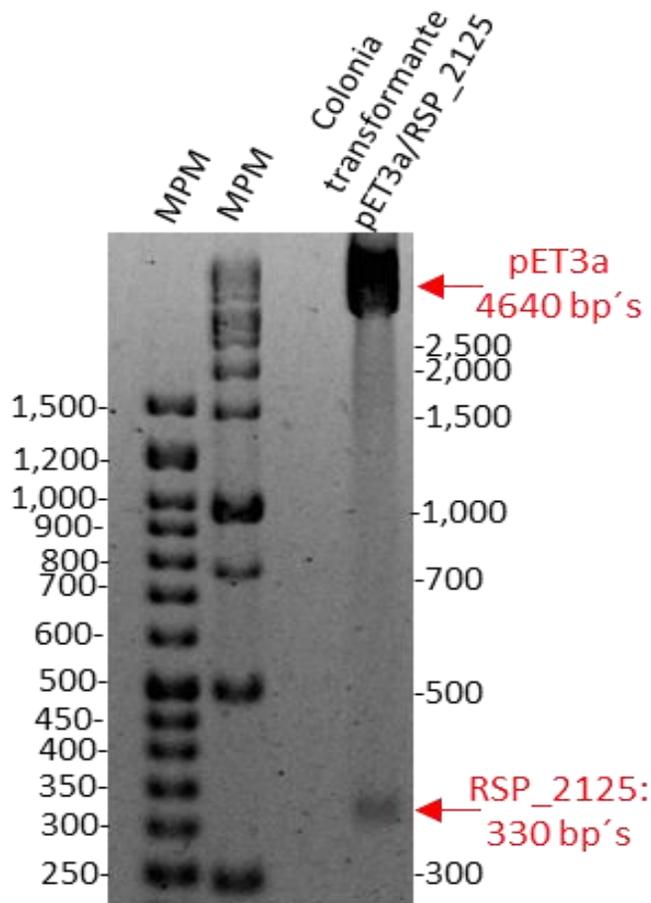


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa (1.5 %) de la digestión con BamHI y NdeI de las construcciones pET3a/RSP_2125 transformado en *E. coli* DH5 α . Se observan fragmentos de ~ 4640 bp, los cuales corresponden al vector de expresión lineal y fragmentos de 330 bp, los cuales corresponden al gen RSP_2125.

Transformación de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS con la construcción pET3a/RSP_2125, digestión y visualización en gel de agarosa

Se utilizó el plásmido pET3a/RSP_2125 obtenido de una colonia transformante de *E. coli* DH5 α pET3a/RSP_2125 para transformar células competentes de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS.

Se seleccionaron colonias transformantes de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS con pET3a/RSP_2125 para preparar gliceroles, extraer DNA plasmídico y digerir con NdeI y HindII. Los plásmidos provenientes de las colonias presentaron un mapa de restricción acorde a lo esperado (Fig. 21). La secuenciación del plásmido proveniente de una de las colonias transformantes confirmó que este corresponde al gen RSP_2125 clonado en el vector pET3a. Esta colonia fue seleccionada para experimentos subsecuentes de inducción y purificación de la proteína Rs ζ .

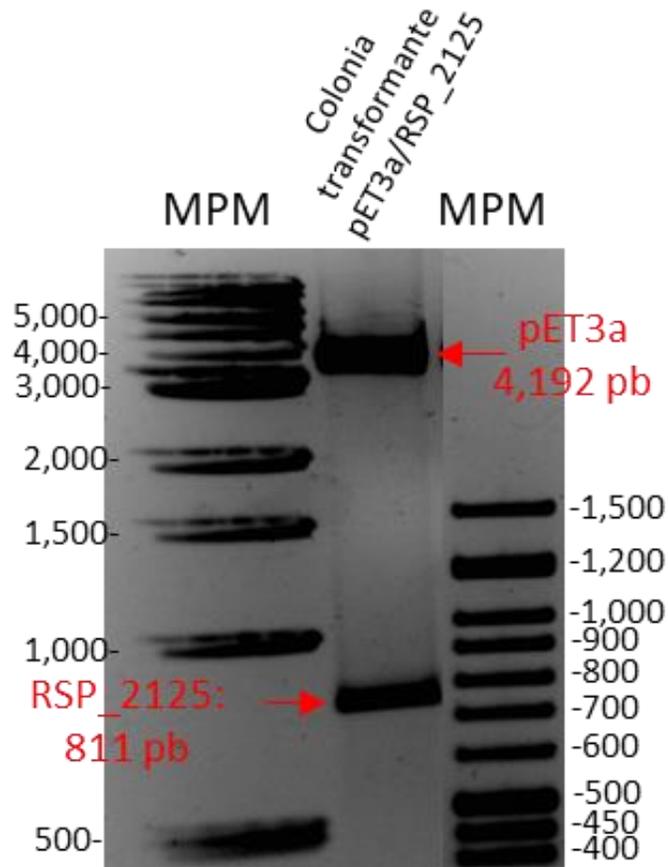


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa (1.5 %) de las construcciones pET3a/RSP_2125 digeridas con HindIII y NdeI. Se observa una banda en ~811 bp, la cual corresponde al gen RSP_2125 más 448 bp del MCS.

Pruebas de inducción con IPTG

Para conocer la concentración de IPTG óptima de inducción para la expresión de la proteína Rs ζ , se hicieron ensayos utilizando diferentes concentraciones de IPTG (0.1, 0.2, 0.3, 0.5 y 0.75 mM). En la Fig. 18 se muestra como hay una proteína del peso molecular de Rs ζ y que responde a la adición de IPTG. Por densitometría se determinó que 0.3 mM es la concentración óptima para sobreexpresar a la proteína Rs ζ , pues logra un incremento 2 veces mayor con respecto al cultivo incubado en ausencia de IPTG (Fig. 22 y tabla 2).

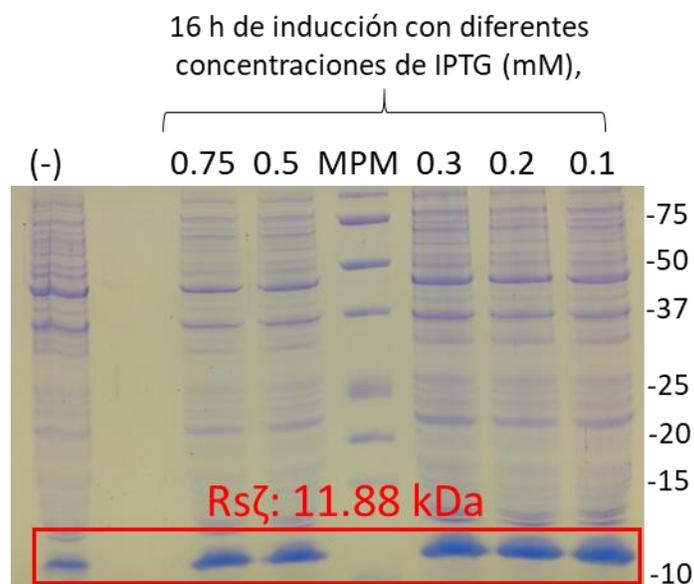


Figura 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida (15 %) teñido con azul de Coomassie de extractos de células completas inducidas con diferentes concentraciones de IPTG. Mediante densitometría se determinó que 0.3 mM de IPTG da lugar a una inducción 2 veces mayor con respecto al estado basal sin inducir (carril 1). En cada carril se cargó 1 mg de células completas (resuspendidas en 10 μ L de agua destilada y desionizada (MiliQ)).

Tabla 2. Niveles de sobreexpresión de la proteína Rsζ tras inducir toda la noche (16 h) con diferentes concentraciones de IPTG.

| Concentración de IPTG (mM) | Nivel de inducción con respecto al control sin inducir (número de veces) |
|----------------------------|--|
| 0.1 | 1.66 |
| 0.2 | 1.62 |
| 0.3 | 2.00 |
| 0.5 | 1.80 |
| 0.75 | 2.22 |

Purificación de la proteína Rsζ

La purificación de la proteína *Rsζ* por precipitación salina con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico en una columna DEAE, separación por membranas Amicon y cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 75, condujo a la obtención de 350 μ g de proteína pura a partir de 4 L de cultivo. Sin embargo, esta cantidad corresponde sólo a la proteína de la fracción más pura del último paso de purificación, la cromatografía de exclusión molecular. Desafortunadamente, al tratar de purificar aún más las fracciones no tan puras del último paso, la muestra se perdió en el equipo de FPLC, por lo que los rendimientos pudieron haber sido mayores.

En las figuras 23, 24, 25 y 26 se muestran los geles Schagger-Von Jagow de poliacrilamida (teñidos con azul de Coomassie) correspondientes a la inducción de la expresión de *Rsζ* con IPTG, la precipitación con sulfato de amonio, la separación por cromatografía de intercambio iónico y la separación y concentración por membranas Amicon, respectivamente, mientras que en las figuras 27 y 28 se muestran los geles

Schägger-Von Jagow correspondientes a la separación por cromatografía de exclusión molecular. Todos los gels corresponden a una sola purificación. Cabe mencionar que la proteína Rs ζ tiene un punto isoeléctrico (PI) teórico de 4.95 (calculado en ExPasy; Gasteiger *et al.*, 2005) y su elusión en la cromatografía de intercambio aniónico (resina DEAE), se esperaba en las fracciones con una concentración de fosfato de potasio de 300 mM y 350 mM, como se ha observado para la proteína Pd ζ (Mendoza-Hoffmann *et al.*, 2018; Zarco-Zavala *et al.*, 2014). Sin embargo, inesperadamente, la proteína Rs ζ eluyó en los lavados con amortiguador B (fosfato de potasio 20 mM, pH 7).

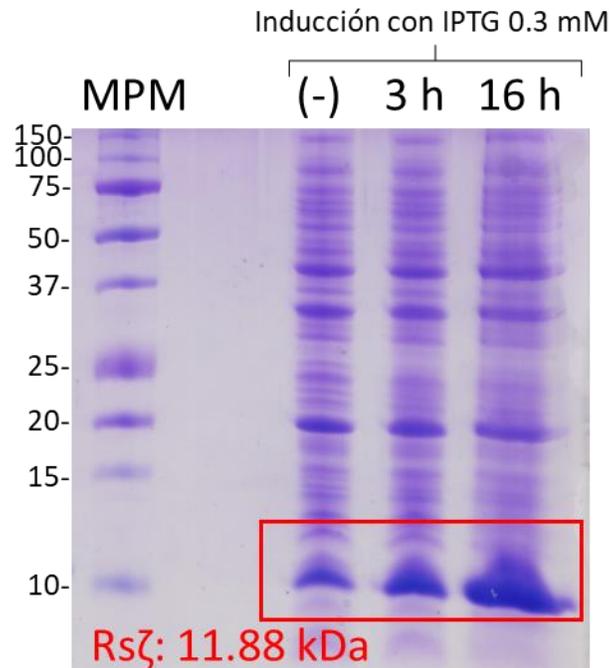


Figura 23. Gel de poliacrilamida (15 %), teñido con azul de Coomassie. En cada carril se cargó 1 mg de células completas (resuspendidas en 10 μ L de agua destilada y desionizada). Las células se obtuvieron a partir de cultivos sin inducir (-), inducidos durante 3 h con IPTG 0.3 mM o inducidos durante 16 h con la misma concentración de IPTG. El rectángulo rojo enmarca la proteína ζ de *R. sphaeroides* (Rs ζ), la cual tiene una masa de 11.88 kDa.

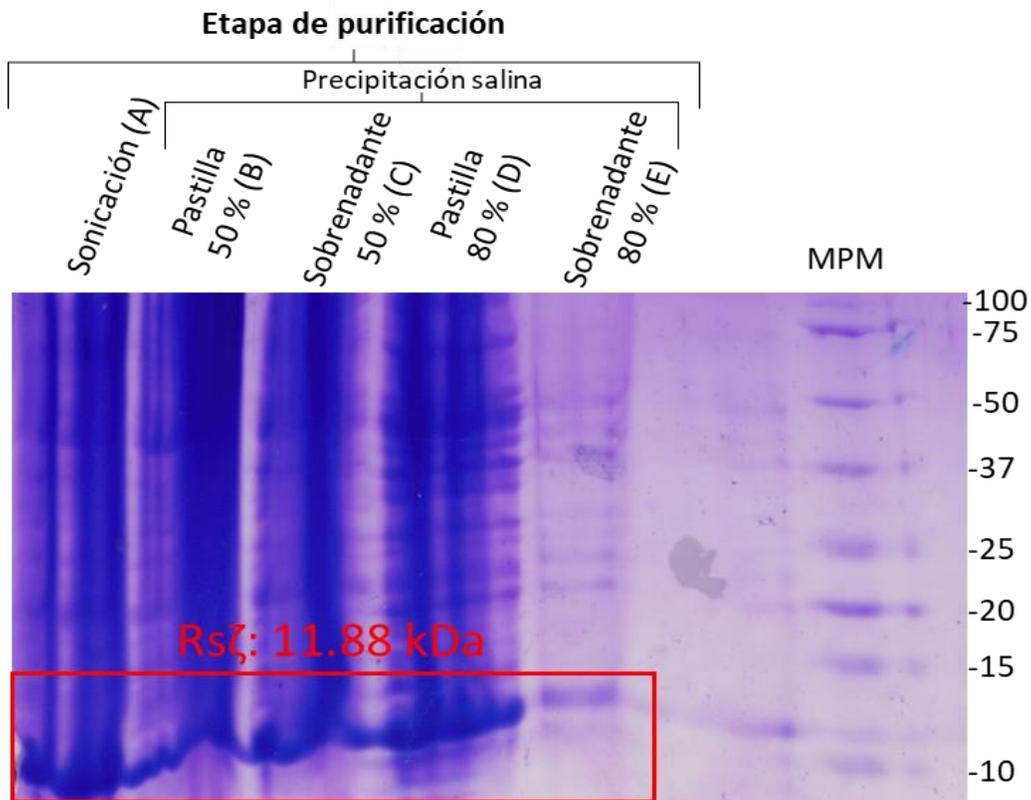


Figura 24. Gel de poliacrilamida (15 %), teñido con azul de Coomassie. A, extracto proteico obtenido por sonicación (*pre-salting out*); B, pastilla *post-salting out* al 50 % de saturación con sulfato de amonio; C, sobrenadante *post-salting out* al 50 % de saturación con sulfato de amonio; D, pastilla *post-salting out* al 80 % de saturación con sulfato de amonio; E, sobrenadante *post-salting out* al 80 % de saturación con sulfato de amonio; MPM, marcador de peso molecular. El rectángulo rojo enmarca la proteína ζ de *R. sphaeroides* (Rsζ), la cual tiene un peso de 11.88 kDa.

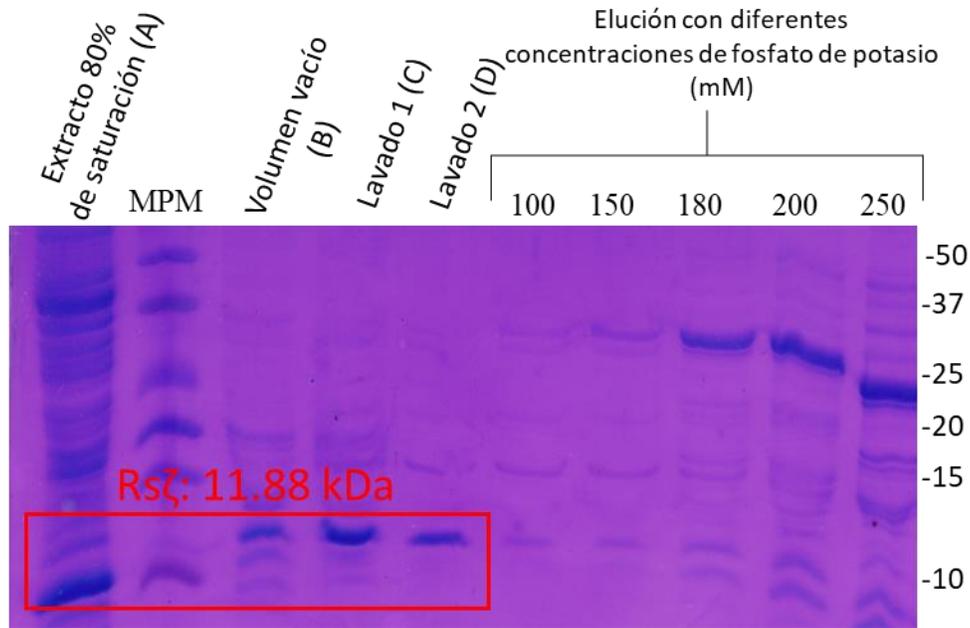


Figura 25. Gel de poliacrilamida (15 %), teñido con azul de Coomassie. A, extracto proteico obtenido a un 80 % de saturación de sulfato de amonio y dializado; MPM, marcador de peso molecular; B, volumen muerto (o vacío) de la columna DEAE; C, lavado 1 de la columna DEAE con fosfato de potasio 20 mM, tras la unión del extracto proteico a la misma; D lavado 2 de la columna DEAE con fosfato de potasio 20 mM, tras la unión del extracto proteico a la misma; los pozos restantes corresponden a fracciones de elución de la columna DEAE con diferentes concentraciones de fosfato de potasio (100, 150, 180, 200 y 250 mM). El rectángulo rojo enmarca la proteína ζ de *R. sphaeroides* ($Rs\zeta$), la cual tiene una masa molecular de 11.88 kDa. Nótese que la mayor parte de la proteína $Rs\zeta$ salió en los lavados y no en las fracciones de elución.

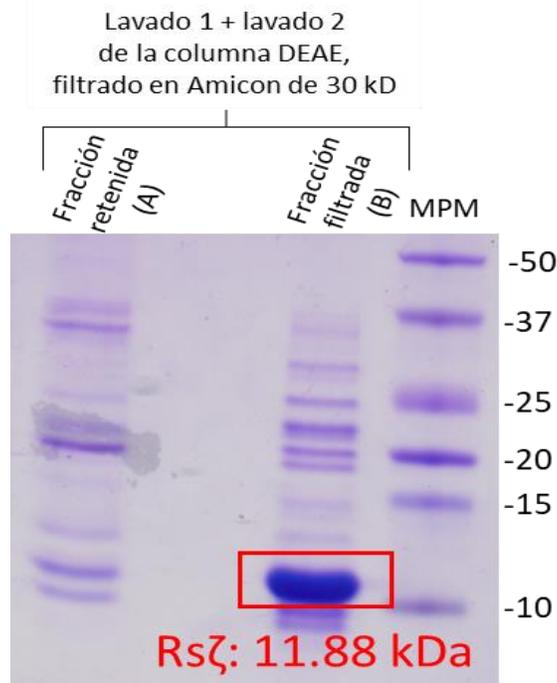


Figura 26. Gel de poliacrilamida (15 %), teñido con azul de Coomassie. A, extracto proteico obtenido tras juntar el lavado 1 y 2 de la columna DEAE en un Amicon con filtro de 30 kDa, en este carril se cargó la fracción retenida (proteínas arriba de 30 kDa); B, fracción filtrada (proteínas debajo de 30 kDa) del extracto proteico

obtenido en los lavados 1 y 2, esta fracción, además, se concentró en un Amicon con filtro de 10 kDa; MPM, marcador de peso molecular. El rectángulo rojo enmarca la proteína ζ de *R. sphaeroides* (Rs ζ), (masa de 11.88 kDa). Cabe destacar que en carril A se observa una banda con la masa de la subunidad Rs ζ . Sin embargo, la fracción de proteínas analizadas en este carril se descartó, debido a la baja proporción que representa la proteína Rs ζ con respecto a las demás proteínas del carril y con respecto a la proporción que representa comparándola con la proteína Rs ζ del carril B. El resto de proteínas del carril A corresponden a proteínas citosólicas de *E. coli*, incluyendo la banda de 10k Da.

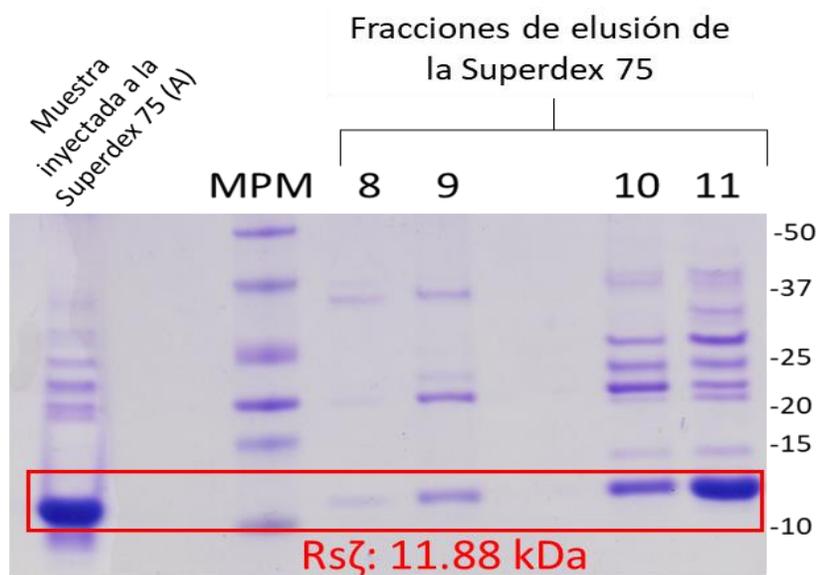


Figura 27. Gel de poliacrilamida (15 %), teñido con azul de Coomassie. A, extracto proteico obtenido tras juntar y concentrar el lavado 1 y 2 de la columna DEAE en Amicones con filtros de 30 kDa y 10 kDa (esta preparación se inyectó en la columna Superdex 75); MPM, marcador de peso molecular; 8-11, fracciones de la columna Superdex 75. El rectángulo rojo enmarca la proteína ζ de *R. sphaeroides* (Rs ζ), la cual tiene una masa de 11.88 kDa.

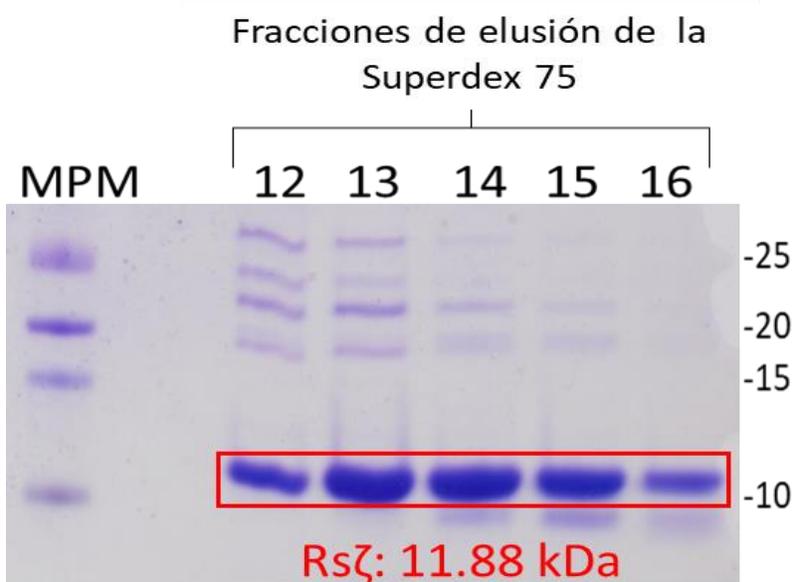


Figura 28. Gel Schagger & Von Jagow de poliacrilamida (15 %), teñido con azul de Coomassie. MPM, marcador de peso molecular; 12-16, fracciones de la columna Superdex 75. El rectángulo rojo enmarca la

proteína ζ de *R. sphaeroides* (Rs ζ). La fracción “14” se utilizó para realizar los experimentos de inhibición de la actividad de ATPasa.

La fracción 14 de la cromatografía de exclusión molecular (**Fig. 28**) se concentró por centrifugación en membranas Amicon, se añadió glicerol a una concentración final del 20 % y se almacenó a -70 °C hasta su uso. Se determinó por densitometría que la subunidad Rs ζ de esta fracción tiene una pureza del 85.5 %. Esta fracción se utilizó para los experimentos de determinación de proteína por Lowry y de inhibición sobre la actividad de ATPasa de *R. sphaeroides*.

Cuantificación de proteína por el método de Lowry

Se obtuvo una curva estándar con R^2 de 0.9965 y su ecuación permitió determinar que la concentración de proteína de la fracción 14 de la cromatografía de exclusión molecular fue de 1.75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, mientras que la de los cromatóforos de *R. sphaeroides* fue de 30.93 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se obtuvo un total de 350 μg de la proteína Rs ζ a partir de 4 L de cultivo.

Ensayos de actividad de ATPasa e inhibición por la proteína Rs ζ

La proteína Rs ζ sí inhibe la actividad de la F_1F_0 -ATPasa en cromatóforos de *R. sphaeroides*, la estimación lineal de inhibición determinó que 17.09 μg de Rs ζ (1.92 μM) reducen en un 61.83 % la actividad hidrolítica de ATPasa, de 11.44 ± 1.32 nmoles de ATP consumido/min/mg de proteína a 4.36 ± 0.78 nmoles de ATP/min/mg de proteína (**Fig. 29**).

Los ensayos de inhibición con diferentes concentraciones de Rs ζ mostraron una curva *cuasi*-hiperbólica (**Fig. 30**) similar a las de las subunidades ζ de *P. denitrificans* y *Jannaschia* sp. (Zarco-Zavala *et al.*, 2014). Sin embargo, es necesario repetir los ensayos para obtener datos estadísticamente confiables que permitan la determinación de la IC_{50} , ya que la gráfica obtenida representa un duplicado de cada medición (excepto el último punto, cuya determinación es única debido a la dificultad que representa su medición).

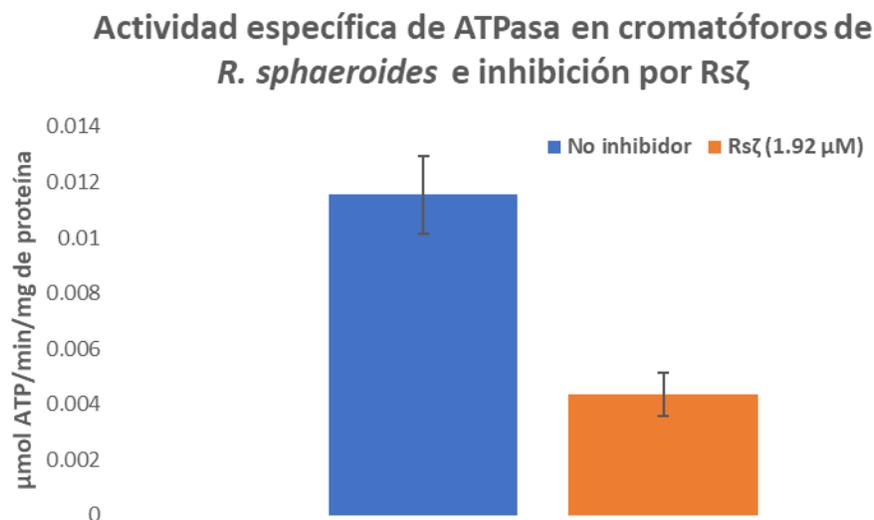


Figura 29. Ensayos de actividad de ATPasa en cromatóforos (150 μg de proteína) de *R. sphaeroides*. Se aprecia el efecto inhibitorio sobre la actividad de ATPasa tras añadir 17.09 μg de la subunidad Rs ζ (1.92 μM ; naranja),

con respecto al control sin añadir inhibidor, solo el volumen del amortiguador en el que se encuentra la proteína (azul).

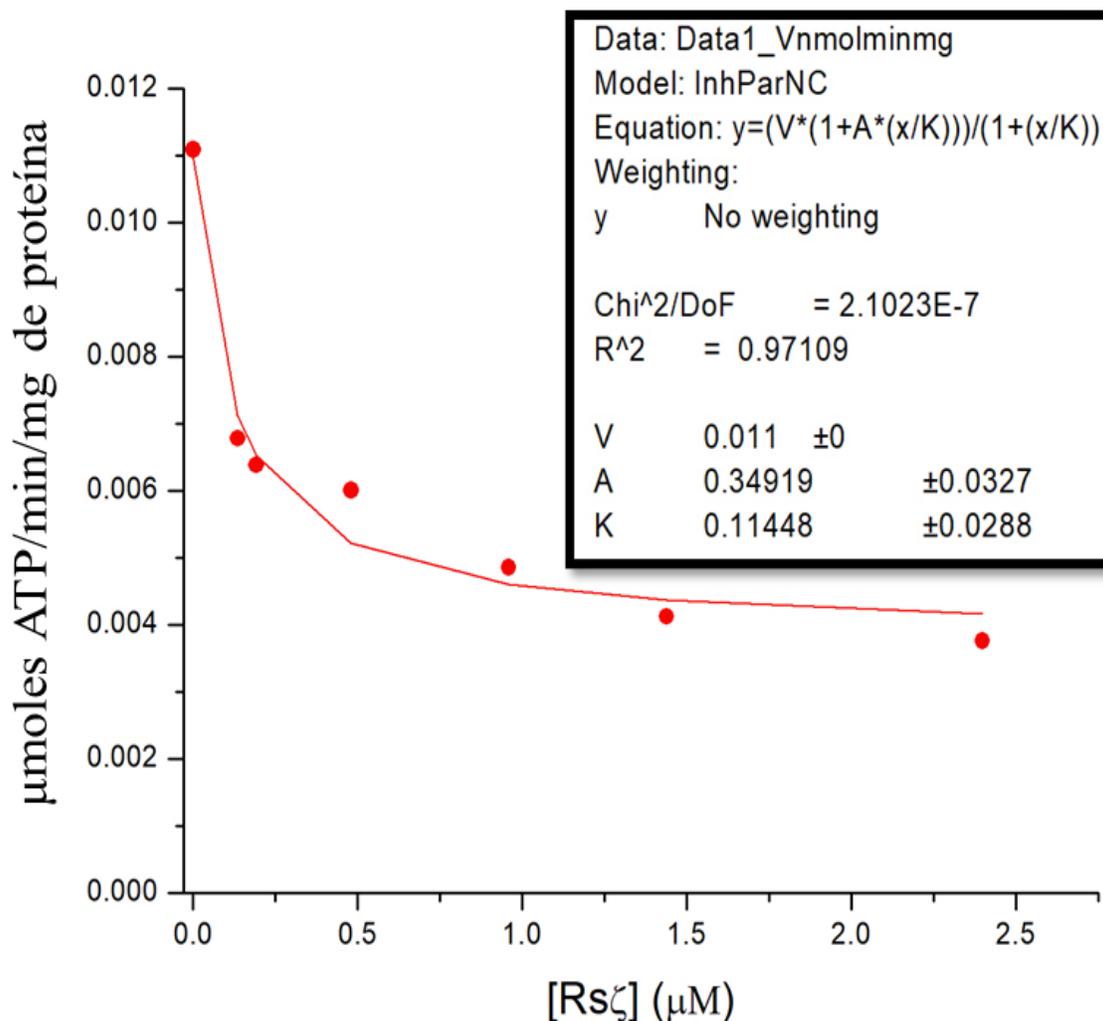


Figura 30. Curva de inhibición de la $R_sF_1F_0$ -ATPasa de cromatóforos de *R. sphaeroides*, utilizando diferentes concentraciones de la proteína $R_s\zeta$. Se muestra la curva de un experimento por duplicado. El ajuste se hizo a un modelo no lineal de inhibición parcial no competitiva, cuya ecuación se muestra en la tabla insertada dentro de la gráfica (Zarco-Zavala *et al.*, 2014). V, velocidad inicial sin inhibidor; K, IC_{50} aparente (0.114 μ M o 114 nM); A, factor de inhibición parcial, el cual refleja el porcentaje de inhibición remanente cuando $[R_s\zeta]$ tiende a infinito (35%).

Amplificación y purificación del gen Rru_A0714 Rrζ

A partir de DNA genómico de *R. rubrum* se amplificó por PCR el gen Rru_A0714 utilizando cebadores específicos. La electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos muestra una sola banda para las 5 temperaturas de alineamiento ensayadas (Fig. 31 A), lo cual refleja la alta especificidad de los cebadores. Esta banda migra de acuerdo con lo esperado para el amplicón del gen Rru_A0714 (363 bp). La banda más enriquecida se obtuvo con una temperatura de 58°C, por lo que se utilizó esta temperatura de alineamiento para realizar las reacciones subsiguientes y purificar el producto (Fig. 31 B).



Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos por PCR a partir de DNA genómico de *R. rubrum*, utilizando cebadores específicos para el gen Rru_A0714. A, se probaron diferentes temperaturas de alineamiento (T_a) entre 58 °C y 70 °C. La banda obtenida con una T_a de 58 °C fue la más enriquecida. En todas las T_a ensayadas se observa una sola banda. B, Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR obtenido a una T_a de 58 °C y purificado mediante el kit QIAquick® de QIAGEN.

Clonación de Rru_A0714 en pJET1.2 y transformación de *E. coli* DH5α

El producto de PCR se clonó en el plásmido pJET1.2, se seleccionaron colonias transformantes y se sembraron en medio líquido LB/ampicilina. El corte con BglIII de los plásmidos dio como resultado el mapa de restricción esperado con fragmentos de aproximadamente 409 bp (inserto) y 2928 bp (vector) (Fig. 32). La secuenciación de la construcción obtenida a partir de una de las colonias permitió confirmar que se trata del gen que codifica para la proteína Rrζ (Rru_A0714), clonado en el vector pJET1.2. Los experimentos de sobreexpresión y ensayos de inhibición utilizando la proteína Rrζ no podrán ser tratados en el presente trabajo y los experimentos concluyentes con respecto a la subunidad Rrζ estarán limitados a la obtención de la construcción pJET1.2/Rru_A0714. Esto debido a los inconvenientes para la subclonación de Rru_A0714 en un vector de expresión (más detalles en “Dificultades asociadas a la subclonación del gen Rru_A0714 en un vector de expresión” de la sección de “Discusión”). Sin embargo, información valiosa sobre esta proteína hipotética ha sido obtenida a través de análisis estructurales comparativos y modelado *in silico* (ver: “Análisis estructural comparativo de la proteína “ de la sección de

“Resultados” y “Comparación estructural de las diferentes subunidades ζ e hipótesis evolutiva” de la sección de “Discusión”).

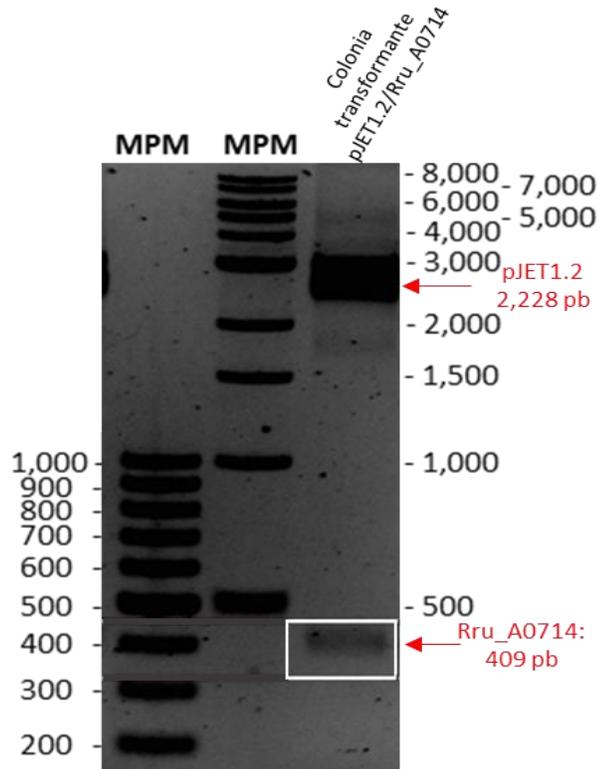


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa (1.5 %) de los plásmidos pJET1.2/Rru_A0714 digeridos con BglII. Se observan las bandas esperadas de aproximadamente 409 bp y de 2928 bp, las cuales corresponden al inserto Rru_A0714 y al plásmido, respectivamente. El corte con BglII le añade 46 bp y se las resta al pJET1.2.

Discusión

Inhibición de la ATPasa por la subunidad Rs ζ

Los ensayos de inhibición con la proteína Rs ζ sobre la actividad hidrolítica de la F₁F₀-ATPasa en cromatóforos de *R. sphaeroides* revelaron, por primera vez, que la subunidad ζ actúa como inhibidor en las α -proteobacterias fotosintéticas, lo cual se sospechaba gracias a análisis comparativos a nivel de estructura primaria de la subunidad ζ de α -proteobacterias (Zarco-Zavala *et al.*, 2014), a los modelos estructurales realizados en el presente trabajo y a los experimentos de inhibición la actividad de ATPasa por las proteínas Pd ζ y Js ζ (Zarco-Zavala *et al.*, 2014). La adición de 17.09 μ g (1.92 μ M) de la subunidad inhibitoria Rs ζ a 150 μ g de cromatóforos (proteína) generaron una disminución del 61.83 % en la actividad hidrolítica de la ATPasa. Se ha determinado que un modelo de inhibición no competitiva parcial es el que mejor se ajusta a la inhibición de la proteína ζ sobre la actividad de ATPasa, donde la IC₅₀ representa la concentración de inhibidor que reduce la tasa catalítica inicial sin inhibidor (V₀) en un 50 % (Zarco-Zavala *et al.*, 2014), por lo que se hicieron ensayos de inhibición utilizando diferentes concentraciones de la proteína Rs ζ . En resumen, se observa un patrón general de inhibición similar al reportado para las subunidades Pd ζ y Js ζ (Zarco-Zavala *et al.*, 2014), con las que se encontró una IC₅₀ aparente de 0.2 μ M, mientras que para Rs ζ la IC₅₀ aparente es de \sim 0.114 μ M (Fig. 29 C), este valor es similar a la Pd ζ , con la diferencia que en Pd ζ la inhibición es total y en RsF₁F₀ la inhibición es parcial, probablemente debido a alguna otra actividad residual inespecífica de ATPasa en el caso de Rs ζ . La gran similitud estructural entre Rs ζ y Pd ζ , permite sugerir que es posible que las constantes de inhibición de la proteína Rs ζ sean similares a las reportadas para Pd ζ y Js ζ (Zarco-Zavala *et al.*, 2014). Sin embargo, esto debe ser confirmado tras la obtención de más datos cinéticos de titulación y reconstitución homóloga de la Rs ζ en la RsF₁F₀-ATPasa de cromatóforos.

La confirmación de la función inhibitoria de la proteína Rs ζ sobre la RsF₁F₀-ATPasa incrementa el número de proteínas ζ en las que se ha observado un efecto de inhibición homóloga sobre la ATPasa, sumándose a la Pd ζ (Morales-Ríos *et al.*, 2010; Zarco-Zavala *et al.*, 2014). Esto es importante porque, a pesar de que el marco abierto de lectura (ORF) de la proteína ζ está conservado en la clase de las α -proteobacterias, estudios de inhibición de la ATPasa utilizando la proteína ζ de bacterias Rhizobiales, han revelado la pérdida de la función inhibitoria (Mendoza-Hoffmann, tesis de Doctorado, 2018).

La relevancia fisiológica de la subunidad ζ ha sido descrita en *P. denitrificans*, donde se mostró que es una proteína esencial para evitar el consumo deletéreo de ATP, asociado a un crecimiento reducido y más lento en medio respiratorio. Además, se determinó que es un inhibidor unidireccional, con un efecto nulo sobre la síntesis de ATP, por lo tanto, favoreciendo el crecimiento oxidativo y mejorando la bioenergética celular (Mendoza-Hoffmann *et al.*, 2018). En el caso de la subunidad Rs ζ de *R. sphaeroides*, se puede esperar que la delección de la subunidad ζ también tenga un efecto deletéreo sobre el crecimiento, ya que es una bacteria cercanamente emparentada a *P. denitrificans* y, al igual que la subunidad Pd ζ , la subunidad Rs ζ tiene actividad inhibitoria sobre la hidrólisis de ATP por la ATPasa.

A diferencia de *P. denitrificans*, este efecto podría ser observado no sólo en condiciones respiratorias, sino también en condiciones fotoautotróficas y en presencia de una fuente de carbono no fermentable donde el aporte de energía proviene principalmente de la fotofosforilación dependiente de la ATP sintasa. En condiciones fotoheterótroficas, esto se debe a que la actividad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa es muy baja, hasta 5 veces menor que en condiciones aerobias (Beatty y Gest, 1981), lo que provoca que el aporte de energía a través de la oxidación de compuestos reducidos del carbono tenga un impacto menor (McEwan, 1994).

Además, también se espera que la subunidad Rs ζ tenga un efecto unidireccional sobre la ATPasa, similar al reportado en *P. denitrificans*, debido a la gran similitud estructural entre las proteínas Rs ζ y Pd ζ y al alto grado de parentesco entre ambas especies. De hecho, este efecto de unidireccionalidad podría esperarse en otras α -proteobacterias fotosintéticas, como *R. capsulatus* y *R. rubrum*, cuyas proteínas ζ conservan un alto grado de identidad de secuencia y similitud estructural, respectivamente, con el inhibidor Pd ζ , tal como ha sido revelado por las comparaciones del presente y anteriores trabajos (de la Rosa-Morales, 2005; Mendoza-Hoffmann, tesis de Doctorado, 2018; Zarco-Zavala *et al.*, 2014). Sin embargo, la unidireccionalidad debe comprobarse en futuros experimentos, por ejemplo, haciendo ensayos de actividad de RsF₁F_O-ATPasa en presencia de concentraciones saturantes del inhibidor Rs ζ .

La similitud estructural y de secuencia entre la región N-terminal inhibitoria de Pd ζ con la región inhibitoria de la subunidad IF₁ (hay una similitud de secuencia mayor al 50 % entre las regiones inhibitorias de ambas proteínas; de la Rosa-Morales, 2005), aunado a que las subunidades IF₁ y ϵ (al igual que la proteína ζ) se unen a la región $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$ en la ATPasa (Cingolani y Duncan, 2011; García-Trejo *et al.*, 2016; Gledhill *et al.*, 2007; Morales-Ríos *et al.*, 2015), sugieren que IF₁ y ϵ también actúan como inhibidores unidireccionales (Mendoza-Hoffmann *et al.*, 2018). Sin embargo, algunos estudios apoyan un efecto bidireccional de IF₁ (Gómez-Puyou *et al.*, 1979; Tuena *et al.*, 1983; García-Bermúdez *et al.*, 2015) y ϵ (Lino *et al.*, 2009; Masaïke *et al.*, 2006), mientras que otros sugieren unidireccionalidad, tanto de IF₁ (Pullman y Monroy, 1963; Schwerzmann y Pedersen 1986) como de la subunidad ϵ (Suzuki *et al.*, 2003; Tsunoda *et al.*, 2001), por lo que definir el papel de IF₁ y ϵ sobre la síntesis de ATP queda abierto a trabajo futuro (Mendoza-Hoffmann *et al.*, 2018).

Actividad hidrolítica de la ATPasa

La actividad hidrolítica específica de la ATPasa obtenida en esta tesis, para los cromatóforos de *R. sphaeroides*, es de 11.44 ± 1.32 nmoles de ATP hidrolizado/min/mg de proteína, utilizando ATP-Mg²⁺ como sustrato y LDAO al 0.15% como activador. Diferentes trabajos han determinado la actividad específica de la ATPasa de *R. sphaeroides*. Sin embargo, existen variaciones importantes en las condiciones y métodos de determinación. Müller y colaboradores (1982) obtuvieron un valor de actividad específica de 3 μ moles/min/mg de proteína en cromatóforos de *R. sphaeroides*, utilizando ATP-Ca²⁺ como sustrato, mientras que Kaiser y Oelze (1980) obtuvieron un valor ~ 50 nmol/min/mg de

proteína, utilizando ATP-Mg²⁺ como sustrato. Los ensayos de actividad del presente trabajo y de los trabajos de Müller *et al.* (1982) y Kaiser y Oelze (1980) se realizaron utilizando la misma cepa de *R. sphaeroides* (2.4.1) y a temperaturas similares; 37, 37 y 35°C, respectivamente, por lo que las diferencias en los valores de actividad específica de ATPasa pueden ser atribuidas a otros factores.

Se sabe que el Ca²⁺ activa unas 60 veces o más la actividad de ATPasa de las α -proteobacterias fotosintéticas como *R. rubrum* (Maldonado *et al.*, 1998), por lo que en el trabajo de Müller *et al.* (1982) se podría esperar una actividad específica de ATPasa de 50 nmol/min/mg de proteína utilizando ATP-Mg²⁺ como sustrato. Este valor esperado corresponde al valor experimental obtenido por Kaiser y Oelze (1980), donde sí se utilizó ATP-Mg²⁺ como sustrato. Esto implica que el valor de actividad específica de ATPasa obtenido en el presente trabajo es ~4.4 veces más bajo que los valores reportados por Müller *et al.* (1982) y Kaiser y Oelze (1980). Además, si se considera que en el presente trabajo se utilizó LDAO como activador, las diferencias son aún mayores. En cromatóforos de *R. rubrum* se ha reportado que la adición de LDAO incrementa la actividad de la ATPasa de 3 a 5 veces (Montero-Lomelí y Dreyfus, 1987), por lo que, en un escenario conservador, el valor de actividad específica de ATPasa en cromatóforos de *R. sphaeroides* obtenido en el presente trabajo sería de 3.81 nmoles de ATP hidrolizado/min/mg de proteína en ausencia de LDAO. Bajo esta consideración, el valor de actividad específica de ATPasa del presente trabajo estaría ~13 veces por debajo de los valores previamente reportados para los cromatóforos de esta bacteria (Kaiser y Oelze 1980; Müller *et al.* 1982). Es probable que la actividad específica del presente trabajo sea menor debido a que, tras su preparación, los cromatóforos de *R. sphaeroides* fueron almacenados por varios meses a -70°C hasta su uso, mientras que en los trabajos previos (Kaiser y Oelze 1980; Müller *et al.* 1982) se usaron cromatóforos recién preparados y que nunca fueron congelados. Se ha observado que la actividad de la ATPasa en cromatóforos de *R. rubrum* disminuye a medida que transcurren los días tras la preparación de los cromatóforos, por lo que es recomendable hacer los ensayos de actividad inmediatamente después de su obtención (Dra. Romero Álvarez, comunicación personal).

En PSB de *P. denitrificans*, una preparación membranal similar a las partículas submitocondriales (PSM), la actividad hidrolítica específica de ATPasa (determinada con un ensayo equivalente al utilizado en los cromatóforos de *R. sphaeroides* del presente trabajo) es de ~400 nmoles/min/mg de proteína (Mendoza-Hoffmann *et al.*, 2018). Este valor es casi 40 veces mayor a los niveles de actividad observados en *R. sphaeroides* durante el presente trabajo y ~8 veces mayor a los niveles de actividad previamente reportados para la ATPasa de *R. sphaeroides* (Kaiser y Oelze 1980; Müller *et al.* 1982). Sin embargo, estos datos cobran sentido si se toma en cuenta que existen solamente 2 ATPasas y 8 complejos III (cytbc₁) por cada cromatóforo en *R. sphaeroides*, según estimaciones derivadas de análisis proteómicos cuantitativos, microscopía electrónica y microscopía de fuerza atómica (Cartron *et al.* 2014), mientras que en SBPs de *P. denitrificans*, la ATPasa es una enzima fuertemente enriquecida, superando en proporción a los complejos respiratorios III y IV (Morales-Ríos *et al.*, 2010).

En las PSB de *P. denitrificans*, similar a lo que ocurre en PSM, se estima que el 10% de la proteína total corresponde a la PdF₁F₀-ATPasa (Carlos Chávez y José J. García-Trejo, datos no publicados). Por lo tanto, si en PSB de *P. denitrificans* hay por ejemplo de 10 a 50 veces más ATPasas que en los cromatóforos de *R. sphaeroides*, se esperaría una actividad específica en cromatóforos ~10 a 50 veces menor que en PSBs, lo cual concuerda con los resultados previamente reportados (Kaiser y Oelze 1980; Müller *et al.* 1982) y los resultados del presente trabajo, respectivamente. Debido a la baja actividad de ATPasa del presente trabajo, es más probable que la cantidad de ATPasas en PSBs sea 10 veces mayor que en cromatóforos y no 50 veces mayor. Sin embargo, las diferencias de actividad también pueden ser atribuidas a variaciones en las constantes cinéticas intrínsecas a cada enzima, por ejemplo, la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m). A este último respecto, más datos cinéticos (en las mismas condiciones de medición) deben ser obtenidos.

En resumen, la actividad hidrolítica de ATPasa observada en los cromatóforos de *R. sphaeroides* del presente trabajo se encuentra por debajo del valor esperado según reportes previos para la enzima de esta bacteria (Kaiser and Oelze, 1980; Müller *et al.*, 1982), lo cual es atribuido al uso de cromatóforos previamente congelados y almacenados. Además, se estima que hay 2 ATPasas por cada cromatóforo de *R. sphaeroides* (Cartron *et al.* 2014), mientras que la ATPasa es una proteína enriquecida en PSB de *P. denitrificans* (Morales-Ríos *et al.*, 2010). Tras comparar la actividad de ATPasa entre PSB de *P. denitrificans* (Mendoza-Hoffmann *et al.*, 2018) y cromatóforos de *R. sphaeroides* (Kaiser and Oelze, 1980; Müller *et al.*, 1982), se sugiere que hay 10 veces más ATPasas en PSB que en los cromatóforos.

Comparación estructural de las diferentes subunidades ζ e hipótesis evolutiva

La mayor parte de aminoácidos conservados (9 de 22) en las subunidades ζ analizadas se encuentran en los primeros 20 residuos de la región N-terminal, lo cual refleja la importancia funcional de esta región y cuyo requerimiento para la inhibición de la actividad de ATPasa ha sido demostrado en *P. denitrificans* y *Jannaschia* sp. (Zarco-Zavala *et al.*, 2014). Además, los alineamientos revelaron que, de las secuencias analizadas, la subunidad Rr ζ es la única con una cisteína en su composición, particularmente la Cys96 de la región C-terminal, un residuo que también ha sido observado en la secuencia de la α -proteobacteria rizobial *Methylobacterium radiotolerans* (Zarco-Zavala *et al.*, 2014), sin embargo, se desconoce si Cys96 juega un papel relevante en el mecanismo de inhibición.

Un análisis más profundo reveló que de 100 secuencias de la subunidad ζ , pertenecientes a α -proteobacterias del orden Rhodospirillales, sólo 2 tienen Cys96 en su composición, por lo que este es un residuo no conservado (**Anexo I**). En contraste, la secuencia consenso reveló que en la posición 96 se conserva un residuo de Leu (frecuencia del 79 %). Cys y Leu son aminoácidos con características fisicoquímicas diferentes, el primero es polar y el segundo no polar, lo que sugiere que las proteínas que tienen Cys pueden tener características diferentes. Sin embargo, en general, todas las secuencias son muy similares, por ejemplo, hay una identidad y similitud del 50 % y 70 %, respectivamente, entre

la secuencia consenso de la proteína ζ de Rhodospirillales y la proteína Rr ζ de *R. rubrum*. En conjunto, el hecho de que la Cys96 no está conservada y la alta similitud e identidad entre las subunidades ζ de diferentes bacterias del orden Rhodospirillales, sugieren que la presencia de Cys96 en la proteína Rr ζ puede ser un evento irrelevante para la función y/o regulación de la actividad de la ATPasa.

Sin embargo, en caso de que Cys96 tenga un papel relevante para ejercer su función, es posible que éste se relacione con las etapas iniciales de anclaje de la subunidad Rr ζ a su sitio de unión en la ATPasa. Esto debido a que la región C-terminal de la subunidad Pd ζ está relacionada con el anclaje inicial y mantenimiento de la proteína ζ en su posición final en la ATPasa. El modelo de inhibición en *P. denitrificans* (García-Trejo *et al.*, 2016) muestra que hay más contactos entre la región C-terminal de la subunidad Pd ζ y la F₁-ATPasa durante las etapas iniciales de inhibición que durante las etapas finales. Además, la sobreposición del modelo estructural de Rr ζ (del presente trabajo) sobre la subunidad Pd ζ en la estructura cristalográfica de la ATPasa inhibida de *P. denitrificans* (PDB: 5DN6, Morales-Ríos *et al.*, 2015, datos no mostrados), determinó que, en su posición final, Cys96 se encuentra a una distancia relativamente alejada ($> 20 \text{ \AA}$) de cualquier contacto posible con las subunidades más cercanas, *a* o *b*.

Los modelos estructurales de Rr ζ y Rs ζ generados en el presente trabajo revelaron una homología estructural significativa con la subunidad Pd ζ , lo cual se vio reflejado en la puntuación de confianza del 100 % y en la RMSD obtenida tras la superposición entre Rr ζ -Pd ζ y entre Rs ζ -Pd ζ . Esto significa que es altamente probable que las proteínas Rr ζ y Rs ζ adopten la conformación tridimensional modelada y que tengan una función inhibitoria sobre la ATPasa. De hecho, esta última predicción se pudo confirmar experimentalmente en la proteína Rs ζ . Cabe destacar que, de las secuencias proteicas comparadas, la subunidad Rr ζ es la más diferente, con un porcentaje de identidad entre el 39.62 % y el 29.81 %, al compararla con las proteínas Rs ζ y Rc ζ , respectivamente. A pesar de ello, su modelo estructural reveló un gran nivel de similitud con la subunidad Pd ζ , donde la actividad inhibitoria sobre la ATPasa ha sido bien caracterizada (de la Rosa-Morales, 2005; Morales-Ríos *et al.*, 2010; Zarco-Zavala *et al.*, 2014; García-Trejo *et al.*, 2016; Mendoza-Hoffmann *et al.*, 2018), lo cual sugiere que, no sólo la secuencia, sino también la estructura tridimensional de la subunidad ζ está fuertemente conservada entre α -proteobacterias, tal como ha sido propuesto por Serrano *et al.* (2014) y, además, apoya la hipótesis de que la subunidad ζ es el inhibidor endógeno de la ATPasa en este grupo de bacterias (Mendoza-Hoffmann, 2018; Morales-Ríos *et al.*, 2010; Zarco-Zavala *et al.*, 2014).

Esta última aseveración está fundada en búsquedas exhaustivas por BLAST, las cuales han revelado que la subunidad ζ está conservada y es exclusiva del grupo de las α -proteobacterias (Mendoza-Hoffmann, tesis Doctorado, 2018; Zarco-Zavala *et al.*, 2014). Además, considerando que el grupo de las α -proteobacterias se encuentra en una posición basal con respecto a las clases β -proteobacteria, γ -proteobacteria y Acidithiobacillia (Gupta, 2000; Zhu *et al.*, 2019), se puede sugerir que la proteína ζ es un carácter ancestral (o plesiomórfico) que se perdió en grupos bacterianos con una divergencia más reciente. Por

ejemplo, en *Klebsiella michiganensis* (y otras γ -proteobacterias), se encontró una proteína de 77 residuos (no. de acceso NCBI: WP_204313518) perteneciente a la misma familia que la subunidad ζ (DUF1476) y su alineamiento con la proteína Pd ζ reveló un 63 % de identidad (*E-value*: 5×10^{-18} ; cobertura: 65 %; **Anexo II**), por lo que esta proteína podría ser un vestigio de la subunidad ζ .

Por otro lado, actualmente no se conocen con claridad las relaciones de parentesco entre α -proteobacterias y el resto de clases pertenecientes al phylum Proteobacteria (δ -proteobacterias, ε -proteobacterias, ζ -proteobacterias etc.; Gupta, 2000; Zhu *et al.*, 2019), así como las relaciones de parentesco entre proteobacterias y bacterias de otros phyla (como Acidobacteria, Firmicutes, Cyanobacteria, Actinobacteria etc.; Zhu *et al.*, 2019), por lo que es difícil proponer a la subunidad ζ como un carácter apomórfico o plesiomórfico, considerando un panorama evolutivo más amplio. Sin embargo, si se considera que la subunidad ζ está codificada fuera del operón de la ATPasa (opero *unc*; **Anexo III**) y que este operón se conserva en diferentes grupos del dominio Bacteria (Gay y Walker, 1981; Kaim *et al.*, 1992; Ohta *et al.*, 1988), es posible que, con respecto a ciertos grupos, la subunidad ζ sea un carácter apomórfico, mientras que con respecto a otros (como las proteobacterias ya mencionadas) sea un carácter plesiomórfico. Finalmente, considerando únicamente a las clases β -proteobacteria, γ -proteobacteria y Acidithiobacillia (donde las relaciones filogenéticas sí son claras) la pérdida de la subunidad ζ con respecto a la clase α -proteobacteria, así como la permutación de la función inhibitoria a la subunidad ε , puede estar relacionada con diversos factores y procesos evolutivos, que van desde adaptativos, como selección natural, hasta estocásticos no adaptativos, como deriva génica.

Una explicación adaptativa de la pérdida de la subunidad ζ en bacterias como *E. coli* y la permutación de la función inhibitoria a la subunidad ε puede fundamentarse sobre el argumento de optimización de procesos y ahorro energético asociado. Por ejemplo, al permutar la función inhibitoria esos importantes para la regulación de la actividad y para el modelado de las crestas mitocondriales (Arselin *et al.*, 2004; Gu *et al.*, 2019; Pinke *et al.*, 2020). En este sentido, el inhibidor IF₁ cumple con dos funciones esenciales y su pérdida no podría ser reemplazada, únicamente, por la subunidad ε .

Cabe destacar que esta explicación está sesgada a una visión adaptativa del cambio evolutivo y carece de soporte experimental contundente que evalúe la adecuación biológica de las bacterias que utilizan la subunidad ε o ζ como inhibidor de la ATPasa. Por esto, se considera que debe ser tomada cautela y no se descarta la posibilidad de procesos evolutivos modeladores alternativos no adaptativos, por ejemplo, deriva génica. Debido a la complejidad e importancia de esta cuestión evolutiva, se considera necesario realizar un análisis más profundo en un trabajo exclusivo a elucidar con precisión la historia evolutiva de la subunidad ζ de α -proteobacterias, así como los procesos que llevaron a su pérdida en grupos bacterianos más recientes. Para ello se requiere, en parte, de hipótesis filogenéticas más claras del dominio Bacteria y del phylum Proteobacteria.

Finalmente, el árbol filogenético construido en el presente trabajo se ajusta a la hipótesis filogenética de Muñoz-Gómez *et al.* (2019) para el grupo de las α -proteobacterias,

ya que ambas colocan al orden Rhodospirillales en una posición basal con respecto a al orden Rhodobacterales. Sin embargo, al comparar la hipótesis del presente trabajo con el árbol temporal de divergencia generado en el servidor en línea <http://timetree.org/> (Anexo IV; Kumar *et al.*, 2017), se observa que ambos hacen una clara diferenciación entre Rhodospirillales y Rhodobacterales, pero en el árbol del servidor en línea se coloca a *R. capsulatus* y *R. sphaeroides* como grupo hermano de *P. denitrificans*, mientras que *Jannaschia* sp. se coloca como grupo hermano de estas tres especies y en una posición basal con respecto a *R. capsulatus* y *R. sphaeroides*. En contraste, en el árbol construido con la subunidad ζ , *R. sphaeroides* se coloca como grupo hermano del grupo formado por *Jannaschia* sp., *P. denitrificans* y *R. capsulatus*, ocupando una posición basal con respecto a estas últimas dos especies. Las relaciones sugeridas por el árbol temporal de divergencia son similares a las relaciones filogenéticas encontradas por Imhoff *et al.* (2005), donde se utilizó el gen ribosomal 16S. Esto tiene sentido si se considera que el servidor en línea realiza sus construcciones a partir de una base de datos de casi 4,000 estudios publicados de divergencia y filogenia, los cuales abarcan poco más de 97,000 especies, por lo que sus construcciones utilizan más de un carácter y son más confiables que, por ejemplo, la hipótesis construida sólo a partir de la subunidad ζ . En resumen, el árbol construido a partir de la subunidad ζ hace una buena diferenciación entre grupos taxonómicos superiores (a nivel de orden), pero es deficiente en niveles taxonómicos inferiores (a nivel género y especie).

Elusión inesperada de la proteína Rs ζ en los lavados de la columna DEAE

La proteína Rs ζ tiene un PI teórico de 4.95 y, durante la purificación, se trabajó a pH 7, por lo que se esperaría que la proteína Rs ζ estuviera cargada negativamente. Sin embargo, esta idea se vio desafiada por el hecho de que la proteína Rs ζ no se unió a la columna de intercambio aniónico DEAE (esto ha ocurrido en todas las purificaciones de la proteína RsZ), ya que salió en los lavados y no en las fracciones de elución con diferentes concentraciones de fosfato de potasio, como se ha observado con la subunidad ζ de *P. denitrificans* (Mendoza-Hofmann *et al.*, 2018; Zarco-Zavala *et al.*, 2014). Cabe destacar que ambas proteínas, Rs ζ y Pd ζ tienen un PI similar (4.95 y 4.76, respectivamente) y una cantidad similar de residuos positivos (17 y 18, respectivamente) y negativos (19 y 24, respectivamente).

Es bien sabido que el ambiente químico de los grupos funcionales ionizables puede influir sobre su pKa y, por ende, sobre su PI (Nelson y Cox, 2008), por lo que el PI teórico suele desviarse del PI experimental, donde el plegamiento de la estructura es relevante (Cargile *et al.*, 2014). Se puede hipotetizar que el plegamiento de Rs ζ favorece un PI mayor al PI teórico, incluso mayor a 7, por lo que a pH neutro Rs ζ estaría cargada positivamente, lo cual explicaría que no se unió a la columna DEAE. Sin embargo, si se considera que el modelo estructural del presente trabajo muestra que la proteína Rs ζ tiene una estructura muy similar a la estructura nativa de la proteína Pd ζ , además de que los residuos ionizables de ambas proteínas se encuentran en posiciones espaciales equivalentes (Anexo V), la posibilidad de que el plegamiento influya significativamente sobre el PI de Rs ζ puede ser descartada. Otra posibilidad es que la columna haya perdido eficiencia debido a que fue

regenerada y reempacada después de un largo periodo de no ser utilizada (debido a las restricciones de acceso al laboratorio por la pandemia), periodo en el que incluso llegó a secarse por un tiempo que desconocemos (al parecer, el usuario anterior no selló adecuadamente la columna). Esta hipótesis estaría apoyada por el hecho de que, en los geles de las fracciones de elución, se observan algunos carriles con bandas relativamente tenues con una masa de ~11.8 kDa, es decir, con la masa molecular esperada de la proteína Rsζ. Experimentos posteriores utilizando una columna nueva, recién empacada, aclararán esta cuestión. Algo importante de destacar es que esto no afectó negativamente la purificación, de hecho, la fracción en la que eluyó la proteína Rsζ mostró muy pocas proteínas contaminantes a comparación de las fracciones en las que se esperaba (300 y 350 mM de fosfato de potasio), por lo que se considera que fue un incidente favorable para la purificación.

Obtención de células transformantes estables de *E. coli* BL21 BL21(DE3)-pLysS pET3a/RSP_2125

Se sabe que el mantenimiento y la replicación de plásmidos exógenos en células bacterianas representa un estrés metabólico, pues una parte de los recursos energéticos son destinados a las tareas antes mencionadas, limitando los recursos disponibles para las funciones metabólicas relacionadas con el crecimiento y el mantenimiento celular basal (Silva *et al.*, 2012). En células transformantes de *E. coli* crecidas en medio selectivo, se ha reportado una disminución en la tasa de crecimiento y formación de biomasa total dependiente del tamaño del plásmido insertado. Además, el crecimiento de estas células en medio no selectivo condujo a la pérdida segregacional del plásmido a una tasa proporcional a su tamaño, lo que eliminó el estrés metabólico inducido por la presencia de la partícula nucleica exógena (Smith y Bidochka, 1998).

En el caso particular de las células transformantes *E. coli* BL21(DE3)-pLysS pET3a/RSP_2125 que no pudieron crecer en medio con cloranfenicol es muy probable que se haya perdido el plásmido pLysS, un vector que codifica, además de la lisozima T7, la enzima cloranfenicol acetil-transferasa y que confiere resistencia a cloranfenicol. La sospecha de la pérdida del pLysS se ve reforzada por el hecho de que, tras la obtención de células transformantes de *E. coli* BL21BL21(DE3)-pLysS pET3a/RSP_2125, nunca se utilizaba cloranfenicol para su crecimiento, únicamente ampicilina, además, la capacidad de sobreexpresar la proteína Rsζ se veía casi totalmente disminuida con el tiempo. Fue sólo hasta que se utilizó cloranfenicol en todos los pasos (desde la inducción de la competencia hasta la transformación y subsecuentes cultivos) que estas células mostraron resistencia al fármaco y estabilidad duradera en la sobreexpresión de la proteína Rsζ (el mismo stock de células transformantes *E. coli* BL21 BL21(DE3)-pLysS pET3a/RSP_2125 mantenidas a -70°C en medio con glicerol se ha utilizado a lo largo de 4 meses sin inconvenientes relacionados a la pérdida del pLysS).

No existe información acerca de una inducción dependiente de pLysS y el consenso general es que no se necesita de este plásmido para la sobreexpresión de proteínas en *E. coli*,

pues su función principal es evitar la expresión de fondo o expresión no inducida, lo cual es particularmente útil cuando se trabaja con proteínas tóxicas. Evidencia de ello es que la venta comercial de células competentes de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS negativas para la sobreexpresión de proteínas está disponible. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que sólo las células resistentes a cloranfenicol (y por ende pLysS positivas) fueron capaces de sobreexpresar la proteína Rsζ tras la inducción con IPTG. En el caso de los experimentos de sobreexpresión realizados anteriormente por Gilberto Garduño, a pesar de que no se utilizó cloranfenicol en el medio, es posible que inicialmente cierta proporción de células aun conservara el pLysS, sin embargo, tras subcultivos sucesivos, esta proporción se fue diluyendo hasta perderse, lo cual explicaría que no se logró obtener reproducibilidad de la sobreexpresión. En *E. coli* se ha visto una reducción del ~50 % y el ~80 % en la cantidad de células transformantes tras el primer y tercer subcultivo en medio no selectivo, respectivamente (Smith y Bidochka, 1998).

Dificultades asociadas a la subclonación del gen Rru_A0714 en un vector de expresión

La obtención de la construcción pT7-7/Rru_A0714 y pET3a/Rru_A0714 pudo haber fallado por varias razones y a diferentes niveles del procedimiento: durante la purificación del gen y/o del plásmido, durante la ligación del gen al plásmido o durante la transformación de las células competentes de *E. coli* DH5α. Además, se pueden proponer dos escenarios generales posibles con base en que algunas veces sí hubo se obtuvieron células transformantes y en otras no.

Cuando no se observaron células transformantes, pudo haber errores durante la purificación, la ligación o la transformación. En el primer caso (la purificación), es posible que los extremos adhesivos del vector, del gen o de ambos hayan sufrido algún daño o mutación por la exposición a UV durante el corte del gel para su purificación. Esto provocaría la incompatibilidad de los extremos y, por ende, la imposibilidad de ligarse en presencia de la ligasa T4. Esta hipótesis se ve favorecida por el hecho de que el daño más común por luz UV sobre el DNA es la formación de dímeros de pirimidinas y la formación de fotoproductos 6-4 (Mitchell y Karentz, 1993; You *et al.*, 2000). En este sentido, la secuencia reconocida por BamHI (5' GGATCC 3') tiene tres pirimidinas continuas y susceptibles a sufrir alguno de los efectos mencionados. Adicionalmente, se sabe que la formación de dímeros de pirimidina ocurre con más facilidad en regiones de cadena sencilla del DNA (Becker y Wang, 1989), una característica presente en los extremos adhesivos formados tras el corte del plásmido y el gen con BamHI. El segundo caso (la ligación), pudo haber fallado a raíz del primer caso descrito, pero también es posible que los extremos adhesivos del vector y del gen estuvieran íntegros, por lo que la razones por las que no se pudo ligar podrían estar relacionadas con a otras causas, como una digestión incompleta del inserto y del vector, lo que conduce a una menor cantidad de extremos adhesivos disponibles y una disminución en la eficiencia de ligación (Matsumura, 2015). Este caso se vería apoyado por el hecho de que, en algunos casos (la minoría), las digestiones del plásmido no mostraban una banda única,

en lugar ello, se veía un pequeño barrido alrededor del tamaño esperado del vector completamente digerido (se descarta que la razón se deba a las condiciones de ligación, ya que se realizaron pruebas con diferentes relaciones inserto:vector y siguiendo las recomendaciones del fabricante de la ligasa T4). En el tercer caso (la transformación), suponiendo que el plásmido y el gen se ligaron adecuadamente, es posible que las células competentes hayan perdido eficiencia debido a razones como: descongelamiento demasiado rápido o porque sufrieron algún evento de descongelación-recongelación. Durante los experimentos de transformación, las células siempre fueron descongeladas durante 5 min en hielo, como ha sido recomendado (Chung *et al.*, 1989), lo que permite descartar la primera posibilidad. Mientras que la segunda posibilidad (eventos de descongelación-recongelación) podría ser considerada, ya que en algún momento se descompuso el REVCO del laboratorio y todo su contenido tuvo que ser trasladado (en las mejores condiciones posibles para minimizar el descongelamiento de células, proteínas purificadas, PSB etc.) a un REVCO presente en otra Facultad. Sin embargo, posteriormente a este desafortunado suceso, se lograron obtener células transformantes con las células competentes que sufrieron el traslado, por lo que esta posibilidad también se descarta.

Cuando sí se observaron células transformantes, el análisis de sus fragmentos de restricción fue poco concluyente (las enzimas de restricción de New England BioLabs® no reportan efecto estrella bajo las condiciones utilizadas, por lo que esta posibilidad puede ser descartada) o, cuando fue concluyente, la secuenciación reveló que se trataba del gen que codifica para la proteína ζ de *P. denitrificans* o de *Sinorhizobium meliloti* (se trabaja con ambas bacterias en el laboratorio), lo cual indica contaminación durante el proceso de clonación.

Anteriormente, en nuestro laboratorio se realizaron numerosos intentos de clonar el gen de la subunidad ζ de *R. capsulatus* (una α -proteobacteria fotosintética) a un vector de expresión, pero sólo se obtuvieron resultados negativos al respecto (Mendoza-Hoffmann, 2018, tesis Doctorado), de manera similar al presente trabajo. Además, la obtención de la construcción pJET1.2/Rru_A0714 del presente trabajo fue muy complicada y requirió una gran cantidad de ensayos en diferentes condiciones antes de su obtención. Considerando que (1) para la purificación del gen Rru_A0714 y de los vectores de expresión se minimizó la exposición a luz UV, (2) para las digestiones y ligaciones se trabajó bajo los estándares recomendados por el fabricante de las enzimas, (3) que en la mayoría de geles se observaba una digestión completa del vector, (4) que las células competentes seguían funcionando a pesar de haber sido trasladadas de un REVCO a otro, (5) que anteriormente no se logró clonar el gen de la subunidad ζ de *R. capsulatus* (Mendoza-Hoffmann, 2018, tesis Doctorado) y (6) que obtener la construcción pJET1.2/Rru_A0714 del presente trabajo fue una tarea con muchas dificultades, se puede sugerir que un factor intrínseco al gen de la proteína ζ de estas bacterias fotosintéticas es la causa de no haber logrado su subclonación en un vector de expresión. Un factor intrínseco que caracteriza a los genes de la subunidad ζ de *R. rubrum* y *R. capsulatus* es el alto contenido de GC que presentan (62.2 % y 64.1 %, respectivamente). Sin embargo, en fragmentos de DNA de 300 pb, se ha observado una ligación-dependiente

de ligasa T4 más eficiente a cuando el fragmento tiene un contenido alto de GC (63 %) que cuando este contenido es bajo (32 %; Ishihara *et al.*, 2017), por lo que esta posibilidad puede ser descartada, por lo que determinar la razón por la que no se logró la subclonación queda abierta a discusión. Debido a las numerosas dificultades de la subclonación, decidimos inclinarnos por la compra de la construcción pET3a/Rru_A0714.

Conclusiones

La proteína recombinante ζ de *R. sphaeroides* sí tiene actividad inhibitoria sobre la RsF_0F_1 -ATPasa en cromatóforos. Este trabajo representa la primera comprobación de la función inhibitoria de la subunidad ζ en la F_1F_0 -ATPasa de α -proteobacterias fotosintéticas.

La forma de la curva de inhibición de la proteína $\text{Rs}\zeta$ sobre la RsF_0F_1 -ATPasa muestra un patrón general de inhibición similar al reportado para las subunidades $\text{Pd}\zeta$ y $\text{Js}\zeta$ (Zarco-Zavala *et al.*, 2014), lo cual, aunado a la gran similitud estructural entre $\text{Rs}\zeta$ y $\text{Pd}\zeta$, permite sugerir que es posible que las constantes de inhibición asociadas a la proteína $\text{Rs}\zeta$ sean similares a las reportadas para $\text{Pd}\zeta$ y $\text{Js}\zeta$ (Zarco-Zavala *et al.*, 2014).

El valor de actividad específica de la ATPasa obtenido en el presente trabajo se encuentra ~13 veces por debajo de los valores previamente reportados para los cromatóforos de esta bacteria (Kaiser y Oelze 1980; Müller *et al.* 1982). Es probable que esto deba a que, tras su preparación, los cromatóforos de *R. sphaeroides* fueron almacenados por varios meses a -70°C hasta su uso.

Observaciones finales y logros

Dada la alta similitud estructural entre la proteína Rr ζ de *R. rubrum* con la subunidad ζ de *P. denitrificans* y la subunidad ζ de *R. sphaeroides*, donde la función inhibitoria sobre la F₀F₁-ATPasa ha sido comprobada (Zarco-Zavala *et al.*, 2014; presente trabajo), es altamente probable que la proteína hipotética Rr ζ conserve una actividad inhibitoria sobre la RrF₀F₁-ATPasa. Esta hipótesis de conservación de la función inhibitoria puede extenderse a la proteína ζ de otras α -proteobacterias fotosintéticas, como la proteína Rc ζ , la cual muestra una alta similitud a nivel de estructura primaria con Rr ζ y Rs ζ .

La subunidad Rr ζ de *R. rubrum* presenta la secuencia más diferente de todas las proteínas analizadas, a pesar de ello, su modelo estructural reveló un gran nivel de similitud estructural con las subunidades Pd ζ y Rs ζ , lo cual sugiere que la estructura de la subunidad ζ está fuertemente conservada entre α -proteobacterias, tal como ha sido propuesto por Serrano *et al.* (2014).

La subunidad Rr ζ es la única con una cisteína en su composición, particularmente en la posición Cys96 de la región C-terminal. Un análisis más amplio reveló que esta Cys96 no está conservada entre bacterias del orden Rhodospirillales, por lo que es poco probable que tenga un papel relevante en la regulación de la actividad de la ATPasa.

El origen evolutivo de la subunidad ζ es ambiguo. Por un lado, parece que la subunidad ζ es un carácter plesiomórfico con respecto a proteobacterias de las clases β -proteobacteria, γ -proteobacteria y Acidithiobacillia. Por otro lado, es complicado asignar un estatus evolutivo (plesiomórfico o apomórfico) a este carácter con respecto a otras clases de proteobacterias y con respecto a otros phyla bacterianos, particularmente porque las relaciones filogenéticas disponibles son poco claras. Determinar la historia y procesos evolutivos que llevaron a la adquisición de la subunidad ζ como inhibidor de la ATPasa en α -proteobacterias requiere de un estudio evolutivo extenso, el cual sería favorable comenzar por la construcción de una hipótesis filogenética clara del dominio Bacteria y del phylum proteobacteria.

Se logró obtener un stock estable de células transformantes *E. coli* BL21(DE3)-pLysS BL21 pET3a/RSP_2125, lo cual es atribuido al uso de cloranfenicol para su preparación y cultivos subsecuentes. El mismo stock de células transformantes se ha utilizado a lo largo de 4 meses sin inconvenientes relacionados a la pérdida del pLysS.

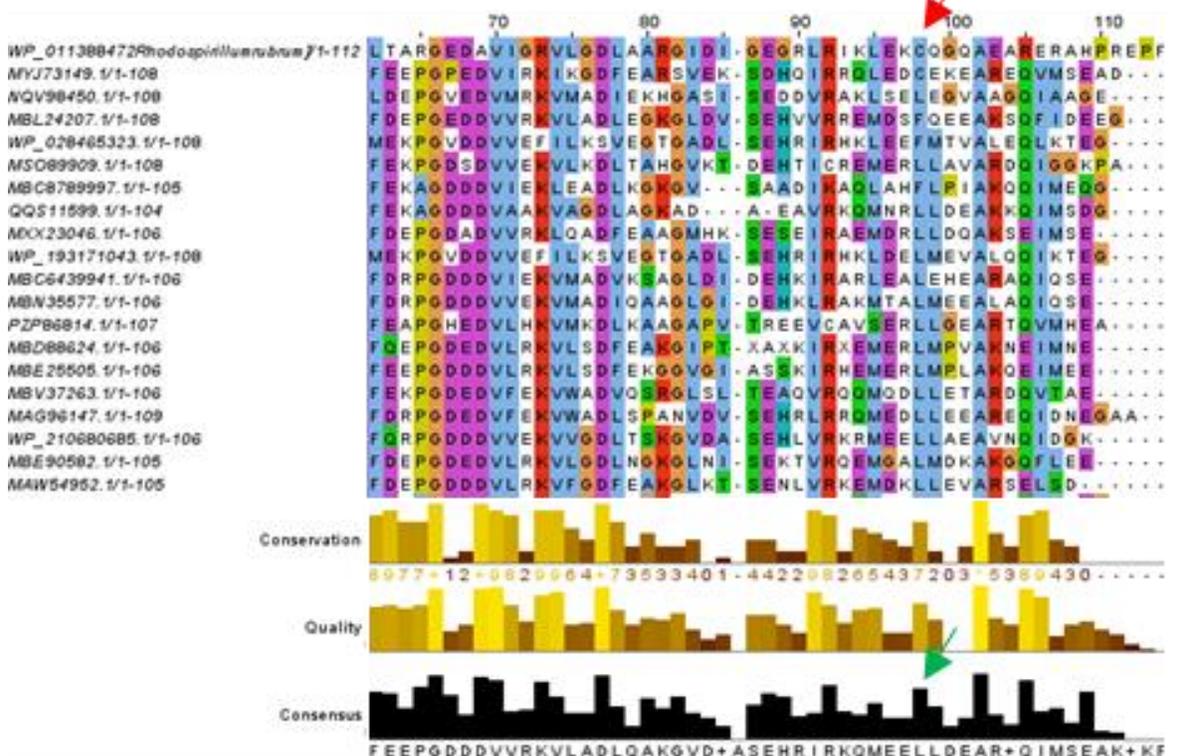
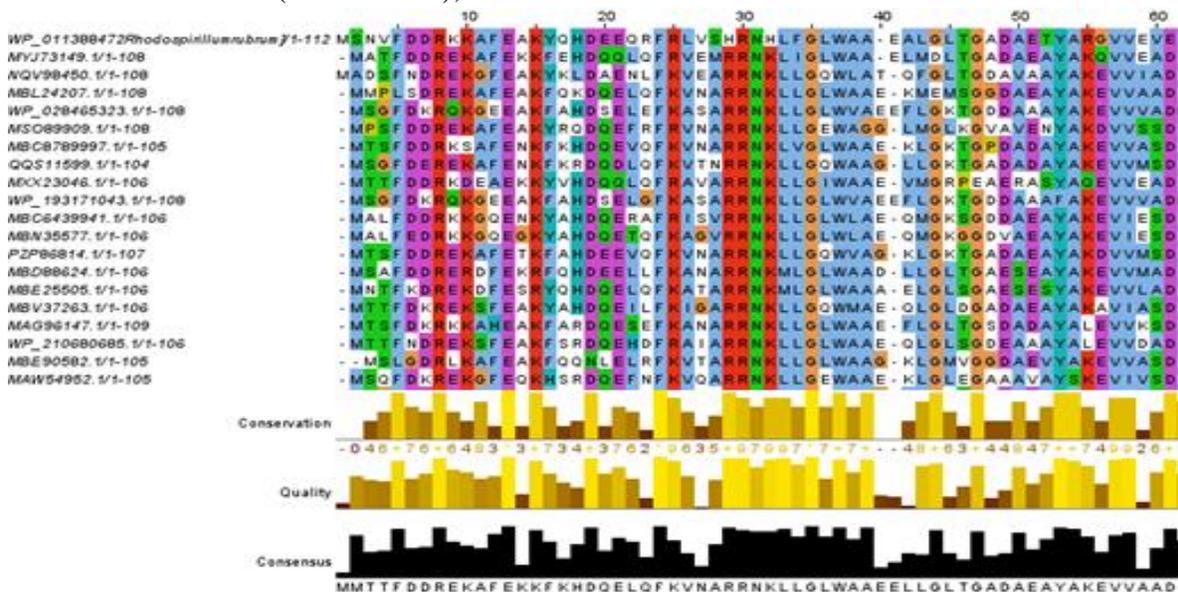
Es altamente probable que la proteína Rs ζ (PI = 4.95) esté cargada negativamente a pH 7, por lo que su elusión temprana de la columna DEAE puede estar relacionada con una pérdida de eficiencia de la columna.

Se obtuvo la construcción pJET1.2/Rru_A0714, la cual puede ser utilizada para subsecuentes experimentos enfocados en el estudio de la función de la proteína Rr ζ ,

Anexos

Anexo I

Alineamiento múltiple de 100 secuencias (se muestran 20 por simplicidad) de la subunidad ζ de diferentes bacterias del orden Rhodospirillales. De las 100 secuencias analizadas, sólo 2 presentan la Cys96 en su composición (en este alineamiento particular se observa en la posición 98; flecha roja). La secuencia consenso muestra que en esta posición se conserva una Leu (flecha verde), la cual tiene una frecuencia del 76 %.



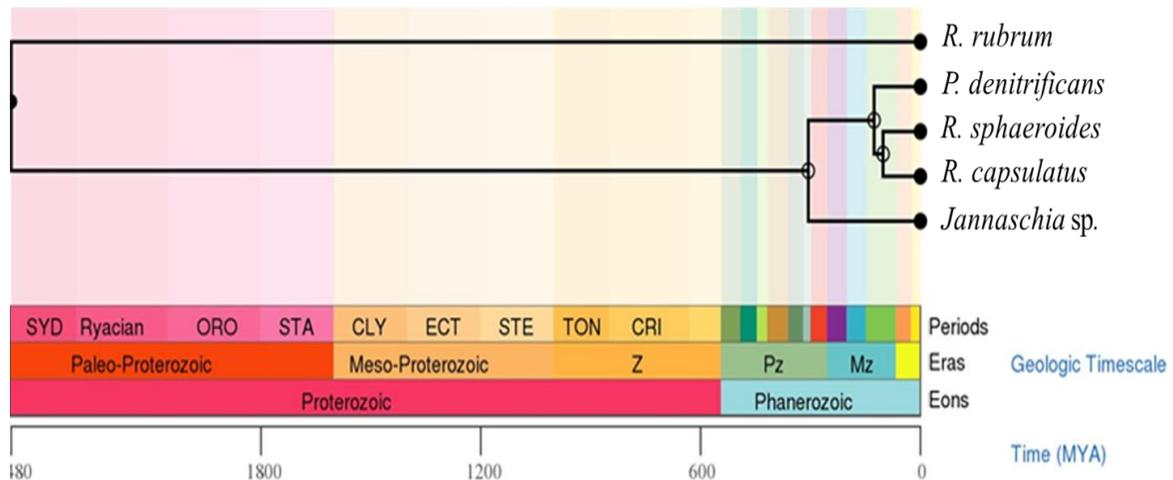
Anexo II

Análisis por BLAST de la proteína Pdζ (no. de acceso NCBI: 2LL0_A) contra la base de datos de proteínas no redundantes del grupo de las γ-proteobacterias. Se observan numerosos match con proteínas de la familia DUF1476. Nótese que la cobertura de los alineamientos es significativamente menor al 100 %, lo que refleja que las proteínas con las que se hizo el match son de un tamaño significativamente menor que la subunidad Pdζ. En *K. michiganensis*, por ejemplo, se encontró un match con una longitud de 77 residuos (no. de acceso NCBI: WP_204313518), un 63 % de identidad y cobertura de 65 % (*E-value*: 5×10^{-18}).

| <input checked="" type="checkbox"/> select all 15 sequences selected | | GenPept | Graphics | Distance tree of results | Multiple alignment | New MSA Viewer | | | |
|--|---|--|--------------------------|--|------------------------------------|--------------------------------|------------|----------|--------------------------------|
| | Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
| <input checked="" type="checkbox"/> | DUF1476 family protein [Serratia marcescens] | Serratia marcescens | 96.7 | 96.7 | 70% | 2e-24 | 63.01% | 82 | WP_204349931.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | DUF1476 family protein [Salmonella sp. S071_01786] | Salmonella sp. S071_01786 | 92.0 | 92.0 | 73% | 1e-22 | 63.16% | 76 | WP_187789472.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | DUF1476 domain-containing protein [Stenotrophomonas maltophilia] | Stenotrophomonas maltop... | 91.3 | 91.3 | 67% | 2e-22 | 67.61% | 71 | WP_164214168.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | hypothetical protein [Oceanospirillum sp.] | Oceanospirillum sp. | 90.9 | 90.9 | 73% | 6e-22 | 52.63% | 104 | MAC45332.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | DUF1476 family protein [Klebsiella michiganensis] | Klebsiella michiganensis | 80.1 | 80.1 | 65% | 5e-18 | 63.24% | 72 | WP_204313518.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | DUF1476 domain-containing protein [Acinetobacter baumannii] | Acinetobacter baumannii | 75.9 | 75.9 | 73% | 3e-16 | 56.58% | 88 | WP_213030089.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | DUF1476 domain-containing protein [Salmonella enterica subsp. enterica serovar New ...] | Salmonella enterica subsp... | 62.8 | 62.8 | 50% | 2e-11 | 57.69% | 52 | MBC7022880.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | DUF1476 family protein [Klebsiella michiganensis] | Klebsiella michiganensis | 61.6 | 61.6 | 32% | 4e-11 | 88.24% | 34 | WP_186385817.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | DUF1476 domain-containing protein [Klebsiella pneumoniae] | Klebsiella pneumoniae | 62.4 | 62.4 | 67% | 5e-11 | 47.95% | 76 | WP_163616258.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | DUF1476 family protein [Psychrobacter sp. NG254] | Psychrobacter sp. NG254 | 58.5 | 58.5 | 35% | 5e-10 | 70.27% | 37 | WP_194365359.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | DUF1476 family protein [Escherichia coli] | Escherichia coli | 54.3 | 54.3 | 53% | 5e-08 | 56.14% | 61 | WP_163362278.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | DUF1476 family protein [Enterobacter hormaechei] | Enterobacter hormaechei | 52.0 | 52.0 | 35% | 4e-07 | 67.57% | 64 | WP_204272212.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | DUF1476 family protein [Klebsiella aerogenes] | Klebsiella aerogenes | 50.4 | 50.4 | 48% | 1e-06 | 52.00% | 60 | WP_163368034.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | DUF1476 family protein [Stenotrophomonas maltophilia] | Stenotrophomonas maltop... | 44.7 | 44.7 | 32% | 2e-04 | 58.82% | 55 | WP_204325572.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | DUF1476 family protein [Klebsiella varicola] | Klebsiella varicola | 44.3 | 44.3 | 53% | 3e-04 | 44.07% | 62 | WP_204325572.1 |

Anexo IV

Árbol temporal de divergencia construido en el servidor en línea *TIME TREE THE TIME SCALE of LIFE* (<http://timetree.org/>; Kumar *et al.*, 2017), el cual usa para sus construcciones y estimaciones una base de datos de casi 4,000 estudios publicados de divergencia y filogenia, los cuales abarcan poco más de 97,000 especies. Se observa que observa una clara diferenciación entre Rhodospirillales (*R. rubrum*) y Rhodobacterales (*P. denitrificans*, *R. sphaeroides*, *R. capsulatus* y *Janaschia* sp.), además, coloca a *P. denitrificans* como grupo hermano de *R. sphaeroides* y *R. capsulatus*, mientras que *Janaschia* sp. ocupa una posición basal con respecto a estas últimas dos especies. El árbol fue cortesía del Dr. Héctor Riveros.



Anexo V

Modelo estructural de la subunidad Rs ζ (morado) y estructura tridimensional de la subunidad Pd ζ (amarillo; PDB: 2LL0). En rojo se marcan los residuos con carga negativa (Asp y Glu) y en cian los residuos con carga positiva (Lys, His y Arg). Nótese que la posición espacial de los residuos cargados es similar en ambas proteínas.



Referencias

- Aagaard, J., & Siström, W. R. (1972). Control of the synthesis of reaction center bacteriochlorophyll in photosynthetic bacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 15(2), 209–225. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1972.tb06240.x>
- Abed, R. M. M., Dobretsov, S., & Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x>
- Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., & Walker, J. E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, 370(6491), 621–628. <https://doi.org/10.1038/370621a0>
- Ahmad, Z., & Cox, J. L. (2014). ATP Synthase: The Right Size Base Model for Nanomotors in Nanomedicine. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/567398>
- Arselin, G., Vaillier, J., Salin, B., Schaeffer, J., Giraud, M. F., Dautant, A., Brèthes, D., & Velours, J. (2004). The Modulation in Subunits e and g Amounts of Yeast ATP Synthase Modifies Mitochondrial Cristae Morphology. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40392–40399. <https://doi.org/10.1074/jbc.m404316200>
- Bason, J. V., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (2014). Pathway of binding of the intrinsically disordered mitochondrial inhibitor protein to F1-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(31), 11305–11310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411560111>
- Batis, C., Rodríguez-Ramírez, S., Ariza, A. C., & Rivera, J. A. (2016). Intakes of Energy and Discretionary Food in Mexico Are Associated with the Context of Eating: Mealtime, Activity, and Place. *The Journal of Nutrition*, 146(9), 1907S–1915S. <https://doi.org/10.3945/jn.115.219857>
- Becker, M. M., & Wang, Z. (1989). Origin of ultraviolet damage in DNA. *Journal of Molecular Biology*, 210(3), 429–438. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90120-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(89)90120-4)
- Beatty, J. T., & Gest, H. (1981). Biosynthetic and Bioenergetic Functions of Citric Acid Cycle Reactions in *Rhodospseudomonas capsulata*. *Journal of Bacteriology*, 148(2), 584–593. <https://doi.org/10.1128/jb.148.2.584-593.1981>
- Behrens, M. I., & Meis, L. (1985). Synthesis of pyrophosphate by chromatophores of *Rhodospirillum rubrum* in the light and by soluble yeast inorganic pyrophosphatase in water-organic solvent mixtures. *European Journal of Biochemistry*, 152(1), 221–227. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb09187.x>
- Belogradov, G. I., Tomich, J. M., & Hatefi, Y. (1996). Membrane Topography and Near-neighbor Relationships of the Mitochondrial ATP Synthase Subunits e, f, and g.

Journal of Biological Chemistry, 271(34), 20340–20345.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20340>

- Blankenship, R. E. (2014). *Molecular Mechanisms of Photosynthesis* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.
- Bonora, M., Patergnani, S., Rimessi, A., De Marchi, E., Suski, J. M., Bononi, A., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., Wieckowski, M. R., & Pinton, P. (2012). ATP synthesis and storage. *Purinergic Signalling*, 8(3), 343–357.
<https://doi.org/10.1007/s11302-012-9305-8>
- Boyer, P. D. (1989). A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis 1. *The FASEB Journal*, 3(10), 2164–2178. <https://doi.org/10.1096/fasebj.3.10.2526771>
- Boyer, P. D. (1997). THE ATP SYNTHASE—A SPLENDID MOLECULAR MACHINE. *Annual Review of Biochemistry*, 66(1), 717–749.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.717>
- Cabezón, E., Runswick, M. J., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (2001). The structure of bovine IF1, the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase. *The EMBO Journal*, 20(24), 6990–6996. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.6990>
- Cabezón, E., Arechaga, I., Jonathan, P., Butler, G., & Walker, J. E. (2000). Dimerization of Bovine F1-ATPase by Binding the Inhibitor Protein, IF1. *Journal of Biological Chemistry*, 275(37), 28353–28355. <https://doi.org/10.1074/jbc.c000427200>
- Capaldi, R. A., & Aggeler, R. (2002). Mechanism of the F1F0-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(3), 154–160.
[https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)02051-5](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)02051-5)
- Cargile, B. J., Bundy, J. L., Freeman, T. W., & Stephenson, J. L. (2004). Gel Based Isoelectric Focusing of Peptides and the Utility of Isoelectric Point in Protein Identification. *Journal of Proteome Research*, 3(1), 112–119.
<https://doi.org/10.1021/pr0340431>
- Cartron, M. L., Olsen, J. D., Sener, M., Jackson, P. J., Brindley, A. A., Qian, P., Dickman, M. J., Leggett, G. J., Schulten, K., & Hunter, C. N. (2014). Integration of energy and electron transfer processes in the photosynthetic membrane of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837, e118.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.05.314>
- Chimeo, C., Fernandez-Gimenez, A. V., Campanella, M., Mendez-Romero, O., & Muhlia-Almazan, A. (2015). The shrimp mitochondrial FoF1-ATPase inhibitory factor 1 (IF1). *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 47(5), 383–393.
<https://doi.org/10.1007/s10863-015-9621-0>

- Chung, C. T., Niemela, S. L., & Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(7), 2172–2175. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2172>
- Cingolani, G., & Duncan, T. M. (2011). Structure of the ATP synthase catalytic complex (F1) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(6), 701–707. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2058>
- Cintrón, N. M., & Pedersen, P. L. (1979). A protein inhibitor of the mitochondrial adenosine triphosphatase complex of rat liver. Purification and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 254(9), 3439–3443. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)50778-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)50778-x)
- Cohen-Bazire, G., Sistrom, W. R., & Stanier, R. Y. (1957). Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 49(1), 25–68. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030490104>
- Collinson, I. R., van Raaij, M. J., Runswick, M. J., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., Orriss, G. L., Miroux, B., & Walker, J. E. (1994). ATP Synthase from Bovine Heart Mitochondria. *Journal of Molecular Biology*, 242(4), 408–421. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1591>
- de la Rosa Morales, F. (2005). Composición de subunidades y mecanismo de regulación de la F1F0-ATPasa de *Paracoccus denitrificans*. Tesis de Maestría en Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM. Asesor: José J. García Trejo. UNAM. http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/P4TRES8SEIG3INKNC2SS6L4R48US19685RFR/SVV5DRBBNKUDRA-24746?func=full-setset&set_number=003446&set_entry=000001&format=999
- Drews, G. (1985). Structure and functional organization of light-harvesting complexes and photochemical reaction centers in membranes of phototrophic bacteria. *Microbiological Reviews*, 49(1), 59–70. <https://doi.org/10.1128/mmbr.49.1.59-70.1985>
- DePamphilis, M. L., & Adler, J. (1971). Fine Structure and Isolation of the Hook-Basal Body Complex of Flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 105(1), 384–395. <https://doi.org/10.1128/jb.105.1.384-395.1971>
- Devenish, R. J., Prescott, M., & Rodgers, A. J. W. (2008). The Structure and Function of Mitochondrial F1F0-ATP Synthases. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 1–58. [https://doi.org/10.1016/s1937-6448\(08\)00601-1](https://doi.org/10.1016/s1937-6448(08)00601-1)
- Domínguez-Ramírez, L. & Tuena, M. (2005). La F1F0 ATPasa: UN COMPLEJO PROTEICO CON GRAN VERSATILIDAD ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 8(1), 18–27.

- Dufresne, A., Salanoubat, M., Partensky, F., Artiguenave, F., Axmann, I. M., Barbe, V., Duprat, S., Galperin, M. Y., Koonin, E. V., Le Gall, F., Makarova, K. S., Ostrowski, M., Oztas, S., Robert, C., Rogozin, I. B., Scanlan, D. J., de Marsac, N. T., Weissenbach, J., Wincker, P., . . . Hess, W. R. (2003). Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(17), 10020–10025. <https://doi.org/10.1073/pnas.1733211100>
- Dreyfus, G., Gómez-Puyou, A., & Tuena de Gómez-Puyou, M. (1981). Electrochemical gradient induced displacement of the natural ATPase inhibitor protein from mitochondrial ATPase as detected by antibodies against the inhibitor protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 100(1), 400–406. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(81\)80110-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(81)80110-6)
- Dreyfus, G., & Satre, M. (1984). The ϵ subunit as an ATPase inhibitor of the F₁-ATPase in *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 229(1), 212–219. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(84\)90146-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(84)90146-2)
- Ebel, R. E., & Lardy, H. A. (1975). Influence of aurovertin on mitochondrial ATPase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 250(13), 4992–4995. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)41267-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)41267-2)
- Falcone, D. L., & Tabita, F. R. (1991). Expression of endogenous and foreign ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase (RubisCO) genes in a RubisCO deletion mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, 173(6), 2099–2108. <https://doi.org/10.1128/jb.173.6.2099-2108.1991>
- Feher, G., Allen, J. P., Okamura, M. Y., & Rees, D. C. (1989). Structure and function of bacterial photosynthetic reaction centres. *Nature*, 339(6220), 111–116. <https://doi.org/10.1038/339111a0>
- Feniouk, B. A., Cherepanov, D. A., Voskoboynikova, N. E., Mulkidjanian, A. Y., & Junge, W. (2002). Chromatophore Vesicles of *Rhodobacter capsulatus* Contain on Average One F_oF₁-ATP Synthase Each. *Biophysical Journal*, 82(3), 1115–1122. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(02\)75470-2](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(02)75470-2)
- Feniouk, B. A., Suzuki, T., & Yoshida, M. (2006). The role of subunit epsilon in the catalysis and regulation of F_oF₁-ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(5–6), 326–338. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.03.022>
- Ferguson, S. J., Jackson, J. B., & McEwan, A. G. (1987). Anaerobic respiration in the Rhodospirillaceae: characterisation of pathways and evaluation of roles in redox balancing during photosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 46(2), 117–143. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02455.x>
- Fischer, S., Gräber, P., & Turina, P. (2000). The Activity of the ATP Synthase from *Escherichia coli* Is Regulated by the Transmembrane Proton Motive Force. *Journal*

- Fujikawa, M., Imamura, H., Nakamura, J., & Yoshida, M. (2012). Assessing Actual Contribution of IF1, Inhibitor of Mitochondrial FoF1, to ATP Homeostasis, Cell Growth, Mitochondrial Morphology, and Cell Viability. *Journal of Biological Chemistry*, 287(22), 18781–18787. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.345793>
- García-Bermúdez, J., Sánchez-Aragó, M., Soldevilla, B., del Arco, A., Nuevo-Tapióles, C., & Cuezva, J. M. (2015). PKA Phosphorylates the ATPase Inhibitory Factor 1 and Inactivates Its Capacity to Bind and Inhibit the Mitochondrial H⁺-ATP Synthase. *Cell Reports*, 12(12), 2143–2155. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.052>
- 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*, 45(42), 12695–12703. <https://doi.org/10.1021/bi060339j>
- García-Trejo, J. J., & Morales-Ríos, E. (2008). Regulation of the F1F0-ATP Synthase Rotary Nanomotor in its Monomeric-Bacterial and Dimeric-Mitochondrial Forms. *Journal of Biological Physics*, 34(1–2), 197–212. <https://doi.org/10.1007/s10867-008-9114-z>
- García-Trejo, J. J., Zarco-Zavala, M., Mendoza-Hoffmann, F., Hernández-Luna, E., Ortega, R., & Mendoza-Hernández, G. (2016). The Inhibitory Mechanism of the ζ Subunit of the F1F0-ATPase Nanomotor of *Paracoccus denitrificans* and Related α-Proteobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 291(2), 538–546. <https://doi.org/10.1074/jbc.m115.688143>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*, 571–607. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Gay, N. J., & Walker, J. E. (1981). The atp operon: nucleotide sequence of the promoter and the genes for the membrane proteins, and the δ subunit of *Escherichia coli* ATP-synthase. *Nucleic Acids Research*, 9(16), 3919–3926. <https://doi.org/10.1093/nar/9.16.3919>
- Gennis, R. B., Barquera, B., Hacker, B., Van Doren, S. R., Arnaud, S., Crofts, A. R., Davidson, E., Gray, K. A., & Daldal, F. (1993). The bc1 complexes of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 25(3), 195–209. <https://doi.org/10.1007/bf00762582>
- Gibbons, C., Montgomery, M., Leslie, A. et al. The structure of the central stalk in bovine F1-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat Struct Mol Biol* 7, 1055–1061 (2000). <https://doi.org/10.1038/80981>

- Gledhill, J. R., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (2007). How the regulatory protein, IF1, inhibits F1-ATPase from bovine mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(40), 15671–15676. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707326104>
- Gómez-Puyou, A., Tuena de 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 (BBA) - Bioenergetics*, 547(2), 252–257. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(79\)90008-2](https://doi.org/10.1016/0005-2728(79)90008-2)
- González, J. M., Mayer, F., Moran, M. A., Hodson, R. E., & Whitman, W. B. (1997). *Sagittula stellata* gen. nov., sp. nov., a Lignin-Transforming Bacterium from a Coastal Environment. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(3), 773–780. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-3-773>
- Gordon-Smith, D. J., Carbajo, R. J., Yang, J.-C., Videler, H., Runswick, M. J., Walker, J. E., & Neuhaus, D. (2001). Solution structure of a C-terminal coiled-coil domain from bovine IF1: the inhibitor protein of F1 ATPase1 1Edited by M. F. Summers. *Journal of Molecular Biology*, 308(2), 325–339. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4570>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2016). Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with Sodium Dodecyl Sulfate: Minipreps. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(10), pdb.prot093344. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093344>
- Gu, J., Zhang, L., Zong, S., Guo, R., Liu, T., Yi, J., Wang, P., Zhuo, W., & Yang, M. (2019). Cryo-EM structure of the mammalian ATP synthase tetramer bound with inhibitory protein IF1. *Science*, 364(6445), 1068–1075. <https://doi.org/10.1126/science.aaw4852>
- Guo, H., Suzuki, T., & Rubinstein, J. L. (2019). Structure of a bacterial ATP synthase. *ELife*, 8, 1–17. <https://doi.org/10.7554/elife.43128>
- Gupta, R. S. (2000). The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 367–402. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00547.x>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8)
- Hansen, T. A., & Gemerden, H. (1972). Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria. *Archiv Fur Mikrobiologie*, 86(1), 49–56. <https://doi.org/10.1007/bf00412399>
- Hashimoto, T., Negawa, Y., & Tagawa, K. (1981). Binding of Intrinsic ATPase Inhibitor to Mitochondrial ATPase—Stoichiometry of Binding of Nucleotides, Inhibitor, and Enzyme. *The Journal of Biochemistry*, 90(4), 1151–1157. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133567>

- Hausrath, A. C., Capaldi, R. A., & Matthews, B. W. (2001). The Conformation of the ϵ - and γ -Subunits within the *Escherichia coli* F1 ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 47227–47232. <https://doi.org/10.1074/jbc.m107536200>
- Ichikawa, N., Ando, C., & Fumino, M. (2006). Caenorhabditis elegans MAI-1 protein, which is similar to mitochondrial ATPase inhibitor (IF1), can inhibit yeast F0F1-ATPase but cannot be transported to yeast mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 38(2), 93–99. <https://doi.org/10.1007/s10863-006-9009-2>
- Ichikawa, N., Chisuwa, N., Tanase, M., & Nakamura, M. (2005). Mitochondrial ATP Synthase Residue β Arginine-408, Which Interacts with the Inhibitory Site of Regulatory Protein IF1, Is Essential for the Function of the Enzyme. *The Journal of Biochemistry*, 138(2), 201–207. <https://doi.org/10.1093/jb/mvi116>
- Imam, S., Noguera, D. R., & Donohue, T. J. (2013). Global insights into energetic and metabolic networks in *Rhodobacter sphaeroides*. *BMC Systems Biology*, 7(1), 89. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-89>
- Imashimizu, M., Bernát, G., Sunamura, E.-I., Broekmans, M., Konno, H., Isato, K., Rögner, M., & Hisabori, T. (2011). Regulation of F0F1-ATPase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by γ and ϵ Subunits Is Significant for Light/Dark Adaptation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(30), 26595–26602. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.234138>
- Imhoff, J. F., Hiraishi, A., & Süling, J. (2005). Anoxygenic Phototrophic Purple Bacteria. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, 119–132. https://doi.org/10.1007/0-387-28021-9_15
- Ishihara, S., Kotomura, N., Yamamoto, N., & Ochiai, H. (2017). Ligation-mediated PCR with a back-to-back adapter reduces amplification bias resulting from variations in GC content. *Analytical Biochemistry*, 531, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.05.011>
- John, P., & Whatley, F. R. (1975). *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature*, 254(5500), 495–498. <https://doi.org/10.1038/254495a0>
- Johnson, E. A., & McCarty, R. E. (2002). The Carboxyl Terminus of the ϵ Subunit of the Chloroplast ATP Synthase Is Exposed during Illumination†. *Biochemistry*, 41(7), 2446–2451. <https://doi.org/10.1021/bi011939f>
- Johnston, A. W. B., Todd, J. D., Sun, L., Nikolaidou-Katsaridou, M. N., Curson, A. R. J., & Rogers, R. (2008). Molecular diversity of bacterial production of the climate-changing gas, dimethyl sulphide, a molecule that impinges on local and global symbioses. *Journal of Experimental Botany*, 59(5), 1059–1067. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm264>
- Joon, S., Ragunathan, P., Sundararaman, L., Nartey, W., Kundu, S., Manimekalai, M. S. S., Bogdanović, N. š., Dick, T., & Grüber, G. (2018). The NMR solution structure of

- Mycobacterium tuberculosis* F- ATP synthase subunit ϵ provides new insight into energy coupling inside the rotary engine. *The FEBS Journal*, 285(6), 1111–1128. <https://doi.org/10.1111/febs.14392>
- Jouanneau, Y., & Tabita, F. R. (1986). Independent regulation of synthesis of form I and form II ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, 165(2), 620–624. <https://doi.org/10.1128/jb.165.2.620-624.1986>
- Jounouchi, M., Takeyama, M., Noumi, T., Moriyama, Y., Maeda, M., & Futai, M. (1992). Role of the amino terminal region of the ϵ subunit of *Escherichia coli* H⁺-ATPase (FoF1). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 292(1), 87–94. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90054-z](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90054-z)
- Jurtshuk, P. (1996). Bacterial Metabolism. En Medical Microbiology (23 - 60). Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Kaim, G., Ludwig, W., Dimroth, P., & Schleifer, K. H. (1992). Cloning, sequencing and in vivo expression of genes encoding the Fo part of the sodium-ion-dependent ATP synthase of *Propionigenium modestum* in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 207(2), 463–470. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17072.x>
- Kaiser, I., & Oelze, J. (1980). Temperature dependence of membrane-bound enzymes of the energy metabolism in *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Archives of Microbiology*, 126(2), 195–200. <https://doi.org/10.1007/bf00511227>
- Kato-Yamada, Y., Yoshida, M., & Hisabori, T. (2000). Movement of the Helical Domain of the ϵ Subunit Is Required for the Activation of Thermophilic F1-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46), 35746–35750. <https://doi.org/10.1074/jbc.m006575200>
- Keis, S., Stocker, A., Dimroth, P., & Cook, G. M. (2006). Inhibition of ATP Hydrolysis by Thermoalkaliphilic F1Fo-ATP Synthase Is Controlled by the C Terminus of the ϵ Subunit. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 3796–3804. <https://doi.org/10.1128/jb.00040-06>
- Khakh, B. S., & Burnstock, G. (2009). The Double Life of ATP. *Scientific American*, 301(6), 84–92. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican1209-84>
- Kiley, P. J., & Kaplan, S. (1988). Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiological Reviews*, 52(1), 50–69. <https://doi.org/10.1128/mr.52.1.50-69.1988>
- Klemme, J. H. (1969). Studies on the Mechanism of NAD-photoreduction by Chromatophores of the Facultative Phototroph, *Rhodospseudomonas capsulata*. *Zeitschrift Für Naturforschung B*, 24(1), 67–76. <https://doi.org/10.1515/znB-1969-0117>

- Le Breton, N., Adrianaivomananjaona, T., Gerbaud, G., Etienne, E., Bisetto, E., Dautant, A., Guigliarelli, B., Haraux, F., Martinho, M., & Belle, V. (2015). Dimerization interface and dynamic properties of yeast IF1 revealed by Site-Directed Spin Labeling EPR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(1), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.10.010>
- Lino, R., Hasegawa, R., Tabata, K. V., & Noji, H. (2009). Mechanism of Inhibition by C-terminal α -Helices of the ϵ Subunit of *Escherichia coli* FoF1-ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(26), 17457–17464. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.003798>
- Leidenfrost, R. M., Wappler, N., & Wünschiers, R. (2020). Draft Genome Assembly of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 Substrain H2 from Nanopore Data. *Microbiology Resource Announcements*, 9(29), 1–3. <https://doi.org/10.1128/mra.00414-20>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Mackenzie, C., Eraso, J. M., Choudhary, M., Roh, J. H., Zeng, X., Bruscella, P., Puskás, Á., & Kaplan, S. (2007). Postgenomic Adventures with *Rhodobacter sphaeroides*. *Annual Review of Microbiology*, 61(1), 283–307. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093402>
- Madigan, M. T., & Jung, D. O. (2009). An Overview of Purple Bacteria: Systematics, Physiology, and Habitats. *The Purple Phototrophic Bacteria*, 1–15. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5_1
- Madigan, M., Cox, S. S., & Stegeman, R. A. (1984). Nitrogen fixation and nitrogenase activities in members of the family Rhodospirillaceae. *Journal of Bacteriology*, 157(1), 73–78. <https://doi.org/10.1128/jb.157.1.73-78.1984>
- Maldonado, E., Dreyfus, G., García, J. J., Gómez-Puyou, A., & de Gómez-Puyou, M. T. (1998). Unisite ATP hydrolysis by soluble *Rhodospirillum rubrum* F1-ATPase is accelerated by Ca²⁺. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1363(1), 70–78. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(97\)00083-2](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(97)00083-2)
- Malin, G., & Kirst, G. O. (1997). ALGAL PRODUCTION OF DIMETHYL SULFIDE AND ITS ATMOSPHERIC ROLE1. *Journal of Phycology*, 33(6), 889–896. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00889.x>
- Matsumura, I. (2015). Why Johnny can't clone: Common pitfalls and not so common solutions. *BioTechniques*, 59(3). <https://doi.org/10.2144/000114324>
- McDevitt, C. A., Hugenholtz, P., Hanson, G. R., & McEwan, A. G. (2002). Molecular analysis of dimethyl sulphide dehydrogenase from *Rhodovulum sulfidophilum*: its

- place in the dimethyl sulphoxide reductase family of microbial molybdopterin-containing enzymes. *Molecular Microbiology*, 44(6), 1575–1587. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02978.x>
- McEwan, A. G. (1994). Photosynthetic electron transport and anaerobic metabolism in purple non-sulfur phototrophic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66(1–3), 151–164. <https://doi.org/10.1007/bf00871637>
- McFarlane, C. R. y Murray, J. W. (2020). A Sensitive Coupled Enzyme Assay for Measuring Kinase and ATPase Kinetics Using ADP-Specific Hexokinase. *Bio-protocol* 10(9): e3599. DOI: 10.21769/BioProtoc.3599.
- Melandri, A. B., & Zannoni, D. (1978). Photosynthetic and respiratory electron flow in the dual functional membrane of facultative photosynthetic bacteria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 10(3–4), 109–138. <https://doi.org/10.1007/bf00743056>
- Mendoza-Hoffmann, F. (2018). Rol biológico de la subunidad ζ como un inhibidor unidireccional de la F_1F_0 -ATPasa de *Paracoccus denitrificans*. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM. Asesor: José J. García Trejo. UNAM. https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/75MFS4YLMH48F8CVGIRF1IHL8SN9VTM19VA3KM3JR8QT2DHKTI-25864?func=full-set-set&set_number=976289&set_entry=000001&format=999
- Mendoza-Hoffmann, F., Pérez-Oseguera, Á., Cevallos, M. Á., Zarco-Zavala, M., Ortega, R., Peña-Segura, C., Espinoza-Simón, E., Uribe-Carvajal, S., & García-Trejo, J. J. (2018). The Biological Role of the ζ Subunit as Unidirectional Inhibitor of the F_1F_0 -ATPase of *Paracoccus denitrificans*. *Cell Reports*, 22(4), 1067–1078. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.106>
- Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., & García, J. J. (2002). Cross-linking of the endogenous inhibitor protein (IF1) with rotor (gamma, epsilon) and stator (alpha) subunits of the mitochondrial ATP synthase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 34(6), 433–443. <https://doi.org/10.1023/a:1022514008462>
- Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S., & Garcia, J. J. (2005). Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: Novel F_0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(35), 12356–12358. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503893102>
- Mitchell, D. L., & Karentz, D. (1993). The Induction and Repair of DNA Photodamage in the Environment. *Environmental UV Photobiology*, 345–377. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2406-3_1

- Mitchell, P. (1961). Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature*, *191*(4784), 144–148. <https://doi.org/10.1038/191144a0>
- Montero-Lomelí, M., & Dreyfus, G. (1987). Activation of Mg-ATP hydrolysis in isolated *Rhodospirillum rubrum* H⁺-ATPase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *257*(2), 345–351. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(87\)90575-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90575-3)
- Morales-Ríos, E., De la Rosa-Morales, F., Mendoza-Hernández, G., Rodríguez-Zavala, J. S., Celis, H., Zarco-Zavala, M., & García-Trejo, J. J. (2010). A novel 11-kDa inhibitory subunit in the F₁F₀ ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related α -proteobacteria. *The FASEB Journal*, *24*(2), 599–608. <https://doi.org/10.1096/fj.09-137356>
- Morales-Rios, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (2015). Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(43), 13231–13236. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517542112>
- Mouncey, N. J., Gak, E., Choudhary, M., Oh, J.-I., & Kaplan, S. (2000). Respiratory pathways of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1T: identification and characterization of genes encoding quinol oxidases. *FEMS Microbiology Letters*, *192*(2), 205–210. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09383.x>
- Müller, H., Neufang, H., & Knobloch, K. (1982). Purification and Properties of the Coupling-Factor ATPases F₁ from *Rhodopseudomonas palustris* and *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *European Journal of Biochemistry*, *127*(3), 559–566. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06908.x>
- Munk, A. C., Copeland, A., Lucas, S., Lapidus, A., Del Rio, T. G., Barry, K., Detter, J. C., Hammon, N., Israni, S., Pitluck, S., Brettin, T., Bruce, D., Han, C., Tapia, R., Gilna, P., Schmutz, J., Larimer, F., Land, M., Kyrpides, N. C., . . . Schwartz, D. C. (2011). Complete genome sequence of *Rhodospirillum rubrum* type strain (S1T). *Standards in Genomic Sciences*, *4*(3), 293–302. <https://doi.org/10.4056/sigs.1804360>
- Nalin, C. M., & McCarty, R. E. (1984). Role of a disulfide bond in the gamma subunit in activation of the ATPase of chloroplast coupling factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, *259*(11), 7275–7280. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)39868-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)39868-x)
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry* (5th ed.). W. H. Freeman.
- Neupane, P., Bhujju, S., Thapa, N., & Bhattarai, H. K. (2019). ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition. *Biomolecular Concepts*, *10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1515/bmc-2019-0001>

- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., & Kinoshita, K. (1997). Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature*, 386(6622), 299–302. <https://doi.org/10.1038/386299a0>
- Noji, H., & Yoshida, M. (2001). The Rotary Machine in the Cell, ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1665–1668. <https://doi.org/10.1074/jbc.r000021200>
- Norling, B., Tourikas, C., Hamasur, B., & Glaser, E. (1990). Evidence for an endogenous ATPase inhibitor protein in plant mitochondria. Purification and characterization. *European Journal of Biochemistry*, 188(2), 247–252. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15396.x>
- Ohkubo, S., Iwasaki, H., & Hori, H. (1986). Evolutionary Relationship of Denitrifying Bacteria as Deduced from 5S rRNA Sequences. *The Journal of Biochemistry*, 100(5), 1261–1267. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a121832>
- Omote, H., Sambonmatsu, N., Saito, K., Sambongi, Y., Iwamoto-Kihara, A., Yanagida, T., Wada, Y., & Futai, M. (1999). The γ -subunit rotation and torque generation in F1-ATPase from wild-type or uncoupled mutant *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14), 7780–7784. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.7780>
- Ohta, S., Yohda, M., Ishizuka, M., Hirata, H., Hamamoto, T., Otawara-Hamamoto, Y., Matsuda, K., & Kagawa, Y. (1988). Sequence and over-expression of subunits of adenosine triphosphate synthase in thermophilic bacterium PS3. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 933(1), 141–155. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(88\)90064-3](https://doi.org/10.1016/0005-2728(88)90064-3)
- Pacheco-Moisés, F., García, J. J., Rodríguez-Zavala, J. S., & Moreno-Sánchez, R. (2000). Sulfite and membrane energization induce two different active states of the *Paracoccus denitrificans* FOF1-ATPase. *European Journal of Biochemistry*, 267(4), 993–1000. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01088.x>
- Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brèthes, D., di Rago, J.-P., & Velours, J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *The EMBO Journal*, 21(3), 221–230. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.221>
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2), 346–356. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4)
- Pfennig, N., & Truper, H. G. (1971). Type and Neotype Strains of the Species of Phototrophic Bacteria Maintained in Pure Culture. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 21(1), 19–24. <https://doi.org/10.1099/00207713-21-1-19>

- Pinke, G., Zhou, L., & Sazanov, L. A. (2020). Cryo-EM structure of the entire mammalian F-type ATP synthase. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(11), 1077–1085. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0503-8>
- Pullman, M. E., Penefsky, H. S., Datta, A., & Racker, E. (1960). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 233(11), 3322–3328. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(84\)90146-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(84)90146-2)
- Pullman, M. E., & Monroy, G. C. (1963). A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 238(11), 3762–3769. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)75338-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)75338-1)
- Richardson, D. J., King, G. F., Kelly, D. J., McEwan, A. G., Ferguson, S. J., & Jackson, J. B. (1988). The role of auxiliary oxidants in maintaining redox balance during phototrophic growth of *Rhodobacter capsulatus* on propionate or butyrate. *Archives of Microbiology*, 150(2), 131–137. <https://doi.org/10.1007/bf00425152>
- Richter, M. L. (2004). Gamma–epsilon Interactions Regulate the Chloroplast ATP Synthase. *Photosynthesis Research*, 79(3), 319–329. <https://doi.org/10.1023/b:pres.0000017157.08098.36>
- Richter, M. L., & McCarty, R. E. (1987). Energy-dependent changes in the conformation of the epsilon subunit of the chloroplast ATP synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 262(31), 15037–15040. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)48134-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48134-3)
- Richter, M. L., Patrie, W. J., & McCarty, R. E. (1984). Preparation of the epsilon subunit and epsilon subunit-deficient chloroplast coupling factor 1 in reconstitutively active forms. *Journal of Biological Chemistry*, 259(12), 7371–7373. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)42797-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)42797-9)
- Romero Álvarez, I. (1982). Sobre la posible existencia del inhibidor natural de la H⁺ ATPasa de la bacteria *Rhodospirillum rubrum*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. Asesor: Helidoro Celis Sandoval. UNAM. https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/4F5YUK4K9KXR4MC8P9I5IVPKNLCQ3RXD9ATTS3E1NJ1UBMDSXM-17243?func=full-set-set&set_number=310315&set_entry=000002&format=999
- Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Dao-shan, C., Lin, S. W., Dunn, J. J., & Studier, F. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, 56(1), 125–135. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90165-x](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90165-x)
- Schafer, H., Myronova, N., & Boden, R. (2009). Microbial degradation of dimethylsulphide and related C1-sulphur compounds: organisms and pathways controlling fluxes of sulphur in the biosphere. *Journal of Experimental Botany*, 61(2), 315–334. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp355>

- Schägger, H. (2002). Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1555(1–3), 154–159. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(02\)00271-2](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(02)00271-2)
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368–379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Scheuring, S., Nevo, R., Liu, L.-N., Mangenot, S., Charuvi, D., Boudier, T., Prima, V., Hubert, P., Sturgis, J. N., & Reich, Z. (2014). The architecture of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(8), 1263–1270. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.03.011>
- Schnizer, R., Van Heeke, G., Amaturio, D., & Schuster, S. M. (1996). Histidine-49 is necessary for the pH-dependent transition between active and inactive states of the bovine F1-ATPase inhibitor protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1292(2), 241–248. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(95\)00208-1](https://doi.org/10.1016/0167-4838(95)00208-1)
- Schultz, J. E., & Weaver, P. F. (1982). Fermentation and Anaerobic Respiration by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*. *Journal of Bacteriology*, 149(1), 181–190. <https://doi.org/10.1128/jb.149.1.181-190.1982>
- Schwerzmann, K., & Pedersen, P. L. (1986). Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 250(1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(86\)90695-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90695-8)
- Senior, A. E., Nadanaciva, S., & Weber, J. (2002). The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1553(3), 188–211. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(02\)00185-8](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(02)00185-8)
- Serrano, P., Geralt, M., Mohanty, B., & Wüthrich, K. (2014). NMR Structures of α -Proteobacterial ATPase-Regulating ζ -Subunits. *Journal of Molecular Biology*, 426(14), 2547–2553. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.05.004>
- Siefert, E., Irgens, R. L., & Pfennig, N. (1978). Phototrophic purple and green bacteria in a sewage treatment plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(1), 38–44. <https://doi.org/10.1128/aem.35.1.38-44.1978>
- Silva, F., Queiroz, J. A., & Domingues, F. C. (2012). Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, 30(3), 691–708. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.12.005>
- Smith, M. A., & Bidochka, M. J. (1998). Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(4), 351–355. <https://doi.org/10.1139/w98-020>

- Smith, R. D., Anderson, G. A., Lipton, M. S., Pasa-Tolic, L., Shen, Y., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., & Udseth, H. R. (2002). An accurate mass tag strategy for quantitative and high-throughput proteome measurements. *PROTEOMICS*, 2(5), 513–523. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200205\)2:5](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200205)2:5)
- Sojka, G. A. (1978) Metabolism of nonaromatic organic compounds. In: Clayton RK and Sistrostom WR (eds) *The Photosynthetic Bacteria*, pp 707–718. *Plenum Press*, New York.
- Spannagel, C., Vaillier, J., Arselin, G., Graves, P.-V., & Velours, J. (1997). The Subunit F of Mitochondrial Yeast ATP Synthase. Characterization of the Protein and Disruption of the Structural Gene ATP17. *European Journal of Biochemistry*, 247(3), 1111–1117. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.01111.x>
- Spikes, T. E., Montgomery, M. G., & Walker, J. E. (2020). Structure of the dimeric ATP synthase from bovine mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(38), 23519–23526. <https://doi.org/10.1073/pnas.2013998117>
- Sternweis, 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. <https://doi.org/10.1021/bi00544a021>
- Stocker, A., Keis, S., Vonck, J., Cook, G. M., & Dimroth, P. (2007). The Structural Basis for Unidirectional Rotation of Thermoalkaliphilic F1-ATPase. *Structure*, 15(8), 904–914. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.06.009>
- Studier, F., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Suzuki, H., Yonekura, K., & Namba, K. (2004). Structure of the Rotor of the Bacterial Flagellar Motor Revealed by Electron Cryomicroscopy and Single-particle Image Analysis. *Journal of Molecular Biology*, 337(1), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.01.034>
- Suzuki, T., Murakami, T., Iino, R., Suzuki, J., Ono, S., Shirakihara, Y., & Yoshida, M. (2003). FOF1-ATPase/Synthase Is Geared to the Synthesis Mode by Conformational Rearrangement of ϵ Subunit in Response to Proton Motive Force and ADP/ATP Balance. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46840–46846. <https://doi.org/10.1074/jbc.m307165200>
- Tabita, F. R. (1988). Molecular and cellular regulation of autotrophic carbon dioxide fixation in microorganisms. *Microbiological Reviews*, 52(2), 155–189. <https://doi.org/10.1128/mr.52.2.155-189.1988>

- Tabor, S., & Richardson, C. C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(4), 1074–1078. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.4.1074>
- Thomas, D. R., Francis, N. R., Xu, C., & DeRosier, D. J. (2006). The Three-Dimensional Structure of the Flagellar Rotor from a Clockwise-Locked Mutant of *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 188(20), 7039–7048. <https://doi.org/10.1128/jb.00552-06>
- Tsunoda, S. P., Rodgers, A. J. W., Aggeler, R., Wilce, M. C. J., Yoshida, M., & Capaldi, R. A. (2001). Large conformational changes of the subunit in the bacterial F1F0 ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6560–6564. <https://doi.org/10.1073/pnas.111128098>
- Tucker, J. D., Siebert, C. A., Escalante, M., Adams, P. G., Olsen, J. D., Otto, C., Stokes, D. L., & Hunter, C. N. (2010). Membrane invagination in *Rhodobacter sphaeroides* is initiated at curved regions of the cytoplasmic membrane, then forms both budded and fully detached spherical vesicles. *Molecular Microbiology*, 76(4), 833–847. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07153.x>
- Tuena de Gómez-Puyou, M. T., 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. *Journal of Biological Chemistry*, 258(22), 13680–13684. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)43970-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)43970-6)
- Ugurbil, K., Rottenberg, H., Glynn, P., & Shulman, R. G. (1978). ³¹P nuclear magnetic resonance studies of bioenergetics and glycolysis in anaerobic *Escherichia coli* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(5), 2244–2248. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.5.2244>
- Ungerer, J., Lin, P. C., Chen, H. Y., & Pakrasi, H. B. (2018). Adjustments to Photosystem Stoichiometry and Electron Transfer Proteins Are Key to the Remarkably Fast Growth of the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *MBio*, 9(1). <https://doi.org/10.1128/mbio.02327-17>
- Van Alstyne, K. L., & Puglisi, M. P. (2007). DMSP in marine macroalgae and macroinvertebrates: Distribution, function, and ecological impacts. *Aquatic Sciences*, 69(3), 394–402. <https://doi.org/10.1007/s00027-007-0888-z>
- Van Niel, C. B. (1944). THE CULTURE, GENERAL PHYSIOLOGY, MORPHOLOGY, AND CLASSIFICATION OF THE NON-SULFUR PURPLE AND BROWN BACTERIA. *Bacteriological Reviews*, 8(1), 1–118. <https://doi.org/10.1128/br.8.1.1-118.1944>

- Van Raaij, M. J., Orriss, G. L., Montgomery, M. G., Runswick, M. J., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., & Walker, J. E. (1996). The ATPase Inhibitor Protein from Bovine Heart Mitochondria: The Minimal Inhibitory Sequence†. *Biochemistry*, 35(49), 15618–15625. <https://doi.org/10.1021/bi960628f>
- Vázquez-Laslop, N., & Dreyfus, G. (1986). Mitochondrial H⁺-ATPase activation by an amine oxide detergent. *Journal of Biological Chemistry*, 261(17), 7807–7810. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)57472-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)57472-5)
- Verméglio, A., & Joliot, P. (1999). The photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. *Trends in Microbiology*, 7(11), 435–440. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(99\)01625-x](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(99)01625-x)
- Vignais, P. M., Colbeau, A., Willison, J. C., & Jouanneau, Y. (1985). Hydrogenase, Nitrogenase, and Hydrogen Metabolism in the Photosynthetic Bacteria. *Advances in Microbial Physiology* Volume 26, 155–234. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60397-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60397-5)
- Vogt, C., Rabenstein, A., Rethmeier, J., & Fischer, U. (1997). Dimethyl sulphoxide reduction with reduced sulphur compounds as electron donors by anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiology*, 143(3), 767–773. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-3-767>
- Walker, J. E. (1994). The regulation of catalysis in ATP synthase. *Current Opinion in Structural Biology*, 4(6), 912–918. [https://doi.org/10.1016/0959-440x\(94\)90274-7](https://doi.org/10.1016/0959-440x(94)90274-7)
- Walker, J. E., & Dickson, V. K. (2006). The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(5–6), 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.01.001>
- Watts, S. F. (2000). The mass budgets of carbonyl sulfide, dimethyl sulfide, carbon disulfide and hydrogen sulfide. *Atmospheric Environment*, 34(5), 761–779. [https://doi.org/10.1016/s1352-2310\(99\)00342-8](https://doi.org/10.1016/s1352-2310(99)00342-8)
- Wilce, M. C. J., & Rodgers, A. J. W. (2000). Structure of the gamma-epsilon complex of ATP synthase. *Nature Structural Biology*, 7(11), 1051–1054. <https://doi.org/10.1038/80975>
- Wilkens, S., & Capaldi, R. A. (1998). Solution Structure of the ε Subunit of the F₁-ATPase from *Escherichia coli* and Interactions of This Subunit with β Subunits in the Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 273(41), 26645–26651. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.41.26645>
- Wilkens, S., Dahlquist, F. W., McIntosh, L. P., Donaldson, L. W., & Capaldi, R. A. (1995). Structural features of the ε subunit of the *Escherichia coli* ATP synthase determined by NMR spectroscopy. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2(11), 961–967. <https://doi.org/10.1038/nsb1195-961>

- Wu, H., Gao, K., Villafaña, V. E., Watanabe, T., & Helbling, E. W. (2005). Effects of Solar UV Radiation on Morphology and Photosynthesis of Filamentous Cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5004–5013. <https://doi.org/10.1128/aem.71.9.5004-5013.2005>
- Xu, G., Shin, S. B. Y., & Jaffrey, S. R. (2009). Global profiling of protease cleavage sites by chemoselective labeling of protein N-termini. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(46), 19310–19315. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908958106>
- Yagi, H., Kajiwara, N., Tanaka, H., Tsukihara, T., Kato-Yamada, Y., Yoshida, M., & Akutsu, H. (2007). Structures of the thermophilic F₁-ATPase subunit suggesting ATP-regulated arm motion of its C-terminal domain in F₁. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), 11233–11238. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701045104>
- Yoshida, M., Muneyuki, E., & Hisabori, T. (2001). ATP synthase — a marvellous rotary engine of the cell. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(9), 669–677. <https://doi.org/10.1038/35089509>
- You, Y. H. (2000). Cyclobutane pyrimidine dimers form preferentially at the major p53 mutational hotspot in UVB-induced mouse skin tumors. *Carcinogenesis*, 21(11), 2113–2117. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.11.2113>
- Zarco-Zavala, M. (2014). Caracterización del nuevo mecanismo de control de la F₁F₀ ATPasa de la alfa - proteobacteria *Paracoccus denitrificans* mediado por la subunidad zeta. Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Química, UNAM. Asesor: José J. García Trejo. UNAM. https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/75MFS4YLMH48F8CVGIRF1IHL8SN9VTM19VA3KM3JR8QT2DHKTI-18922?func=full-set-set&set_number=976205&set_entry=000002&format=999
- Zarco-Zavala, M., Morales-Ríos, E., Mendoza-Hernández, G., Ramírez-Silva, L., Pérez-Hernández, G., & García-Trejo, J. J. (2014). The ζ subunit of the F₁F₀-ATP synthase of α -proteobacteria controls rotation of the nanomotor with a different structure. *The FASEB Journal*, 28(5), 2146–2157. <https://doi.org/10.1096/fj.13-241430>
- Zarco-Zavala, M., Morales-Ríos, E., Serrano-Navarro, P., Wüthrich, K., Mendoza-Hernández, G., Ramírez-Silva, L., & García-Trejo, J. J. (2013). Corrigendum to “The ζ subunit of the α -proteobacterial F₁F₀-ATP synthase in *Paracoccus denitrificans*: A novel control mechanism of the central rotor” [Biochim. Biophys. Acta 1817S (2012) S27–S28]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(1), 60. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.09.010>
- Zeilstra-Ryalls J, Gomelsky M, Eraso JM, Yeliseev A, O’Gara J, Kaplan S. Control of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* 1998;180:2801–2809.

- Zeng, X., Roh, J. H., Callister, S. J., Tavano, C. L., Donohue, T. J., Lipton, M. S., & Kaplan, S. (2007). Proteomic Characterization of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 Photosynthetic Membrane: Identification of New Proteins. *Journal of Bacteriology*, 189(20), 7464–7474. <https://doi.org/10.1128/jb.00946-07>
- Zhang, L., Kuniyoshi, I., Hirai, M., & Shoda, M. (1991). Oxidation of dimethyl sulfide by *Pseudomonas acidovorans* DMR-11 isolated from peat biofilter. *Biotechnology Letters*, 13(3), 223–228. <https://doi.org/10.1007/bf01025822>
- Zhu, L., Nicovich, J. M., & Wine, P. H. (2003). Temperature-dependent kinetics studies of aqueous phase reactions of hydroxyl radicals with dimethylsulfoxide, dimethylsulfone, and methanesulfonate. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries*, 65(4), 425–435. <https://doi.org/10.1007/s00027-003-0673-6>
- Zhu, Q., Mai, U., Pfeiffer, W., Janssen, S., Asnicar, F., Sanders, J. G., Belda-Ferre, P., Al-Ghalith, G. A., Kopylova, E., McDonald, D., Kosciolk, T., Yin, J. B., Huang, S., Salam, N., Jiao, J. Y., Wu, Z., Xu, Z. Z., Cantrell, K., Yang, Y., . . . Knight, R. (2019). Phylogenomics of 10,575 genomes reveals evolutionary proximity between domains Bacteria and Archaea. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13443-4>