



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ACTUALIZACIÓN DEL ALINEAMIENTO Y COMPARACIÓN DE
LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA SUBUNIDAD ZETA (ζ)
COMO INHIBIDOR DE LA F_1F_0 -ATPASA DE LAS α -
PROTEOBACTERIAS**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ERICK ENRIQUE HERRERA ROMO

CIUDAD UNIVERSITARIA, UNAM, CDMX



CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE, 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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. GAVILANES RUIZ MARINA

VOCAL: Mtra. MARTÍN FUENTES RUTH EDITH

SECRETARIO: Dr. GARCÍA TREJO JOSÉ DE JESÚS

1^{ER} SUPLENTE: Dr. HERNÁNDEZ PÉREZ HUGO ANTONIO

2^{DO} SUPLENTE: Dr. PEDRAZA CHAVERRI JOSÉ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LAB. 203, EDIFICIO F, 1ER PISO,
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA. FACULTAD DE QUÍMICA**

ASESOR DEL TEMA: DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO

SUSTENTANTE: ERICK ENRIQUE HERRERA ROMO

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
LISTA DE FIGURAS.....	8
OBJETIVOS.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
El ATP como molécula energética.....	11
La fosforilación oxidativa: cadena de transporte de electrones y síntesis de ATP.....	13
Aparición y evolución de la síntesis de ATP.....	19
Clasificación de las ATPasas.....	22
Funciones de las subunidades de la ATP sintasa.....	27
Factor de inhibición 1 como inhibidor endógeno de la ATPasa mitocondrial.....	35
La subunidad ζ como inhibidor de la F_1F_0 -ATPasa de <i>Paracoccus denitrificans</i> y demás α -proteobacterias.....	44
Generalidades sobre la α -proteobacteria <i>Paracoccus denitrificans</i>	49
Análisis bioinformático de la subunidad ζ de <i>Paracoccus denitrificans</i>	59
CONCLUSIONES.....	87
BIBLIOGRAFÍA.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
Å	Ångstrom
A	Alanina (aminoácido hidrófobo y ligero)
aa	Aminoácidos
A-ATPasas	ATPasas propias de las arqueas
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ADNe	ADN disperso en el medio extracelular
ADP	Adenosín-difosfato/Difosfato de adenosina
ALP	Fosfatasa alcalina
AMPc	Adenosín-Monofosfato cíclico
ANT	Transportador de Nucleótidos de Adenina
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
ATP	Adenosín-trifosfato/Trifosfato de adenosina
BapA	Proteína Asociada a Biopelícula A
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta básica de búsqueda de alineamiento local)
bp	Base pairs (pares de bases)
C	Cisteína (aminoácido ligero, hidrófobo y polar)
c-di-GMP	Monofosfato de Diguanosina cíclico
Ca ⁺²	Calcio 2+
CD	Circular Dichroism (Dicroísmo Circular)
Co ⁺²	Cobalto 2+
CO ₂	Dióxido de carbono
CyPD	Ciclofilina D
D	Ácido aspártico (aminoácido cargado negativamente)
DNA-Polimerasa	Enzima encargada de sintetizar ADN
DELSEED	Secuencia de aminoácidos ácidos altamente conservados involucrada en

	el mecanismo de torción de la subunidad β
DUF	Domain of Unknown Function (Dominio de Función Desconocida)
E	Ácido glutámico (aminoácido cargado negativamente)
E-ATPasas	Ecto-ATPasas
ERAHL	Entrance, Rotation, α -Helix formation & Lock
EPS	Exopolisacáridos
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
ETF-UQ	Flavoproteín-Ubiquinona de Transferencia de Electrones
F	Fenilalanina (aminoácido aromático e hidrófobo)
F-ATPasas	Enzima compuesta por 8 subunidades localizada en mitocondrias y cloroplastos eucariontes
F ₀	Dominio de la ATP sintasa compuesto por ocho subunidades y un anillo transmembranal
F ₁	Dominio de la ATP sintasa compuesto por seis subunidades y encargado de hidrolizar al ATP
F ₁ F ₀	Unión de los dominios F ₁ y F ₀ de la ATP sintasa
FAD	Flavín-adenín-dinucleótido en su forma oxidada
FADH ₂	Flavín-adenín-dinucleótido en su forma reducida
Fe ⁺²	Hierro 2+
Fe ⁺³	Hierro 3+
FMN	Flavín-mononucleótido
G	Glicina (aminoácido ligero e hidrófobo)
GMPc	Guanosín-Monofosfato cíclico
GNS	Green Non Sulphur (Bacterias verdes no del azufre)
GTA	Gene Transfer Agent (Agente de Transferencia de Genes)
H	Histidina (aminoácido aromático, hidrófobo y cargado positivamente)
H ₂ O	Molécula de agua
H ₃ O ⁺	Ión hidronio (protón asociado a una molécula de agua)
H ⁺	Protón (ión hidrógeno)
HCCS	Holo Citocromo c Sintetas
H-NOX	Heme-Nitric oxide/Oxygen binding (Unión de hemo-óxido nítrico/oxígeno)

I	Isoleucina (aminoácido hidrófobo y alifático)
IDPr	Región intrínsecamente desarrollada
IEX-1	Immediate Early response X-1 (Respuesta inmediata temprana X1)
IF ₁	Factor Inhibidor de la hidrólisis del ATP
K	Lisina (aminoácido cargado positivamente)
K ⁺	Potasio 1+
kDa	Kilodaltones
L	Leucina (aminoácido alifático e hidrófobo)
LRPPRC	Proteína que contiene motivos PPR ricos en leucina
M	Metionina (aminoácido hidrófobo que es el primer aminoácido en cualquier cadena de polipéptidos al estar codificado por el codón de inicio AUG)
MgATP	ATP asociado a cofactor magnesio, es la verdadera forma en la que se encuentra esta molécula
Mg ⁺²	Magnesio 2+
Mn ⁺²	Manganeso 2+
N	Asparagina (aminoácido pequeño y polar)
N ₂	Nitrógeno atmosférico
Na ⁺	Sodio 1+
NAD ⁺	Nicotinamida-adenina-dinucleótido oxidada
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido reducida
N-ATPasas	Neo-ATPasas
NH ₃	Amoniaco
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxígeno molecular
ORF	Open Reading Frame (marco abierto de lectura)
OSCP	Oligomycin Sensitivity Conferral Protein (Proteína que confiere sensibilidad a oligomicina)
OSR	Respiración Sensible a Oligomicina
OXPHOS	OXidative PHOSphorilation (Fosforilación Oxidativa)
P	Prolina (aminoácido pequeño)
P-ATPasas	ATPasas reguladas por fósforo

PDB	Protein Data Bank (Banco de Datos de Proteínas)
PDE	Fosfodiesterasas
PdF ₁	Fracción purificada del dominio F ₁ de la ATP sintasa de <i>Paracoccus denitrificans</i>
PdF ₁ F ₀	Fracción purificada del complejo F ₁ F ₀ de la ATP sintasa de <i>Paracoccus denitrificans</i>
Pi	Fosfato inorgánico
PK	Piruvato Cinasa
PKA	Proteína Cinasa A
PQQ	Pirroloquinolin-Quinona
PTP	Poro de Transición de Permeabilidad Mitocondrial
Q	Glutamina (aminoácido polar)
Q*	Ubiquinona en su forma basal
QH ₂	Ubiquinona en su forma reducida (ubiquinol)
QS	Quórum Sensing
R	Arginina (aminoácido cargado positivamente)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
S	Serina (aminoácido polar y ligero)
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico)
T	Treonina (aminoácido pequeño y polar)
TCA	Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (ciclo de Krebs)
UV	Ultravioleta
V	Valina (aminoácido hidrófobo, alifático y ligero)
V*	Voltios (unidad de energía del potencial eléctrico)
V-ATPasas	ATP-atasas vacuolares
W	Triptófano (aminoácido aromático, polar e hidrófobo)
Y	Tirosina (aminoácido aromático, polar e hidrófobo)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO
1.	Molécula de ATP
2.	La fosforilación oxidativa en mitocondrias
3.	La fosforilación oxidativa en procariontes
4.	Estructura de la ATP sintasa de <i>Bacillus</i> PS3
5.	La evolución de los mecanismos de fosforilación oxidativa
6.	Comparación de los tres tipos de ATPasas rotacionales
7.	Modelo del ensamblaje de la ATP sintasa de <i>E.coli</i>
8.	Entrada y unión inhibitoria del IF ₁ mitocondrial en la F ₁ -ATPasa mitocondrial
9.	Regulación postranscripcional de la expresión y actividad del IF ₁
10.	La activación de PKA resulta en la fosforilación del IF ₁ presente en tejido
11.	La subunidad ζ es un inhibidor total de la PdF ₁ -ATPasa y su N-terminal posee el dominio inhibitorio
12.	Células de <i>P. denitrificans</i> tras ser incubadas en hiperaceleración
13.	La formación de biopelículas en <i>Paracoccus denitrificans</i>
14.	Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la subunidad ζ de diferentes especies del género <i>Paracoccus</i> . La comparación de secuencias se hizo por BLAST y se muestran en orden descendente del porcentaje de identidad en función de su valor E, tomando como referencia la secuencia reportada para <i>Paracoccus denitrificans</i> Pd1222 (resultados 1 – 14)
15.	Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la subunidad ζ de diferentes especies del género <i>Paracoccus</i> . La comparación de secuencias se hizo por BLAST y se muestran en orden descendente del porcentaje de identidad en función de su valor E, tomando como referencia la secuencia reportada para <i>Paracoccus denitrificans</i> Pd1222 (resultados 15 – 30)
16.	Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la subunidad ζ de diferentes especies del género <i>Paracoccus</i> . La comparación de secuencias se hizo por BLAST y se muestran en orden descendente del porcentaje de identidad en función de su valor E, tomando como referencia la secuencia reportada para <i>Paracoccus denitrificans</i> Pd1222 (resultados 31 – 46).

17. Cladograma de la secuencia de genes de Pd- ζ en α -proteobacterias
18. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la subunidad ζ de diferentes especies del género *Paracoccus*. La comparación de secuencias se hizo por BLAST y se muestran en orden descendente del porcentaje de identidad en función de su valor E, tomando como referencia la secuencia reportada para *Paracoccus denitrificans* Pd1222 (últimos resultados)
19. Alineamiento de cien secuencias representativas del género *Paracoccus* contra la secuencia de referencia *Paracoccus denitrificans* Pd1222, residuos 1 – 21
20. Alineamiento de cien secuencias representativas del género *Paracoccus* contra la secuencia de referencia *Paracoccus denitrificans* Pd1222, residuos 21 – 41
21. Alineamiento de cien secuencias representativas del género *Paracoccus* contra la secuencia de referencia *Paracoccus denitrificans* Pd1222, residuos 41 – 61
22. Alineamiento de cien secuencias representativas del género *Paracoccus* contra la secuencia de referencia *Paracoccus denitrificans* Pd1222, residuos 61 – 81
23. Alineamiento de cien secuencias representativas del género *Paracoccus* contra la secuencia de referencia *Paracoccus denitrificans* Pd1222, residuos 82 – 104
24. La evolución de la subunidad ζ de la ATP sintasa en α -proteobacterias
25. Estructuras de los inhibidores proteicos de la F₁-ATPasa y sus dominios inhibitorios
26. Primer árbol filogenético de las secuencias contra las cuales fue contrastada la secuencia de referencia de Pd1222
27. Segundo árbol filogenético de las secuencias contra las cuales fue contrastada la secuencia de referencia de Pd1222
28. La secuencia de la subunidad ζ en diversas especies de α -proteobacterias de la familia Rhodobacteraceae (residuos 1 – 30)
29. La secuencia de la subunidad ζ en diversas especies de α -proteobacterias de la familia Rhodobacteraceae (residuos 31 – 70)
30. La secuencia de la subunidad ζ en diversas especies de α -proteobacterias de la familia Rhodobacteraceae (residuos 71 – 104)
31. Conservación y variación de la subunidad ζ como inhibidor de la F₁F₀-ATPasa de las α -proteobacterias mostrada en la estructura soluble de la subunidad ζ de *Paracoccus denitrificans*.

OBJETIVO GENERAL

Actualizar los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las subunidades ζ de la ATP sintasa de diferentes bacterias tomando como base la secuencia reportada para la α -proteobacteria *Paracoccus denitrificans*

OBJETIVOS PARTICULARES

Definir puntualmente la función de cada una de las subunidades que conforman a la ATP sintasa en células eucariontes y procariontes.

Describir el mecanismo de inhibición que la subunidad ζ ejerce sobre la actividad de la ATP sintasa bacteriana, específicamente la de *Paracoccus denitrificans*.

Usar la secuencia de aminoácidos de la subunidad ζ de la ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans* como referencia para compararla con las reportadas en otras especies de α -proteobacterias.

INTRODUCCIÓN

La existencia de cualquier forma de vida depende intrínsecamente de la cantidad de energía que tenga disponible para llevar a cabo sus funciones vitales, siendo autótrofos si generan su propia energía (como las plantas al hacer fotosíntesis) o heterótrofos si la obtienen al consumir otros seres vivos. Es en este sentido que la generación de energía a nivel interno de un organismo es uno de los procesos más importantes para el buen funcionamiento del mismo. Además de la glucólisis o la fermentación, la manera por la cual los seres vivos obtienen la mayoría de su energía es por medio de la fosforilación oxidativa o fotofosforilación. Fue Mitchell en 1961 quien propuso en su Teoría Quimiosmótica que la difusión de iones (más específicamente un gradiente de protones) a través de la membrana interna mitocondrial y la membrana de los tilacoides de los cloroplastos, podría proveer la energía para sintetizar ATP. Debido a esto sería galardonado con el premio Nobel de Química en 1978 (Mitchell, 1961). No obstante, el mecanismo central de estos procesos fue durante mucho tiempo un misterio para la Bioquímica hasta que en 1997 finalmente fue dilucidado el mecanismo de la síntesis del ATP (Gresser et al, 1982; Boyer, 1997). El Dr. Paul D. Boyer fue quien propuso el mecanismo rotacional de catálisis de la ATP sintasa denominándolo de “cambio de unión” o de “sitios alternantes”, mientras que John Walker aportó la evidencia estructural (Abrahams, 1994) que apoyó, mas no comprobó, la hipótesis de los ciclos alternantes de Boyer.

El ATP como molécula energética

Algo que todas las células de todos los seres vivos conocidos tienen en común es que absolutamente todas utilizan al adenosín-trifostato, mejor conocido como ATP, como fuente de energía para realizar sus funciones, desde proveer energía para la síntesis de metabolitos, hasta suministrar energía para la replicación (Dunn & Grider, 2020). Tal como se muestra en la **Figura 1**, una molécula de ATP está constituida por la unión de una base nitrogenada (adenina), un azúcar de cinco carbonos (ribosa) y tres grupos fosfato denominados α , β y γ , en orden del más cercano al más lejano con respecto a la ribosa. A la unión de adenina y ribosa se le conoce como adenosina. Los enlaces

fosfoanhídrido del ATP constituyen la fuente de energía de la célula, siempre y cuando se acumule suficiente concentración de ATP intracelular (respecto a las de ADP y Pi) para que su hidrólisis pueda proveer de energía a las células; no obstante, no todos los enlaces que unen a los fosfatos (enlaces de fosfoanhídrido) proporcionan la misma cantidad de energía al hidrolizarse. En la célula, hay gran diferencia de concentración entre el ATP y el ADP (y el fosfato inorgánico Pi), superando el ATP unas 3000 veces la del ADP y el Pi. Desde que en 1929 se descubrió que el ATP es el sustrato para la contracción muscular, el conocimiento que se posee sobre esta molécula se ha expandido considerablemente. Ahora se sabe que el ATP sirve para mantener procesos dependientes de energía tales como la síntesis de macromoléculas, transporte de iones, etc. Esto ocurre debido a procesos de oxidación de “combustibles metabólicos” tales como carbohidratos, lípidos y proteínas. Estos procesos de oxidación culminan con la producción de energía libre que se almacena en enlaces de alta energía de fosfoanhídrido en moléculas como el ADP, el ATP, fosfoenolpiruvato, 2,3-bisfosfoglicerato y otros fosfágenos como la fosfoarginina y la fosfocreatinina (Bonora et al, 2012).

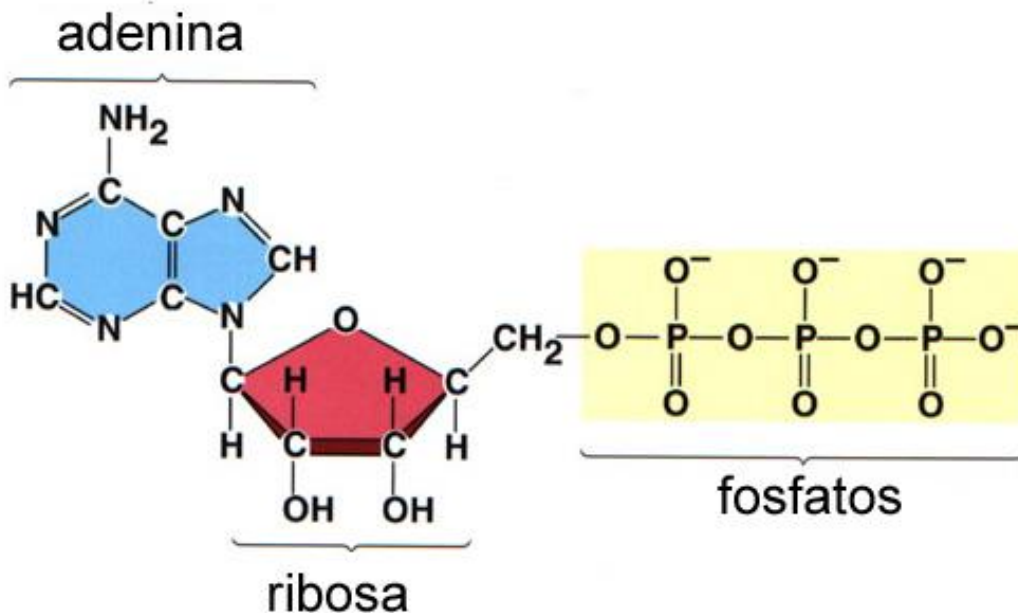


Figura 1. Molécula de ATP. Dreyfus, G. "La ATP sintasa, un viejo amor del doctor Gómez Puyou" Revista Digital Universitaria [en línea]. 1 de enero de 2015, Vol. 16, No.1 [Consultada: viernes 9 de abril de 2021]. Disponible en Internet: <<http://www.revista.unam.mx/vol.16/num1/art03/index.html>> ISSN: 1607-6079.

La energía libre de hidrólisis de los enlaces de fosfoanhídrido equivale a -30 kJ/mol, y es incluso mayor que la de los enlaces tipo éster entre la adenosina y el ácido fosfórico, con -15 kJ/mol. La energía almacenada en los enlaces de fosfoanhídridos es liberada mediante hidrólisis por enzimas conocidas como ATPasas. Una vez roto el enlace, la energía se libera y puede ser aprovechada por la célula, mientras que una fracción se disipa en forma de calor. Es necesario el consumo de una enorme cantidad de ATP para mantener funcionales los ciclos vitales de la célula (Müller y Schröder, 2019).

La fosforilación oxidativa: cadena de transporte de electrones y síntesis de ATP

Cada tipo de célula tiene sus propias vías metabólicas para producir energía, dependiendo si se trata de una célula eucarionte o procarionte, aerobia, facultativa, microaerófila, aerotolerante o anaerobia estricta. En general los organismos eucariontes obtienen su energía mediante la producción de ATP en las mitocondrias en un proceso conocido como el ciclo de Krebs, el cual por sí mismo no requiere de oxígeno, sino que este elemento es necesario para el último paso de la respiración celular aeróbica; la fosforilación oxidativa, pues el oxígeno es el aceptor final de electrones en la cadena respiratoria. En la matriz mitocondrial se encuentran todas las enzimas necesarias para llevar a cabo todas las reacciones bioquímicas del ciclo, así como coenzimas y fosfatos. El ciclo de Krebs está regulado por la disponibilidad de los sustratos NAD⁺ y FAD, mientras que altas concentraciones de NADH lo inhiben (Alabduladhem & Bordoni, 2021). Curiosamente, los únicos organismos eucariontes que carecen completamente de mitocondrias son los miembros del género *Monocercomonoides* y el parásito del salmón *Hanneguya salminicola* (también conocido como *Hanneguya zschokkei*). Este último no solo carece de mitocondrias sino que carece de un genoma mitocondrial. Se desconoce aún cómo obtiene energía, ya que tampoco respira consumiendo oxígeno (Karnkowska et al, 2016; Yahalomi et al, 2020).

Para comparar las similitudes y diferencias entre la fosforilación oxidativa eucarionte y procarionte se procederá a describir ambas. En eucariontes, la fosforilación oxidativa es un proceso en el cual se transforma y se aprovecha la energía al transferirse electrones de una molécula a otra y por lo general usando una molécula de O₂ como aceptor final de dichos electrones; este desplazamiento de electrones involucra una serie de

reacciones redox cuyo fin es generar una fuerza protón-motriz para sintetizar ATP al final del proceso. Los electrones suelen ser provistos por la oxidación de sustratos energéticos en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) o ciclo de Krebs. El flujo neto de oxígeno está determinado por la demanda de ATP, aunque se ve limitada por la cantidad de oxígeno disponible.

Se estima que en mitocondrias de levadura, se forman 3 moléculas de ATP por cada 10 protones que ingresan a la ATP sintasa, mientras que en mitocondrias humanas serían 3 ATP por cada 8 subunidades *c* para dar una estequiometría H^+/ATP de 2.66, eso implica que el ser humano debe sintetizar aproximadamente su mismo peso en forma de ATP diariamente para mantener sus funciones vitales (Rich, 2003). La mitocondria cuenta con una cadena respiratoria conformada por cinco complejos multiproteicos (I, II, III, IV y V o ATP sintasa) y dos transportadores móviles de electrones (citocromos *c* y ubiquinona o coenzima Q) **Figura 2**. Es el flujo de electrones lo que conecta la oxidación con la fosforilación y, a mayor potencial de membrana, más energía recibe la ATP sintasa. Cada componente de la cadena de transporte puede aceptar electrones del transportador precedente y dárselos al siguiente en una secuencia específica. También cuenta con algunos grupos prostéticos; es decir, moléculas no-proteicas requeridas para la actividad de una enzima; por ejemplo, los citocromos poseen un grupo prostético hemo similar a la hemoglobina, con la diferencia de que el suyo acarrea electrones en lugar de oxígeno. La cadena respiratoria comienza en el Complejo I o NADH-deshidrogenasa, con dos electrones provistos por NADH, a su vez proveniente de la glucólisis o de otro proceso catabólico previo, siendo usados por la NADH-deshidrogenasa para establecer un gradiente de protones al exportar cuatro H^+ de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal a través de la membrana. Este Complejo está constituido por FMN (un derivado de la riboflavina, también conocida como vitamina B2) y una enzima Fe-S. En el Complejo II la succinato-deshidrogenasa toma dos electrones del $FADH_2$ (que no atraviesa el Complejo I sino que pasa directamente al Complejo II) y los transfiere directamente a la cadena respiratoria mediante la ubiquinona (Q). Ya que el transporte de electrones en esta etapa no involucra una alteración en el gradiente de protones, se obtienen menos moléculas de ATP del $FADH_2$. Después, la ubiquinona (Q) transporta electrones del NADH y del

FADH₂ y los lleva al Complejo III en forma de ubiquinol (QH₂). La ubiquinona es un lípido soluble capaz de moverse libremente a través del centro hidrofóbico de la membrana. En el Complejo III, constituido por el citocromo *b* y otra proteína Fe-S (centro de Rieske), se lleva a cabo la oxidación de un Fe⁺² a Fe⁺³, al mismo tiempo que se bombean 4 H⁺ a través de la membrana y se transfieren electrones al citocromo *c*. También se le conoce como ubiquinol-citocromo *c* óxido-reductasa. Mientras que QH₂ puede acarrear dos electrones a la vez, el citocromo *c* solamente puede manejar uno a la vez. Finalmente, los electrones del citocromo *c* pasan al Complejo IV, constituido por los citocromos *c*, *a* y *a*₃. Este complejo posee dos grupos hemo (uno tipo *a* y uno tipo *a*₃) y tres iones de cobre en el citocromo *a*₃, estos citocromos utilizan a los cationes de hierro y cobre para reducir al oxígeno, una vez reducido, el Complejo IV toma dos H⁺ del medio para producir agua. La remoción de estos protones también contribuye al mantenimiento del gradiente usado en la quimiosmosis. Es menester hacer mención del cambio en la diferencia de potencial que ocurre a nivel de la membrana interna mitocondrial, pues el potencial rédox inicial del par NADH/NAD⁺ es de -0.32 V y el potencial rédox final del par O₂/H₂O es de 0.82 V. Cuando la diferencia de energía libre de Gibbs (ΔG) del sistema (ΔG del gradiente de protones más ΔG de la síntesis de ATP) es negativa, por termodinámica tiende a fluir hacia la síntesis de ATP, dado que esta síntesis es una reacción endergónica; por el contrario, cuando la ΔG es positiva entonces el flujo de la reacción tiende a desplazarse hacia la hidrólisis de ATP. En condiciones respiratorias y de formación de gradiente de protones adecuados, una vez que ha sido sintetizado por la ATP sintasa, el ATP es exportado al citoplasma por el acarreador de adenín nucleótidos (ANT) (Nath & Villadsen, 2017; Wilson, 2017; Tesina de Manuel Sánchez Contreras, 2017). En la **Figura 2** se presenta un esquema que ilustra la fosforilación oxidativa en mitocondrias, posteriormente una tabla que condensa lo dicho anteriormente.

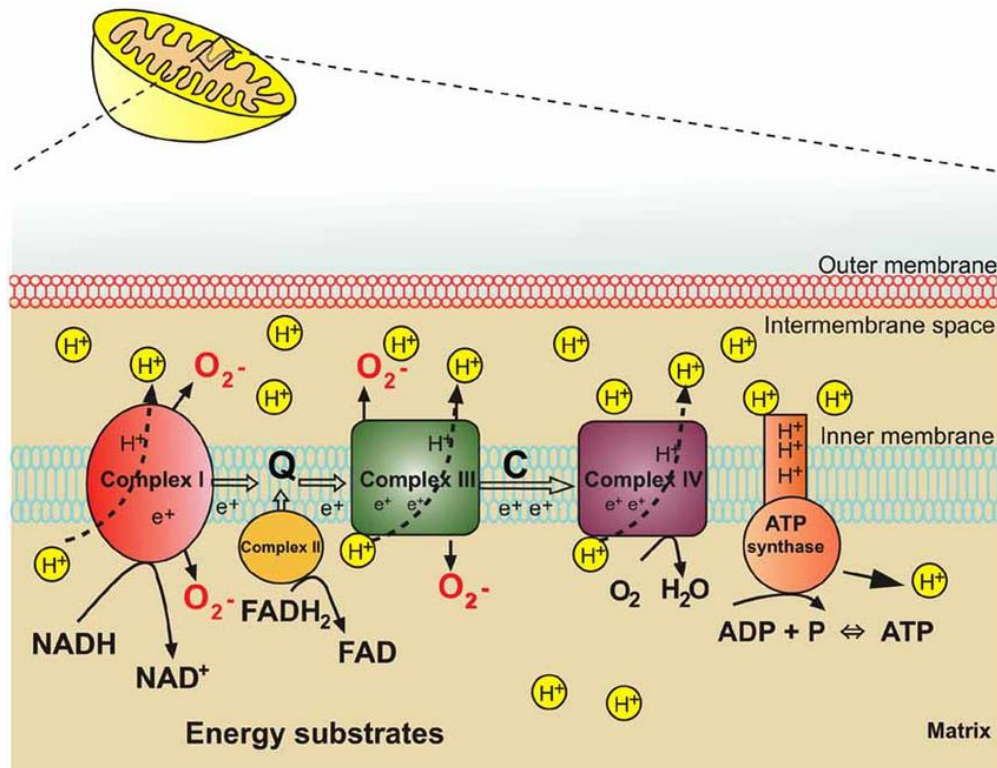


Figura 2. La secuencia de reacciones de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias (imagen tomada de Andrews, 2010)

Complejo	Enzimas y grupos prostéticos	Potencial (Volts)	Reacción	Par rédox
I	NADH deshidrogenasa FMN y Fe-S	-0.32	$NADH \leftrightarrow H^+ + NAD +$	NADH/NAD
II	Succinato deshidrogenasa	-0.20	$succinato + Q + fumarato + QH_2$	FAD/FADH ₂
III	Citocromo bc1 Fe ⁺² & Fe ⁺³	0.06 0.12	$QH_2 + 2 \text{ ferricitocromo} \leftrightarrow Q +$ $2 \text{ ferrocitocromo } c + 2H^+$	QH ₂ /Q
IV	Citocromos c, a y a ₃ Cu ⁺ & Cu ⁺²	0.22 0.29 0.82	$4Fe^{+2} - \text{citocromo } c + 8H^+ + O_2 \leftrightarrow 4H^+ +$ $2H_2O + 4Fe^{+3} - \text{citocromo } c$	O ₂ /H ₂ O

Tabla 1. Características de las reacciones redox catalizadas por los complejos respiratorios de la fosforilación oxidativa mitocondrial.

A diferencia de los eucariontes, en los procariontes la fosforilación oxidativa ocurre en la membrana plásmática; esta membrana se invagina para formar estructuras llamadas

vesículas respiratorias (también conocidas como vesículas laminares o mesosomas) que actúan de manera análoga a las membranas mitocondriales. La fosforilación oxidativa en procariontes es más versátil, pues aunque las moléculas usadas como donadoras de electrones generalmente son NADH y FADH₂, e incluso algunas bacterias como *Hydrogenomonas* usan al H₂ y al succinato con este mismo fin, mientras que otras son capaces de oxidar sustratos como el lactato, glutamato, formiato, malato, ácidos grasos como acetil-CoA y α-glicerofosfato por vías alternas y gracias a que poseen una mayor cantidad y diversidad de citocromos (por ejemplo, *Azotobacter vinelandii* es la célula con la respiración más rápida conocida gracias a su complejo citocromo c₄:o). Otras bacterias utilizan naftoquinonas y vitamina K a la par de la ubiquinona o en sustitución de ésta (Bongers, 1967; Jurtshuk, 1996). En bacterias, este sistema también puede ser dependiente de luz (fotofosforilación) como lo es en el caso de los cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum*, una α-proteobacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, que al hallarse en condiciones aerobias es incolora, mas al agotársele el oxígeno se vuelve fotosintéticamente activa y adquiere un característico color rojizo debido a los carotenoides que sintetiza (Gromet-Elhanan et al, 1985). Bacterias como *Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodobacter capsulatus* poseen complejos respiratorios muy parecidos a los de las mitocondrias, aunque con menos subunidades. Curiosamente, las primeras dos proteínas integrales de membrana cuya estructura se elucidó con alta resolución fueron una enzima mitocondrial de corazón de bovino y la citocromo c oxidasa de *Paracoccus denitrificans* (Ferguson, 2018). Al igual que en las mitocondrias, es un bombeo de H⁺ asociado a un flujo de electrones es la fuerza protón motriz que impulsa el funcionamiento de la ATP sintasa. No obstante, muchas especies de bacterias pueden utilizar otros iones como Na⁺ con este mismo fin, lo importante es que se cree una diferencia de potencial electroquímico entre ambos lados de una membrana. En bacterias acidófilas, el problema de la acidificación intracelular se resuelve bombeando cationes como Na⁺ y/o K⁺ para mantener el balance osmótico, además de expulsar el exceso de protones al medio en forma de H₃O⁺, mientras que en bacterias alcalófilas, la síntesis de ATP implica la unión de un Na⁺ al residuo de glutamato 54 de su anillo c. Por otra parte, las bacterias quimiolitótrofas no obtienen su energía a partir de compuestos orgánicos sino

a través de la oxidación de compuestos inorgánicos (generalmente con elementos que posean varios estados de oxidación como el azufre, el nitrógeno o algunos metales), usando CO_2 como fuente de carbono y compuestos ricos en nitrógeno tales como N_2 , NO_3^- o NH_3 . Algunas llegan a tal punto que son incapaces de crecer en presencia de compuestos orgánicos (Brodie & Gutnick, 1967; Jurtshuk, 1996; Nath & Villadsen, 2015). La fosforilación oxidativa en procariontes está representada en la **Figura 3**.

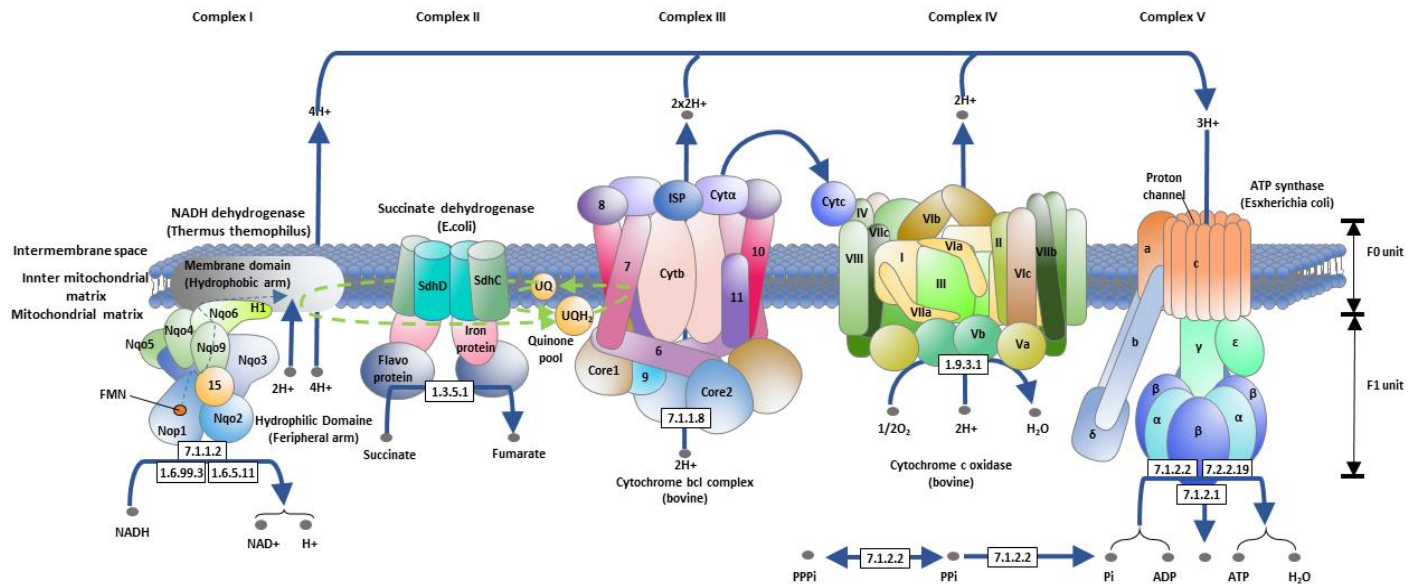


Figura 3. Composición, topología y flujo de electrones en los complejos respiratorios de la fosforilación oxidativa en procariontes (imagen tomada de <https://www.cusabio.com/pathway/Oxidative-Phosphorylation.html>).

Tras lo dicho, se puede afirmar que el principal combustible metabólico para una célula (sin especificar especie o si es eucarionte o procarionte, considerándose una “célula genérica”) es la glucosa, la cual puede ser catabolizada por tres vías distintas: glucólisis (o fermentación en caso de organismos fermentativos), fosforilación oxidativa y el ciclo de Krebs. Sin importar la vía por la que se metabolice, la glucosa (o cualquier otro combustible metabólico) acaba transformándose en ATP (Bonora et al, 2012). La síntesis de ATP es llevada a cabo por una enzima conocida como ATP sintasa, la cual se compone de varias subunidades, tal como se muestra en la **Figura 4**. En una célula eucarionte en condiciones aeróbicas, en primera instancia la glucosa se convierte en piruvato, subsecuentemente éste se convierte en acetil coenzima A (acetil-CoA) e ingresa al ciclo de Krebs, permitiendo la producción de NADH, éste finalmente es

utilizado por los complejos de la cadena respiratoria. Adicionalmente debe mencionarse que el piruvato también puede generarse a partir de precursores lipídicos y proteicos (Bonora et al, 2012). La ATP sintasa mitocondrial humana pesa 600 kDa, mientras que su homóloga bacteriana pesa poco más de 500 kDa (Antoniol et al, 2014).

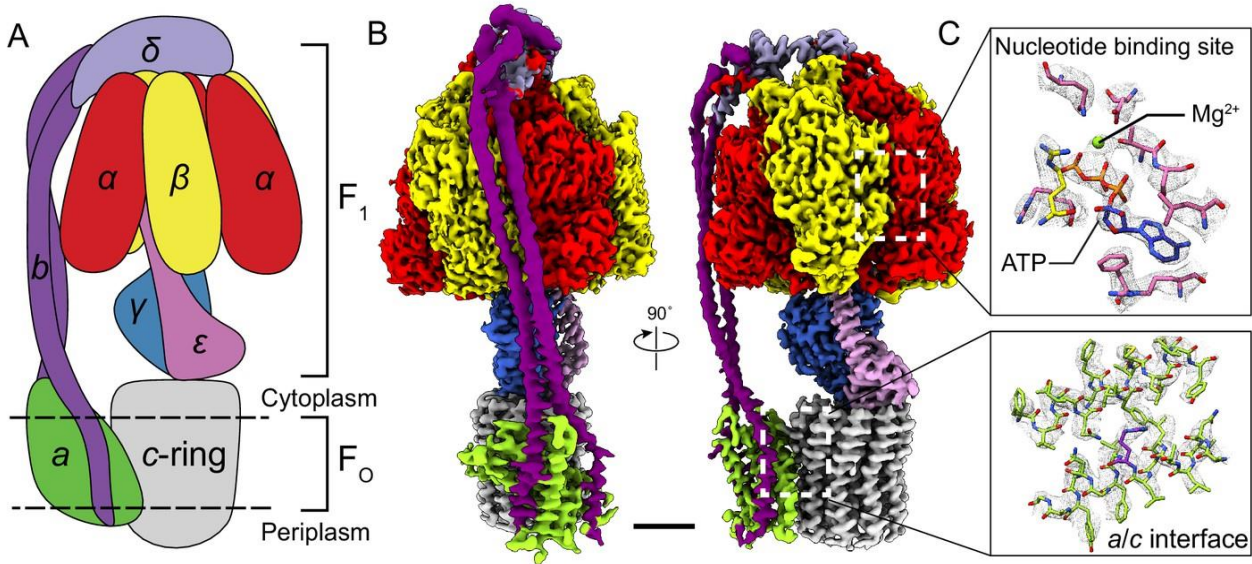


Figura 4. Estructura de la ATP sintasa de *Bacillus* PS3. Se muestra el hexámero compuesto por 3 subunidades α intercaladas con 3 subunidades β , el eje central conformado por las subunidades γ y ϵ , la subunidad superior δ , el anillo inferior c que se une a las subunidades gemelas b por medio de la subunidad a . (A) Modelo de la ATP sintasa. (B) Mapa crio-EM de la ATP sintasa con las subunidades coloreadas de la misma manera que en el modelo. (C) Ejemplo de mapa de densidad que permitió la construcción de un modelo a escala atómica. Barra de escala, 30 Å (imagen tomada de Guo, Suzuki & Rubinstein, 2019).

Aparición y evolución de la síntesis de ATP

Evolutivamente hablando, la primera ruta para la síntesis de ATP pudo haberse desarrollado como un tipo de fermentación cuando el medio ambiente de aquel entonces (se cree que la vida se originó hace 3500 millones de años) era probablemente rico en moléculas orgánicas de origen geoquímico, si bien carente de oxígeno. Durante la fermentación, el ATP se forma por un proceso de fosforilación a nivel de sustrato que aprovecha la energía liberada cuando una molécula orgánica rica en hidrógeno (habitualmente glucosa) se oxida parcialmente. Los electrones liberados

por esta molécula orgánica oxidada son transferidos, ya sea por NADH o NADPH, a otra molécula orgánica (o a un sitio distinto de la misma) la cual se reduce. Al final de la fermentación, algunas moléculas (la mayoría de ellas ácidos orgánicos con el grupo COOH) de desecho son excretadas al medio mientras que otras, como el piruvato, se almacenan para posteriores procesos de biosíntesis. Se teoriza que la aparición de las ATP sintasas ocurrió en tres etapas:

1. La continua excreción de ácidos orgánicos provocó un descenso en el pH del medio, favoreciendo la aparición de proteínas capaces de bombear H^+ del interior al exterior de la célula en pos de protegerla de los efectos de la acidificación intracelular. Eventualmente, una de estas bombas de H^+ pudo haber utilizado la energía proveniente de la hidrólisis de ATP, dando así origen a una primitiva y rudimentaria ATPasa.
2. Simultáneamente, a medida que se acumulaban ácidos orgánicos y productos de desecho en el medio, la reserva de nutrientes fermentables de origen geoquímico que proveía de energía a las primeras células, comenzaba a menguar. Esto favoreció la proliferación de microorganismos capaces de excretar H^+ sin tener que hidrolizar ATP, permitiendo que éste se conservara para otros requerimientos celulares. Es en este periodo cuando se cree que se produjo la unión de las partes que luego se convertirían en los dominios F_1 y F_0 , siendo F_1 la parte catalítica y F_0 la parte asociada a una membrana. Una enzima de este tipo pudo haber sido capaz de usar el transporte de electrones entre moléculas con distinto potencial rédox como fuente de energía para bombear H^+ a través de la membrana plasmática. Es probable que algunas de estas proto-ATP sintasas utilizaran los ácidos orgánicos de desecho acumulados en el medio como donadores y aceptores de electrones. Esta teoría se corrobora porque algunas bacterias actuales crecen en medios ricos en ácidos orgánicos (ácido fórmico por ejemplo) y bombean H^+ usando la pequeña cantidad de energía rédox derivada de la transferencia de electrones del ácido fórmico al fumarato. Algunas otras poseen sistemas de transporte de electrones similares, dedicados únicamente en la oxidación y reducción de sustratos inorgánicos.

3. Eventualmente algunas bacterias desarrollaron sistemas de transporte de electrones para bombear H^+ lo suficientemente eficientes como para aprovechar más energía redox de lo que requerían solo para mantener el pH intracelular. En ese momento, las bacterias que poseían ambos tipos de bombas de H^+ estaban en ventaja debido a que el gradiente de protones generado por el excesivo bombeo de H^+ permitía a estos mismos H^+ reingresar a la célula a través de las bombas de protones en reversa, haciendo que funcionaran como ATP sintasas. Este tipo de bacterias proliferó a expensas de sus competidoras gracias a que requería menos energía de la cada vez más escasa reserva de nutrientes fermentables de origen geoquímico. Este proceso se ve ilustrado en la **Figura 5**.

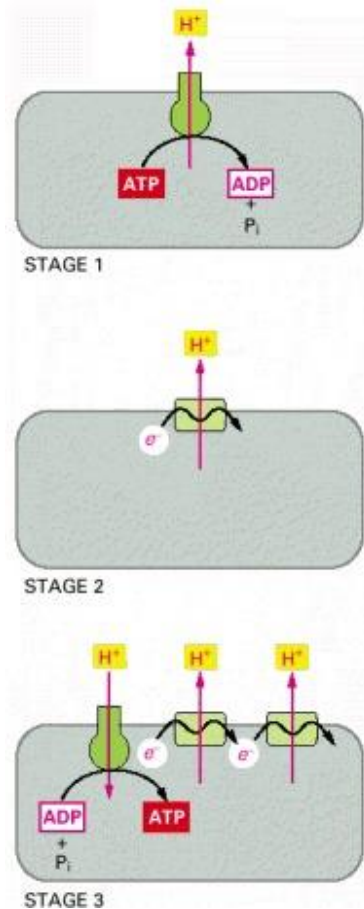


Figura 5. La evolución de los mecanismos de fosforilación oxidativa. Se muestra la probable secuencia de etapas que se llevó a cabo y que derivó en la aparición de las ATP sintasas actuales (imagen tomada de Alberts et al, 2002).

Clasificación de las ATPasas

La familia de las ATPasas se compone de 3 miembros: F-ATPasas, V-ATPasas y A-ATPasas. Todas comparten dos rasgos principales: pueden utilizar la energía generada por la hidrólisis del ATP para mover cationes a través de membranas impermeables a iones y usar un gradiente de iones como suministro de energía para sintetizar ATP. No obstante, existen diferencias significativas entre unas y otras, por ejemplo; las A-ATPasas y las F-ATPasas pueden actuar bidireccionalmente en procariontes, las F-ATPasas actúan únicamente como ATP sintasas en mitocondrias eucariontes y cloroplastos y las V-ATPasas se asemejan a las A-ATPasas a nivel estructural, pese a que funcionalmente se comportan exclusivamente como las F-ATPasas. En la **Figura 6** puede apreciarse una comparación de los tipos principales de ATP-asas (Nirody, Budin & Rangamani, 2020).

Existen diversos tipos de ATPasas dependiendo de qué tipo de organismo se trate.

- F-ATPasas: Se ubican en las mitocondrias, los cloroplastos y en la membrana plasmática de las bacterias, siendo las principales productoras de ATP por medio de un gradiente de protones resultado del transporte de electrones en el caso de las mitocondrias o de la fotosíntesis en el caso de los cloroplastos. Se ha descubierto que en bacterias (el estudio se realizó en *Escherichia coli* y *Bacillus PS3*), cada giro de 120°C de la fracción F₁ se subdivide en dos pasos: un giro inicial de 80°–85° ocasionado por la unión del ATP y su subsecuente liberación como ADP que se lleva a cabo en dos distintas subunidades β, y otro giro de 40°–45° que ocurre cuando el ATP se hidroliza y se libera Pi, lo que sucede secuencialmente en dos subunidades β. En contraste, en la ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans*, el giro de 360° de la enzima, se divide en tres etapas de 120° que no tienen sub-pasos, siendo la enzima que más se asemeja al modelo inicial de cambio de unión de Boyer y por el cual le dieron el premio Nobel (Zarco-Zavala et al, 2020). Cabe mencionar que se le conoce como ATP sintasa al complejo formado por los dominios F₁ y F₀ y ATPasa a la fracción dedicada a hidrolizar ATP; si se hidroliza ATP, se bombean protones pero se consume la energía de la célula. La energía contenida en el gradiente de

protones es convertida en energía mecánica a través de la rotación de la región giratoria (rotor) de la enzima y nuevamente en energía química, mas ahora en forma de ATP. La F-ATPasa también es capaz de ir en reversa, generando el gradiente de protones cuando hay una pérdida del potencial de membrana. En ambos sentidos, se necesita Mg^{+2} para la catálisis, aunque en su ausencia pueda ser reemplazado por el Mn^{+2} . Curiosamente, los cationes Ca^{2+} , que inducen la formación del Poro de Transición de la Permeabilidad (PTP), solamente mantienen la hidrólisis de ATP por F_1 , la cual no está acoplada a la translocación de protones en eucariontes ni en procariontes (Antoniol et al, 2014).

- N-ATPasas: Reciben su nombre por dos motivos: porque transportan Na^+ y porque se les conoce como neo-ATPasas, ya que son de reciente descubrimiento, habiendo sido descritas originalmente en *Methanosarcina barkeri* y *Methanosarcina acetivorans*, además de últimamente en *Burkholderia*. Cabe mencionar que se le considera una variante de la F-ATPasa y que ningún organismo posee únicamente N-ATPasas, sino que éstas están presentes en un operón altamente conservado denominado *atpDCQRBEFAG*. La N-ATPasa presenta características únicas, como que su anillo de subunidades *c* porta un conjunto de residuos de unión a Na^+ , lo que indica que esta enzima confiere la capacidad de translocar Na^+ al espacio extramembranal. Otra característica distintiva es que carece de subunidad δ y en su lugar posee dos subunidades adicionales membranales denominadas *AtpQ* y *AtpR*. Se piensa que las N-ATPasas son divergentes tempranas de las ATPasas membranales y que, de manera similar a las V-ATPasas eucariontes, no sintetizan ATP (Dibrova, Galperin & Mulkidjanian, 2010).
- V-ATPasas: Reciben su nombre porque originalmente fueron descritas en vacuolas. Se hallan principalmente en endosomas, lisosomas, vacuolas, aparato de Golgi y membranas intracelulares de células eucariontes y funcionan como bombas de protones que acidifican compartimientos intracelulares y, ocasionalmente, transportan protones a través de la membrana plasmática. Asimismo, están involucradas en procesos fisiológicos tales como endocitosis mediada por receptores, tráfico en la membrana intracelular, degradación de

proteínas, ingestión de moléculas pequeñas tales como neurotransmisores etc. Se le considera opuesta a la ATP sintasa porque mientras ésta utiliza un gradiente de protones para generar ATP, la V-ATPasa hidroliza ATP para transportar protones a través de la membrana intracelular. Las V-ATPasas están conformadas por dos dominios principales; un dominio periférico V_1 que se compone de ocho subunidades diferentes (A-H) cuya función es hidrolizar al ATP, y un dominio V_0 asociado a membrana, compuesto por seis subunidades (a, c, c", d, e y Ac45 en mamíferos y a, c, c', c", d y e en levaduras) y que se encarga de translocar protones (Toei, Suam & Forgac, 2010). Se sabe que en células de mamíferos las V-ATPasas existen en múltiples isoformas cuya expresión es específica de tejido y que algunas mutantes están asociadas a enfermedades; por ejemplo, mutaciones en las isoformas de la subunidad a derivan en osteopetrosis y acidosis tubular renal. Esta enzima se regula por disociación reversible de sus dominios V_1 y V_0 . En su estado disociado, tanto la actividad catalítica de V_1 como la función de translocación de protones de V_0 están inactivas. Otro mecanismo de regulación consiste en que diversas isoformas de la subunidad a envíen a las V-ATPasas a distintas membranas celulares y de allí a sitios específicos como el aparato de Golgi o vacuolas citoplasmáticas. En células de mamíferos se han encontrado cuatro isoformas de la subunidad a; las isoformas a1 y a2 se localizan principalmente a nivel intracelular, mientras que a3 y a4 se ubican en la membrana plasmática de los osteoclastos y en células renales intercaladas, respectivamente (Collins & Forgac, 2018). Cabe mencionar que las V-ATPasas no son exclusivas de eucariontes, pues bacterias como *Thermus thermophilus* y *Meiothermus chliarophilus* también las poseen, sin embargo, estas últimas poseen una estructura híbrida combinando subunidades de V_1 con las de A_0 de tal modo que se denominan V/A –ATPasas. (Radax et al, 1998).

- A-ATPasas: Son propias de las arqueas y funcionan de manera similar a las F-ATPasas, aunque a nivel estructural y de respuesta inhibitoria asemejan más a las V-ATPasas. Se sabe que algunas bacterias como *Thermus scotoductus*, *Meiothermus ruber* y *Deinococcus radiodurans* utilizan A-ATPasas, teorizándose

que las obtuvieron mediante transferencia horizontal de genes. No obstante no todos los miembros del género *Thermus* poseen A-ATPasas, siendo que *Thermus filiformis* posee F-ATPasas bacterianas (Lapierre, Shial & Gogarten, 2006; Nirody, Budin & Rangamani, 2020). Por otro lado, la A-ATPasa de *Thermus thermophilus* se asemeja más a una V-ATPasa eucarionte, aunque más pequeña y con una estructura más simple y mayor estabilidad, lo que la hace idónea para ser un modelo de estudio. Mediante microscopía electrónica criogénica se halló que en su estado rotacional el rotor central está posicionado de tal manera que la subunidad F está casi equidistante a los dos tallos periféricos (Schep, Zhao & Rubinstein, 2016).

- P-ATPasas: También se les conoce como E₁-E₂-ATPasas (no confundir con las E-ATPasas) reciben su nombre porque son capaces tanto de catalizar la fosforilación como de autofosforilarse (El símbolo atómico del fósforo es P) gracias a un residuo conservado de aspartato ubicado dentro de la bomba de H⁺, que es clave para la fosforilación. La primera P-ATPasa en ser descubierta fue la bomba de sodio-potasio descubierta por el premio Nobel danés Jens Christian Skou en 1957. Se encargan de bombear una amplia variedad de iones que llevan a cabo diferentes funciones como generar el potencial membranar para la contracción y relajación muscular, servir de base a los impulsos nerviosos, expulsar desechos tóxicos de las células, entre otros procesos fisiológicos. Son propias de membranas plasmáticas de bacterias, arqueas y algunos organelos de eucariontes. Contrario a la mayoría de las ATPasas, las P-ATPasas no suelen bombear H⁺ (una excepción es la bomba de protones en la membrana plasmática de plantas y hongos) sino que bombean cationes como Na⁺ (la bomba sodio-potasio), K⁺ (la bomba protón-potasio) y Ca⁺² (la bomba de calcio). A diferencia de los demás tipos de ATPasas, las P-ATPasas no están constituidas por dos secciones principales sino por solamente uno con función catalítica y éste a su vez se compone de varios dominios: un dominio transmembranar M, un dominio de transporte T, un dominio de soporte S, un dominio de unión a nucleótido N, un dominio solenoide A y un dominio regulatorio R. Su actividad se

ve regulada por dominios extraregulatorios aunque todavía se desconocen cuáles son éstos mecanismos de regulación (Külbrandt, 2004).

- E-ATPasas: Su nombre proviene del prefijo *Ecto* que significa “fuera de algo”. Son enzimas localizadas en la superficie de algunas células y que están involucradas en muchos procesos biológicos como la modulación de la actividad neuronal, la prevención de la trombosis intravascular y la glicosilación de proteínas. Se ha descubierto que una E-ATPasa de *Saccharomyces cerevisiae* denominada Apy1p localizada principalmente en el aparato de Golgi, al sobreexpresarse provoca un incremento en la hidrólisis de nucleósidos di- y trifosfatados asociados a membrana. Esta actividad se ve potenciada cuando el sustrato es ADP y en presencia de Ca^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} (Zhong & Guidotti, 1999). Cabe mencionar que las E-ATPasas son insensibles a los inhibidores que generalmente tienen efecto sobre las F-, V- y P-ATPasas, es dependiente de los cationes divalentes anteriormente mencionados, además de estar involucradas en la protección de efectos citolíticos, en la regulación de sustrato de la ectocinasa, regulación de la transducción de señales, en la mediación de la adherencia celular y aparentemente la actividad de la E-ATPasa contribuye a la resistencia a fármacos en células vegetales y de levadura (Collopy et al, 2005).

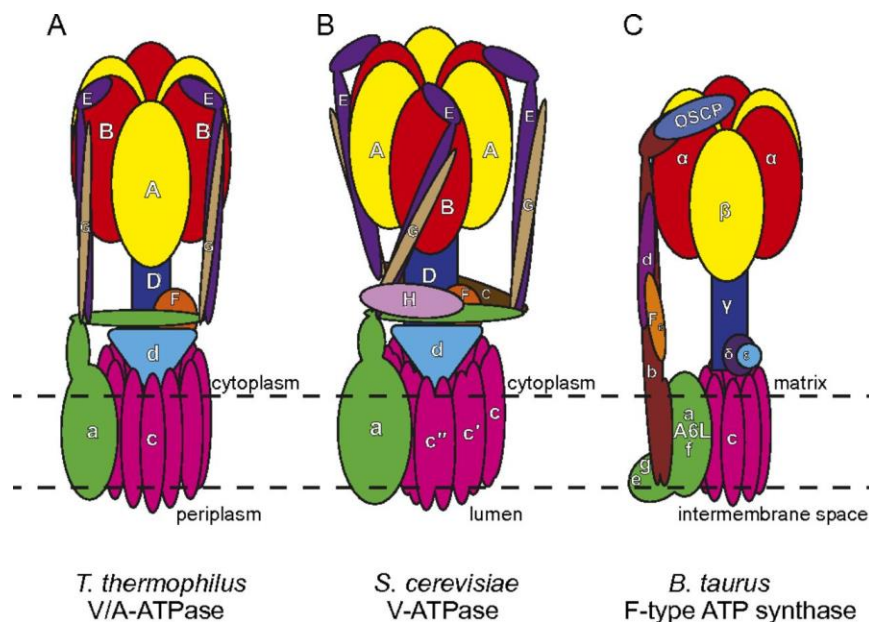


Figura 6. Comparación de los tres tipos de ATP-etas rotacionales. Arreglo de subunidades de la V/A-ATPasa de *Thermus thermophilus* (A), la V-ATPasa de *Saccharomyces cerevisiae* (B) y la F-ATP sintasa de *Bos taurus* (imagen tomada de Schep, Zhao & Rubinstein, 2016).

Funciones de las subunidades de la ATP sintasa

Si bien los organismos procariontes carecen de mitocondrias, sí poseen ATP sintasas para la generación de energía y aunque éstas son más simples que sus equivalentes mitocondriales, pueden desempeñar las mismas funciones con una eficiencia igual o superior. La ATP sintasa se compone de dos regiones principales llamadas F_1 y F_0 compuestas a su vez por varias subunidades (Antes et al, 2003). Mediante microscopía electrónica se ha descubierto que la porción embebida en la membrana está conectada mediante un tallo relativamente estrecho (de aproximadamente 45 Å) a una estructura principal con forma de perilla de unos 90 – 100 Å de diámetro. Al exponerse a medios de fuerza iónica débil, entre otros factores, la enzima se separa en dos; la porción F_0 , asociada a la membrana, la cual está involucrada en la translocación de protones y la fracción F_1 que cataliza la hidrólisis de ATP (Boyer, 1997). En el complejo F_1 (el cual consiste en las subunidades $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$) la subunidad central y asociada al tallo (de 4-5 nm de largo) forma el rotor dentro del cilindro conformado por el hexámero de subunidades α - β (Antes et al, 2003). Es el dominio soluble y catalítico de la ATP sintasa. Contiene seis sitios de unión a nucleótido en la interfaz entre las subunidades α y β , aunque solo tres se consideran de naturaleza catalítica. Estos sitios catalíticos muestran distinta afinidad por nucleótidos de adenina coordinados con Mg^{+2} (Gabellieri et al, 1997). Posee una forma más o menos esférica y su diámetro es de ≈ 85 Å. (Hakulinen et al, 2012). El complejo F_0 (usualmente compuesto por tres subunidades a , b y c con estequiometría ab_2c_{8-15}) atraviesa la membrana interna, donde el anillo compuesto por subunidades c forma el rotor que gira en dirección impuesta por el gradiente de protones (o iones Na^+). La rotación de F_0 suele ser más fuerte que la rotación inversa impulsada por la unión e hidrólisis de ATP-Mg en F_1 al usar la fuerza del gradiente de protones, lo cual induce la síntesis del ATP si el gradiente de protones es suficiente para ello. En un momento dado esto puede invertirse y es entonces cuando se hidroliza ATP (Antes et al, 2003). Los cloroplastos y algunas bacterias como *Paracoccus denitrificans* poseen dos copias diferentes pero homólogas de la subunidad b ,

denominadas b y b' respectivamente; en cualquier caso, la ATP sintasa atraviesa la membrana plasmática como se observa en la **Figura 7** (Guo, Suzuki & Rubinstein, 2019).

Las subunidades que conforman a la ATP sintasa procarionte son:

- Subunidad α : Hay 3 por cada ATP sintasa y forma un hexámero con las subunidades β . Es una subunidad no-catalítica en la cual existen tres sitios de unión a ATP, ADP o Pi asociados a Mg^{+2} , teniendo una función regulatoria. El hexámero de unidades α y β sufre una serie de cambios conformacionales que conllevan a la formación de ATP a partir de ADP, los cuales son inducidos por la rotación de la subunidad γ , la cual a su vez es dirigida por el movimiento de protones a través del complejo F_0 en el anillo c (Amzel, Bianchet & Leyva, 2003).
- Subunidad β : Hay 3 por cada ATP sintasa. Puede adoptar diferentes conformaciones y unirse a Mg-ADP (β_{DP}), Mg-ATP (β_{TP}) o permanecer vacía (β_E), cada una adopta una conformación de “abierto” (β_E), “semi-cerrado/entreabierto” (β_{DP}) o “cerrado” (β_{TP}). El dominio central de cada subunidad contiene residuos de unión a nucleótidos que hacen contacto directo con la molécula de ATP o ADP (Antes et al, 2003). Todas las ATP sintasas poseen tres sitios catalíticos; uno en cada interfaz α/β . Incluyendo por supuesto a la ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans*.
- Subunidad γ : Forma el tallo central que conecta el rotor F_0 con el núcleo catalítico F_1 y gira 120° al ser impulsada cuando el anillo de subunidades c introduce a través de F_0 uno o varios H^+ del medio extramembranal para inducir la actividad de la ATP sintasa. Está unida al hexámero formado por las subunidades α y β . Su flexibilidad permite un ritmo de rotación constante ya que con cada giro acumula energía de torsión, lo que a su vez estimula la rotación de los complejos F_1 y F_0 . La región mejor conservada de esta subunidad es su C terminal, donde una secuencia altamente conservada denominada DELSEED de la subunidad β regula el mecanismo de torsión (Antes et al, 2003; Tanigawara et al, 2012). Se ha observado que la subunidad γ está íntimamente asociada a la subunidad ϵ , ya que sin ésta, algunos cambios conformacionales no pueden

llevarse a cabo (Aggeler, et al, 1995; Haughton and Capaldi, 1995; Feniouk, Suzuki & Yoshida, 2006)

- Subunidad δ (mitocondrial): Es exclusiva de las ATP sintasas mitocondriales donde también recibe el nombre de OSCP (Oligomycin Sensitivity Conferral Protein). En ATP sintasas procariontes su homóloga es la subunidad ϵ (Walker et al, 1985). Es parte del rotor entre las regiones F_1 y F_0 (Abrahams et al, 1994).
- Subunidad δ (bacteriana): Forma parte del tallo periférico que mantiene ensamblados a los dominios F_1 y F_0 , previniendo que la rotación de uno obstaculice la rotación del otro. Al igual que la OSCP mitocondrial, se une al dominio N-terminal de dos subunidades α e interactúa con ellas en el dominio F_1 (Wilkins et al, 2000; Wilkins, et al, 2005) Mediante cromatografía de afinidad, monitoreo de formación de enlaces disulfuro y ensamblaje retardado *in vivo*, se ha descubierto que el complejo F_1F_0 es armado de manera modular mediante sub-complejos; por un lado se ensambla la F_1 y por otro lado el F_0 , y posteriormente se asocian ambos sub-complejos, esto impide la formación de un producto intermedio que actúe como una unidad funcional capaz de translocar H^+ (García-, J.J. et al, 2000; García, J.J. et al, 2002). Además, se ha observado que la subunidad δ es clave para mantener la estabilidad del dominio F_0 , ya que actúa como un sujetador entre ab_2 y $c_{10}\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$, asegurando que el canal por donde pasan los H^+ esté simultáneamente ensamblado dentro del complejo F_1F_0 (en ausencia de subunidad δ , el dímero de subunidades b no se ensambla al resto del complejo F_1F_0). De esta manera, δ logra mantener una baja permeabilidad membranal a los H^+ , algo esencial para que la ATP sintasa sea viable. La presencia de los sub-complejos ab_2 y $c_{10}\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ indica que la subunidad δ es muy probablemente la última en unirse al complejo F_1F_0 , tal y como se observa en la **Figura 7** (Hilbers et al, 2013; Brandt et al, 2013).

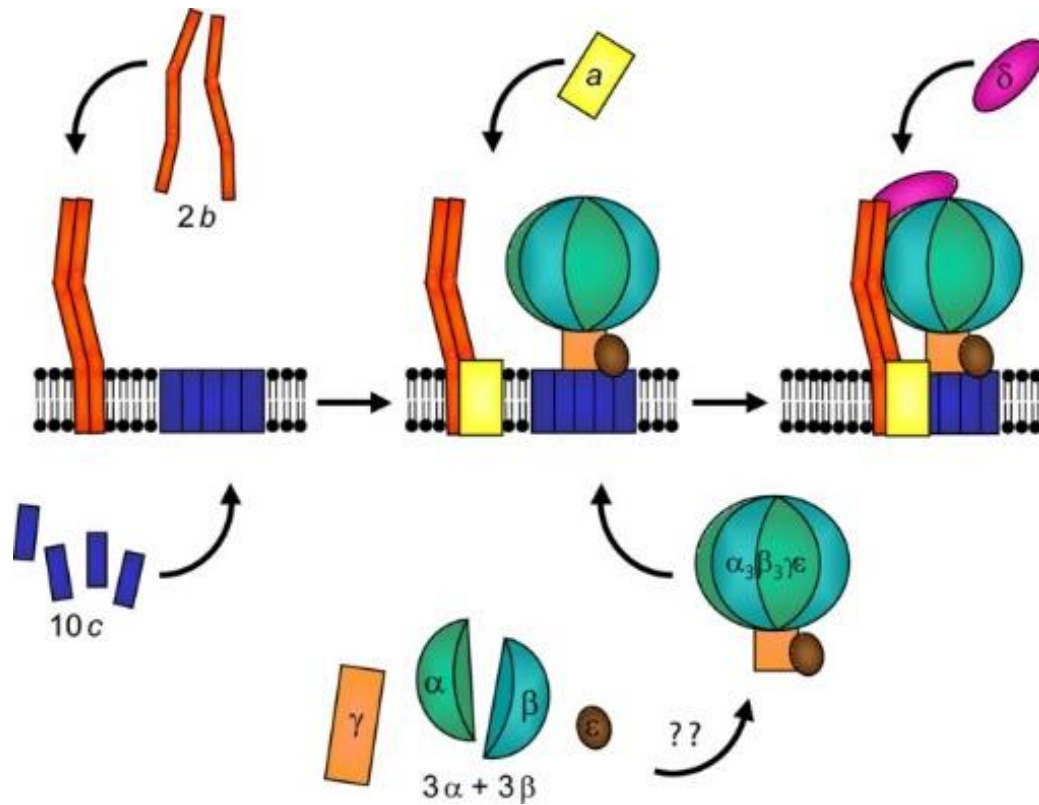


Figura 7. Modelo del ensamblaje de la ATP sintasa de *E.coli*. El anillo c_{10} y el dímero b_2 están ya presentes independientemente en la membrana citoplásmica. La formación de $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ no se conoce detalladamente en *E.coli*. Para el complejo F_1F_0 de las mitocondrias de levadura, se ha propuesto que los sub-complejos $\gamma\epsilon$ y $\alpha_3\beta_3$ se ensamblan para formar a $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ antes de unirse al anillo c_{10} . La inserción membranal de la subunidad a es interdependiente de la presencia de b y c . La integración de b_2 al complejo depende de la subunidad δ , mientras que la unión de a y δ a b_2 no tiene una secuencia definida (imagen tomada de Hilbers et al, 2013).

- Subunidad OSCP: Su nombre deriva de *proteína que confiere sensibilidad a oligomicina* (Oligomycin Sensitivity Conferring Protein por sus siglas en inglés). Forma parte del conector que enlaza a F_1 con F_0 , ubicándose en la parte superior de F_1 y estableciendo contacto con el tallo periférico, asegurando la unión funcional y estructural de F_1 con F_0 . Está involucrada en la transmisión de cambios conformacionales y acoplamiento de protones durante la síntesis de ATP. Recientemente se ha descubierto que la OSCP es el blanco de unión de la ciclofilina D (CyPD) un inductor del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP), cuya apertura puede derivar en muerte celular. La unión de CyPD afecta la actividad de la ATP sintasa y más importante aún, abate el

umbral de Ca^{+2} de la matriz requerido para la apertura del PTP. La OSCP es exclusiva de mitocondrias, aunque posee un homólogo en bacterias y cloroplastos denominada subunidad δ . Las F-ATPasas que carecen de esta subunidad por lo general bombean Na^+ en lugar de protones. La sensibilidad a oligomicina a la que debe su nombre la OSCP se puede definir en dos contextos: La medida de la integridad estructural de la enzima, puesto que la separación de F_1 y F_0 conlleva a una disminución en la actividad de la ATPasa sensible a oligomicina, en este contexto, la hidrólisis de ATP por F_1 aún se lleva a cabo, pero sin estar ya acoplada a la translocación de H^+ , perdiéndose la sensibilidad a la oligomicina (la cual, cabe mencionar, no se une a la OSCP), demostrando que inhibe el transporte de protones en F_0 y que la subunidad OSCP es totalmente necesaria para transportar protones y así sintetizar ATP. El segundo contexto se refiere a la capacidad del complejo ATP sintasa de unirse a la oligomicina, más específicamente, al anillo compuesto por subunidades c (Antoniol et al, 2014; Giorgio et al, 2018). Las F-ATPasas de los cloroplastos de algunas plantas (por ejemplo *Pisum sativum*, *Ipomoea batatas* y *Brassica napus*) presentan una sexta subunidad con un peso de 26.5 kDa y cuya función es equivalente al de la OSCP en otros eucariontes. Se le asignó el nombre de subunidad δ' y, al igual que su homóloga, le confiere sensibilidad a la oligomicina a la F-ATPasa, específicamente al dominio F_1 . A pesar de algunas diferencias en las secuencias de los residuos de aminoácidos de su N-terminal, la subunidad δ' de plantas es lo suficientemente similar a la OSCP de mamíferos como para ser reconocida por anticuerpos contra ésta (Horak et al, 1989).

- Subunidad ϵ (mitocondrial): Es una subunidad de talla discreta que se encuentra adyacente a la subunidad γ . Carece de homólogo en bacterias y cloroplastos. Al comparar las secuencias de aminoácidos de la subunidad ϵ de diferentes organismos, se descubrió que los residuos más conservados son de glicina, las leucinas y las prolinas, presumiblemente debido a su importancia para un correcto plegamiento, mientras que la histidina está asociada a interacciones con el bucle polar de la subunidad c . Es notable mencionar que en la región del C-terminal de la hélice alfa se encontraron residuos altamente conservados en las

secuencias de las mitocondrias y los cloroplastos, pero no en la subunidad bacteriana ϵ , también vale la pena mencionar que solo los residuos de leucina y alanina están conservados en las secuencias mitocondriales y de cloroplastos, mientras que los residuos polares son específicos para cada tipo de enzima, en el caso de su contraparte bacteriana, no se encontraron residuos conservados en esta región (Feniouk, Suzuki & Yoshida, 2006). Durante mucho tiempo se creyó que la subunidad ϵ formaba parte del complejo F_0 , no obstante, ahora se sabe que está asociada a la subunidad γ formando el complejo γ/ϵ (Gabellieri et al, 1997).

- Subunidad ϵ (bacteriana): Se sabe que puede adoptar una conformación “hacia arriba” que inhibe la hidrólisis de ATP sin que esto comprometa la síntesis de ATP. Ésta subunidad regula la inhibición en función de la concentración de ATP libre. A bajas concentraciones de ATP (<0.7 mM en el caso del termófilo *Bacillus* PS3) adopta la conformación “hacia arriba” lo que inhibe la hidrólisis de ATP, mientras que a altas concentraciones de ATP (>1 mM) adopta una permisiva conformación “hacia abajo”, lo que permite a la ATP sintasa ir en reversa, estableciendo un gradiente de protones hacia el exterior de la membrana hasta que la concentración de ATP sea tal que se reestablezca un equilibrio sin que se agote la reserva celular de ATP (Guo, Suzuki & Rubinstein, 2019). Se ha documentado que en la ATPasa de *Bacillus* PS3, la subunidad ϵ es indispensable para la unión de F_1 con F_0 , sin esta subunidad, la enzima no consigue ensamblarse y no se observa actividad de ATPasa asociada a la membrana en la célula. Su dominio C-terminal puede inhibir la capacidad de la ATP sintasa de ir en sentido reverso (Keis et al, 2006). Esta función inhibitoria es distintiva de la subunidad ϵ ; en algunas bacterias donde abate la tasa de hidrólisis de ATP así como también la abate en cloroplastos. Esto ocurre porque la subunidad ϵ extiende su C-terminal muy adentro del hexámero $\alpha_3\beta_3$ hasta el N-terminal de la subunidad γ . Esta conformación completamente extendida presenta un efecto anisotrópico en la actividad enzimática, por un lado, abate la hidrólisis de ATP hasta en un 80% sin que ello comprometa la tasa de síntesis de

ATP (Tsunoda et al, 2001; Feniouk, Suzuki & Yoshida, 2006; Zarco-Zavala, Mendoza-Hoffmann & García-Trejo, 2018).

- Subunidad *a*: Se apoya directamente en el anillo *c*, el cual conecta con la subunidad *b* por medio de dos hélices alfa, además de ello, contiene otras seis hélices alfa asociadas a la membrana. Forma dos hemiconductos o hemicanales hidrofílicos que no atraviesan por completo la membrana, por estos hemicanales pasan los H⁺ conduciéndolos hacia inducir el giro del anillo de subunidades *c* y del rotor, y evitando así que atraviesen la membrana de manera directa, lo cual impediría el acoplamiento entre el paso de protones por F_O y la síntesis de ATP en el dominio F₁ (Schep, Zhao & Rubinstein, 2016). Posee un gran número de subunidades secundarias menores asociadas a ella: d, e, f, g, A6L (8) y k.
- Subunidad A6L (mitocondrial): También conocida como subunidad 8, forma parte del llamado complejo V en el dominio F_O de la ATP sintasa de eucariontes, específicamente se ubica en el tallo del estator, mismo que está anclado a la membrana y actúa como freno para evitar rotaciones innecesarias del resto de subunidades de la ATPasa relativas al rotor durante la síntesis e hidrólisis de ATP.
- Subunidad *b*: Existe una diferencia en esta subunidad dependiendo si pertenece a una F-ATPasa mitocondrial, de cloroplasto o a una procarionte. En F-ATPasas de eucariontes existe solamente una subunidad *b* asociada a una subunidad δ (homóloga a la OSCP de mitocondrias), mientras que, como se mencionó anteriormente, bacterias como *P. denitrificans* además de bacterias fotosintéticas y cloroplastos, poseen dos subunidades *b* llamadas *b* y *b'* respectivamente. En cualquier caso, la subunidad *b* forma parte del tallo periférico y conecta a F_O con F₁ sirviendo de elemento estático (estator) durante la catálisis rotacional, evitando así que algunas subunidades giren con o en contra del elemento rotacional central (Higuti et al, 1991; Carbajo et al, 2005). También se ha observado que en ausencia de otras subunidades del complejo F₁F_O, las subunidades *b* forman un dímero homooligomérico y en presencia de subunidades *c* (que a su vez forman un anillo de diez miembros), ambos complejos se ensamblan para formar un complejo b₂c₁₀ (Hilbers et al, 2013).

- Subunidad c: Forma un anillo oligomérico de 8 a 15 miembros (dependiendo de la especie; por ejemplo, en *Ilyobacter tartaricus* se compone de 11 miembros, con una estequiometría ab_2c_{11}) poseyendo además, 7 hélices adyacentes, de las cuales un manojo de 4 hélices pertenecen al estator de la subunidad a que está en contacto con c_{11} . Una quinta hélice adyacente al manojo de 4 hélices interactúa muy íntimamente con una hélice de la subunidad c, la cual cambia ligeramente su posición hacia el anillo central. Mediante microscopía de fuerza atómica se comprobó que la presencia del estator F_0 sobresale menos de la membrana que el anillo de subunidades c; 3 hélices de la región del estator están en contacto con tres hélices de c_{11} . La ubicación y las distancias de las hélices del estator imponen restricciones espaciales en el complejo F_0 bacteriano (Hakulinen et al, 2012). El anillo c atraviesa la membrana interna mitocondrial donde ingresan protones que se unen a un residuo conservado de ácido aspártico en su centro. Se cree que la subunidad a es la que provee canales de acceso a los protones de y para el residuo 16 de ácido aspártico. Recientemente, se ha descubierto que en *E.coli* el transporte de H^+ impulsa la rotación del anillo de 10 subunidades c en el sector F_0 de la ATPasa, el cual a su vez se acopla a la rotación de la subunidad γ , ésta se ve forzada a girar con el anillo c debido a una aparente unión permanente entre las subunidades γ y ϵ en F_1 . La protonación y desprotonación del residuo de ácido aspártico está sincronizado paso a paso con un movimiento del rotor (Filingame, Angevine & Dmitriev, 2003).
- Subunidad d (mitocondrial): Forma parte del tallo periférico que conecta a F_1 con F_0 junto a las subunidades a, b, c, e, f, g, y k, aunque se desconoce su función.
- Subunidad e (mitocondrial): En células de levadura forma parte del dominio F_0 y está involucrada en la dimerización de la ATP sintasa. Se encuentra anclada a la membrana interna mitocondrial por medio de su N-terminal hidrofóbico, que ayuda a estabilizar a las subunidades g y k, por otro lado, su C-terminal es hidrofílico y se proyecta hacia el espacio intermembranal, en donde ayuda a estabilizar al dímero F_1F_0 . Esta subunidad favorece la dimerización de la enzima mitocondrial junto con la subunidad f (Arselin et al, 2003; Arselin et al, 2004 & Paumard et al, 2002).

- Subunidad f (mitocondrial): Se desconoce su función aunque es sabido que se localiza asociada a la subunidad a en el tallo periférico; cuya composición varía si pertenece a una F-ATPasa mitocondrial, bacteriana o de cloroplasto.
- Subunidad F6 (mitocondrial): No confundir con la subunidad f. Forma parte del tallo periférico que une a los dominios F₁ catalítico y F₀ membranal y actúa como un estator que mantiene quietas a ciertas subunidades, previniendo así que roten junto con el elemento rotacional central. En F-ATPasas mitocondriales, el tallo periférico está constituido por una copia de cada una de las subunidades OSCP, F6, b y d. No existe un homólogo de la subunidad F6 en ATPasas de bacterias o cloroplastos.
- Subunidad g (mitocondrial): No se le conoce homólogo en bacterias o en cloroplastos. Su función es estabilizar la interfaz de la ATP sintasa dimérica y oligomérica, se le ha encontrado asociada a la subunidad a (Bustos & Velours, 2005; Liu et al, 2015).
- Subunidad j (mitocondrial): Es una subunidad accesoria asociada a la subunidad a y actúa aportando estabilidad al dímero de ATP sintasas (Liu et al, 2015).
- Subunidad k (mitocondrial): Se sabe que está asociada a la subunidad a. Su cadena se une al dímero formado por las cadenas de las subunidades e y g, aportando estabilidad al dímero de la ATP sintasa mitocondrial (Liu et al, 2015).

Factor de Inhibición 1 como inhibidor endógeno de la ATPasa mitocondrial

Es oportuno hacer mención del Factor de Inhibición 1, mejor conocido como IF₁; descubierto originalmente por Pullman y Monroy en 1963. Una de las primeras características asociadas a este inhibidor fue que el grado de inhibición que ejerce sobre la ATP sintasa es extremadamente sensible al pH del medio, dado que a un pH superior a 7 el porcentaje de inhibición se abate drásticamente, estando su intervalo de pH de funcionamiento óptimo entre 5.8 y 7.0 (Pullman & Monroy, 1963). El dominio inhibitorio se encuentra en su N-terminal, mientras que su parte central actúa como sensor de pH (a valores de pH <6.5 tiende a dimerizarse, mientras que a valores de pH >6.5 tiende a formar tetrámeros) y su C-terminal funciona como dominio de dimerización (Cabezón et al, 2000). IF₁ es el inhibidor fisiológico de la ATP sintasa

mitocondrial; se trata de una proteína mitocondrial de 12 kDa de breve vida-media (aproximadamente dos horas) que se regula a nivel post-transcripcional y es -específica de tejido. Como ya se ha mencionado anteriormente, la ATP sintasa regula el flujo de la fosforilación oxidativa (OXPHOS; Boyer, 1997), la ejecución de la muerte celular y la señalización mitocondrial por especies reactivas de oxígeno (ROS). Su ensamblaje implica el ingreso de un precursor proteico a la mitocondria, donde su pre-secuencia se separa para dejar madurar al IF₁, una proteína alfa-helicoidal que contiene su dominio inhibitorio en su N-terminal y un dominio de dimerización en su C-terminal. Contiene un péptido inhibitorio I1-60His cuyo sitio de unión es una ranura entre las hélices alfa de las subunidades α y β del dominio F₁ que llega hasta la subunidad γ y del tallo central con su N-terminal. La interacción entre el IF₁ y la ATP sintasa mantiene una proporción de 1:1 inhibiendo únicamente la síntesis mas no la hidrólisis de ATP (inhibidor unidireccional) de acuerdo a lo encontrado originalmente por Pullman y Monroy (1963). Antaño se pensaba que el IF₁ se expresaba de manera generalizada en todos los tejidos de mamíferos, no obstante, investigaciones recientes han demostrado que se expresa mayoritariamente en órganos vitales como lo son el corazón, el hígado, los riñones y el cerebro, con expresión escasa en pulmones, colon, mamas y ovarios (Rouslin, 1991; Rouslin & Broge, 1993; Schwerzmann & Pedersen, 1986; García-Aguilar & Cuezva, 2018). Es destacable mencionar que, en condiciones de carcinoma y células cancerosas, IF₁ (que en humanos está codificado por el gen ATP1F1) se expresa de manera excesiva en los tejidos en los que normalmente se expresa de manera escasa (Bravo et al, 2004; García-Aguilar & Cuezva, 2018).

Como cualquier otra enzima, la ATP sintasa es cinética y termodinámicamente reversible, esto significa que, en un momento dado, puede girar tanto a favor de las manecillas del reloj para sintetizar ATP, como en contra de las manecillas del reloj para hidrolizar ATP. Cuando por algún motivo el gradiente de protones ($\Delta\mu_{H^+}$) disminuye (por ejemplo; por anaerobiosis o isquemia), la ATP sintasa tiende a girar en reversa y exportar H⁺ hacia el espacio intermembranal, si este proceso continuase indefinidamente la célula agotaría sus reservas de ATP y moriría. El mecanismo de acción del IF₁ consiste en bloquear los cambios conformacionales catalíticos que experimenta la subunidad β a través de la unión de los residuos 1–38, su N-terminal a

la interfaz α/β y, al mismo tiempo, bloquea la rotación de la subunidad γ y al entrecruzarse con el complejo γ/ϵ , aunque primero el IF_1 debe ser desfosforilado antes de poder interactuar con la ATP sintasa (Minauro-Sanmiguel et al, 2002; Cabezón et al, 2003; García-Bermúdez et al, 2015). Se ha demostrado que la fosforilación del residuo S39 impide al IF_1 interactuar con la ATP sintasa, convirtiendo a S39 en el regulador del IF_1 , subsecuentemente, es la forma desfosforilada del IF_1 la que presenta efecto inhibitorio sobre la ATP sintasa. Esta fosforilación estaría mediada por la actividad de una PKA mitocondrial que regula la respiración aumentando su eficiencia cuando dicha cinasa está activa. En cáncer, IF_1 es una proteína altamente expresada en algunos de los carcinomas animales (Bravo et al, 2004) y humanos (García-Aguilar & Cuezva, 2018) más prevalentes. Se demostró que la sobreexpresión del IF_1 , aunque inhibe la producción de ATP mitocondrial, correlaciona con una mejor prognosis en pacientes con cáncer de mama, especialmente en aquellas con cáncer de mama triple negativo. En este contexto se estudió el efecto de 1018 fármacos aprobados por la FDA sobre la respiración mitocondrial mediante el ensayo de Seahorse en busca de inhibidores de la OXPHOS que puedan ser reposicionados en la terapia del cáncer (Nuevo Tapióles, 2019). Por medio de entrecruzamientos químicos, en el laboratorio del Dr. García Trejo se demostró que el N-terminal inhibitorio del IF_1 penetra en la F_1 -ATPasa a través del sitio catalítico α_E/β_E y que interactúa directamente con la subunidad γ en el tallo central para bloquear el giro del rotor (Minauro-Sanmiguel, et al, 2002). Este resultado se corroboró un año después, mediante cristalografía de rayos X (Cabezón et al, 2003). Una vez que el N-terminal del IF_1 está dentro de la interfaz α_E/β_E , el rotor central de la ATP sintasa sufre al menos dos rotaciones parciales de 120° en sentido contrario a las manecillas del reloj para transformar esta interfaz catalítica en el confórmero intermedio α_{TP}/β_{TP} para finalmente adoptar la conformación α_{DP}/β_{DP} en la que el IF_1 traba a la subunidad γ , evitando que vuelva a rotar, tal y como se observa en la **Figura 8**. Este mecanismo de traba se relaciona con la transición del N-terminal de una región intrínsecamente desordenada (IDPr) a una α -hélice larga unida a F_1 (Zarco-Zavala, Mendoza-Hoffmann & García-Trejo, 2018).

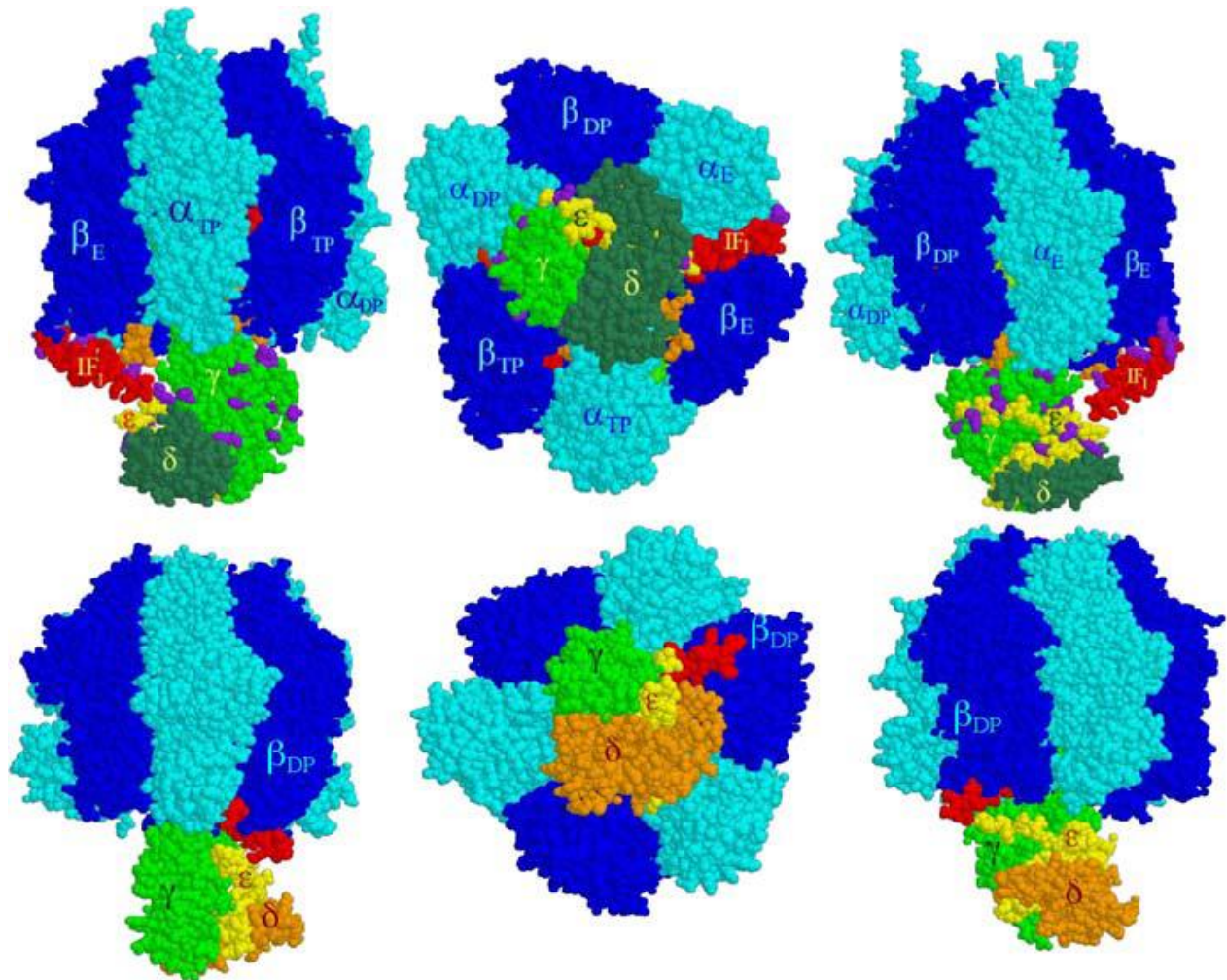


Figura 8. Entrada y unión inhibitoria del IF₁ mitocondrial en la F₁-ATPasa mitocondrial de corazón de bovino. *Panel superior:* las tres imágenes muestran distintas vistas de la entrada del N-terminal inhibitorio del IF₁ (rojo) por la interfaz α_E/β_E . Las subunidades β en azul oscuro, las α en azul claro, γ en naranja, y ϵ en amarillo. Las imágenes de izquierda y derecha muestran vistas laterales de la F₁-ATPasa mitocondrial de bovino (BhF₁) y la imagen central una vista desde “abajo”, desde la posición del canal de protones F_O con las subunidades del rotor (γ/ϵ) en el centro. La entrada del IF₁ por esta interfaz α_E/β_E se predijo por entrecruzamiento químico γ -IF₁ (Mianuro-Sanmiguel, 2002). *Panel inferior:* Posición final del IF₁ inhibitoria en la interfaz α_{DP}/β_{DP} alcanzada después de dos giros de 120° del rotor γ/ϵ para bloquear el giro del rotor y los cambios conformacionales de la interfaz α/β (Cabezón et al, 2003). Código de colores y vistas laterales o “desde abajo” desde F_O, igual que en el panel superior. El mecanismo de entrada, unión, rotación, implica una transición de intrínsecamente desordenado (IDP o IDPr) a formación de alfa-hélice del IF₁ y bloqueo anti-rotación, el cual se abrevia ERAHL (Zarco-Zavala et al, 2018) y se conserva entre el IF₁ mitocondrial y la subunidad ζ de *Paracoccus denitrificans*, ver texto para más detalles (imagen tomada de García-Trejo & Morales-Ríos, 2008).

Se ha propuesto que el IF₁ también repercute en la regulación del ciclo celular. Mientras que la fase F₁ es altamente dependiente de OXPHOS, la fase G2/M depende de la

glucólisis aerobia, siendo independiente del consumo de O_2 . En consecuencia, al comparar la fosforilación de IF_1 en células fijas en G1 al ser incubadas con afidicolina (un inhibidor de la DNA-Polimerasa) contra la fosforilación de IF_1 en células fijas en fase G2/M incubadas con nocodazol (un disruptor del huso mitótico), se vio que la mayoría del IF_1 estaba fosforilado en células en G1, mientras que el IF_1 desfosforilado era predominante en células fijas en G2. Estos resultados se correlacionan con la actividad relativa de la fosforilación oxidativa y la glucólisis aerobia en distintas etapas del ciclo celular, con el IF_1 desfosforilado siendo simultáneo con la fosforilación oxidativa abatida y un aumento en la glucólisis aerobia (García Bermúdez et al, 2015). Sin embargo, esta propuesta del papel del IF_1 en el ciclo celular no concuerda con la inhibición unidireccional del IF_1 , dado que sólo inhibe la actividad de la F_1F_0 -ATPasa pero no la de F_1F_0 -ATP sintasa (Pullman & Monroy, 1963).

Por otro lado, las proteínas cinasas son enzimas capaces de transferir el fosfato y del ATP a un residuo de un aminoácido receptor localizado en una proteína sustrato. Los residuos de aminoácidos que son sustrato de la acción de las proteínas cinasas, son serina, treonina, tirosina e histidina, en sus grupos hidroxilo e imidazol, respectivamente. La proteína cinasa A (PKA) pertenece al grupo ACG, un grupo de proteínas cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos cuya actividad se regula por segundos mensajeros como el diacilglicerol, el AMPc, el GMPc y Ca^{+2} , siendo este último el principal regulador (Flores-Vyeira, Raya-Pérez & Torres-Márquez, 2005).

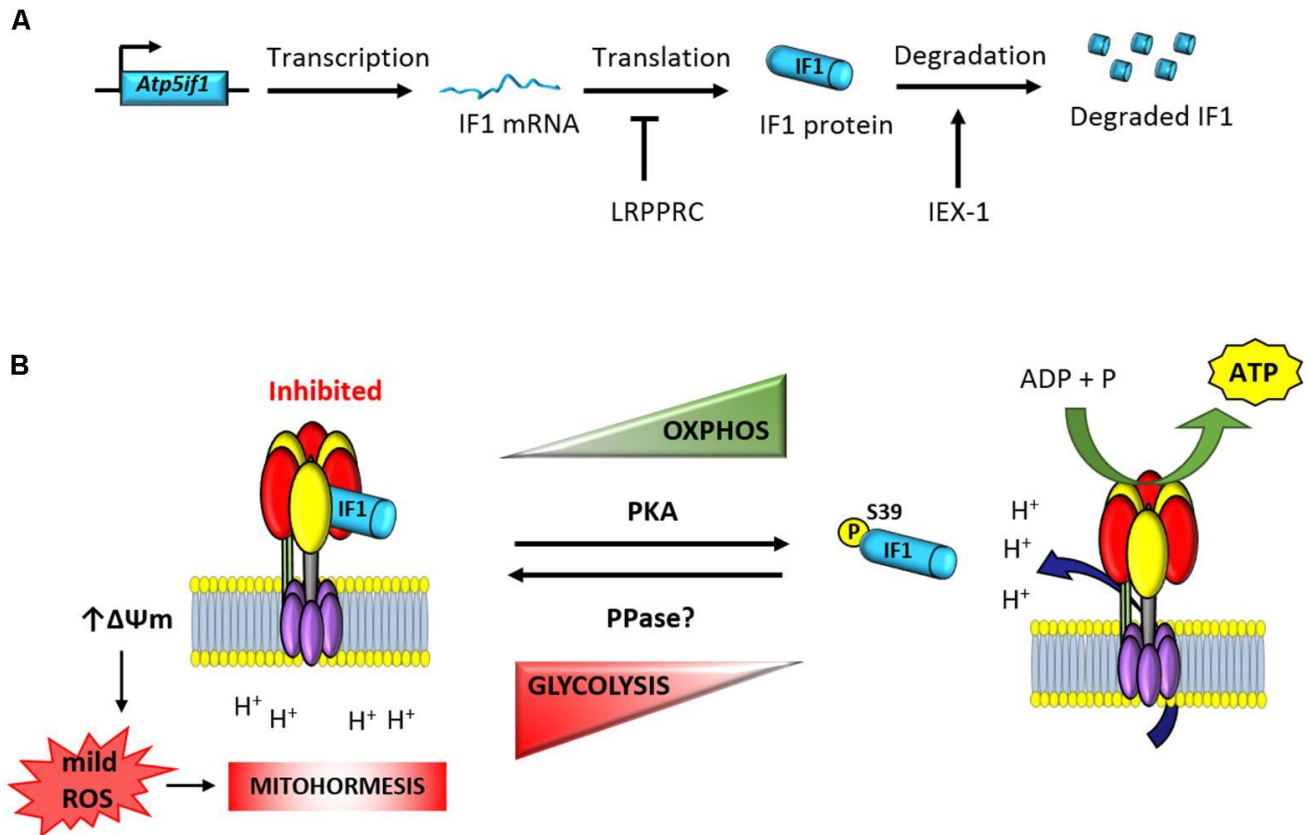


Figura 9. Regulación postranscripcional de la expresión y actividad del IF₁. **(A)** La expresión de la proteína de breve vida-media IF₁ es -específica de tejido y está regulada a nivel postranscripcional. La proteína de unión a ARNm, LRPPRC, participa en el control negativo de la expresión de IF₁. Por otra parte, IEX-1 elige al IF₁ como blanco para ser degradado. **(B)** La fosforilación de IF₁ está mediada por PKA, la cual evita su unión a la ATP sintasa. En contraste, el IF₁ desfosforilado a nivel de su serina 39 se une a la ATP sintasa y los autores proponen que inhibe la síntesis de ATP, aunque de nuevo esto no concuerda con la inhibición unidireccional del IF₁ que se ha demostrado no inhibe a la actividad de ATP sintasa sino únicamente a la de F₁F_o-ATPasa (Pullman y Monroy, 1963). En teoría, esta inhibición dispara un aumento en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la producción de ROS mitocondriales, las cuales actúan como mensajeros en la señalización de respuestas mitohorméticas* en el núcleo (imagen tomada de García-Aguilar & Cuezva, 2018).

Se han construido *knockouts* o mutantes nulas del IF₁ en ratones (Nakamura, Fujikawa & Yoshida, 2013), levaduras (Lu et al, 2001), en nemátodos (Fernández-Cárdenas et al, 2017), y más recientemente en hongos (Romero-Aguilar et al, 2021). En ninguno de los 4 casos se ha observado algún efecto fenotípico claro respecto a las cepas silvestres en cuanto a viabilidad, reproductividad ni tampoco en los parametros mitocondriales como el acoplamiento y la síntesis de ATP, salvo en condiciones de estrés muy severo por depleción de nutrientes. Sin embargo, en mutantes triples donde se removieron dos genes accesorios (STF1 y STF2) además del gen del IF₁ (INH1 en levaduras), se

observó que la triple mutante aumentó significativamente su actividad de F_1F_0 -ATPasa y el bombeo de protones hacia el espacio intermembranal mitocondrial, asociado al incremento en la actividad de la F_1F_0 -ATPasa como bomba primaria (Dienhart, Pfeiffer, Schagger & Stuart, 2002). Sin embargo el crecimiento de las levaduras en medio respiratorio permaneció sin afectación e idéntico al de la cepa silvestre (Dienhart, Pfeiffer, Schagger & Stuart, 2002). En resumen, no se ha reportado ninguna mutante nula del IF_1 con un fenotipo claro, pero en todos estos estudios no se ha tomado en cuenta que hay varias copias del gen del IF_1 en eucariontes (por ejemplo en humanos hay al menos tres copias del gen del IF_1) y además existen los genes accesorios y homólogos a los factores de estabilización (STF1 y STF2) presentes desde levadura, hasta hongos y eucariontes superiores. En consecuencia, apagar sólo un gen del IF_1 puede no tener efectos sobre el crecimiento, metabolismo respiratorio o viabilidad de los organismos por la sencilla razón de que la ausencia del gen del IF_1 se puede complementar o substituir por la expresión de otros dos genes de IF_1 o por las copias existentes de los factores STF1 o STF2, de tal manera que sólo cuando se apagaron los tres genes (INH1, STF1 y STF2) se vió un aumento claro en la actividad de F_1F_0 -ATPasa y en el bombeo de protones asociado (Dienhart, Pfeiffer, Schagger & Stuart, 2002). En resumen, sería necesario apagar todos los genes tanto del IF_1 , como los de los homólogos STF1 y STF2 en eucariontes superiores para poder ver un efecto claro en la viabilidad, reproducibilidad o crecimiento las mutantes nulas múltiples, comparadas con las cepas silvestres.

Como se observa en las **Figura 9 y 10**, el IF_1 puede ser inhibido por la PKA; esto es consistente con hallazgos previos que demuestran que la fosforilación mediada por la PKA influye en la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales. Esto se comprobó mediante una prueba OSR (Oligomycin-Sensitive Respiration) que determinó la actividad de la ATP sintasa. Para verificar que los efectos de la PKA en la OSR se debían a IF_1 y no a sus efectos en otras proteínas del sistema de fosforilación oxidativa, se realizó el experimento en células carentes de IF_1 , evidenciándose que el IF_1 desfosforilado inhibe la actividad de la ATP sintasa dependiendo de H^+ , sin embargo, nuevamente la respiración basal de las células expresando a una IF_1 mutante fue muy baja (menos de la mitad) comparada con la de las células control, de tal modo que los

datos de inhibición de respiración por oligomicina son dudosos (García-Bermúdez et al, 2015). No obstante, en este trabajo se propone que la inhibición del sistema de fosforilación oxidativa por IF₁ se equilibra por un incremento en la glucólisis aerobia. El flujo glucolítico se determinó midiendo la producción de lactato (García-Bermúdez et al, 2015). En mutantes truncas carentes de IF₁ denominadas ΔIF₁ la ausencia de este factor no provocó daños irreversibles ni significativos, excepto bajo condiciones de estrés extremo; esto probablemente se deba a que genes homólogos produzcan proteínas que puedan funcionar de forma análoga a el IF₁ y sustituirlo (Zarco-Zavala, Mendoza-Hoffmann & García Trejo, 2018).

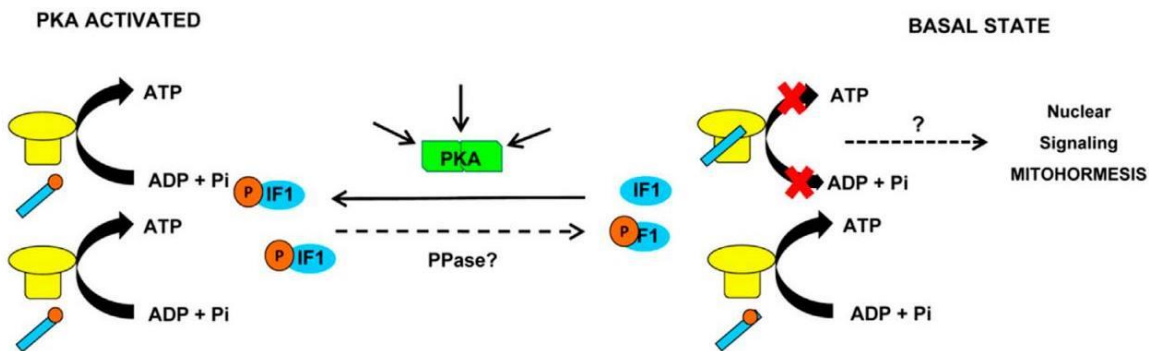


Figura 10. Las vías de señalización que convergen en la activación de PKA resultan en la fosforilación de IF₁ presente en diferentes tejidos. Una flecha rota indica la actividad putativa de una fosfatasa en un IF₁ desfosforilado. La fosforilación de IF₁ previene su interacción con la H⁺-ATP sintasa (amarillo), permitiendo así la síntesis de ATP. El IF₁ desfosforilado interactúa con la H⁺-ATP sintasa, impidiendo la hidrólisis del ATP (se propone que también la síntesis del mismo). La fracción de IF₁ desfosforilado presente en tejidos de alta demanda energética desencadena la inhibición de una fracción de la H⁺-ATP sintasa. De nuevo este esquema no se sostiene si la inhibición del IF₁ es unidireccional como lo demostraron Pullman y Monroy (1963). Sin embargo, en este trabajo se especula que la inhibición dependiente de IF₁ contribuye a la señalización de la mitohormesis a nivel intracelular (imagen tomada de García-Bermúdez et al, 2015).

Subunidad de ATP sintasa			Gen (Humano)	Longitud (aa)	Peso (kDa)	Función
Mitocondrial	Cloroplasto	Bacteriana				
α	α	α	ATP5F1A	553	59.751	Forma un hexámero $\alpha_3\beta_3$ catalítico al cual se une el Mg-ATP para ser hidrolizado en ADP y Pi
β	β	β	ATP5F1B	529	56.560	
γ	γ	γ	ATP5F1C	298	32.996	
δ	δ	-	ATP5F1D	168	17.49	Estabiliza por encima al hexámero $\alpha_3\beta_3$
ϵ	ϵ	-	ATP5F1E	51	5.780	Estabiliza al rotor o cuello central junto a la subunidad γ
a	a	a	MT-ATP6	101	10.911	Forma los hemicanales de protones en F_0 y transporta H^+ con la sub c
b	b	b	ATP5PB	256	28.909	Actúa como soporte estructural y une al dominio F_1 con F_0
c	c	c	ATP5G1	136	14.277	Funciona como rotor girando cada vez que ingresa un protón a través de la subunidad a
			ATP5G2	141	14.367	
			ATP5G3	142	14.693	
d	-	-	ATP5PD	161	18.491	Actúa como estator del dominio F_0 en el tallo periférico
e	-	-	ATP5ME	69	7.993	Desconocida. Asociadas a la subunidad a, se sugiere que le proporcionan estabilidad.
f	-	-	ATP5MF	94	10.918	
g g2	-	-	ATP5MG	103	11.428	
			ATP5MGL	100	11.037	
j	-	-	ATP5MJ	58	6.662	
k	-	-	ATP5MK	58	6.458	
6	6	-	MT-ATP6	226	24.817	Forma los hemicanales de H^+ en F_0 transportándolos hacia el anillo c
8 (AL6)	8 (AL6)	-	MT-ATP8	68	7.992	Forma parte del estator que confiere estabilidad al tallo central
F6	-	-	ATP5PF	108	12.588	Facilita la interacción entre los dominios F_1 y F_0
OSCP	OSCP	δ	ATP5PO	213	23.277	Conecta F_1 con el cuello lateral
IF ₁	-	-	ATP5IF ₁	106	12.249	Si bien no forma parte de la enzima en sí, es su inhibidor fisiológico. Es exclusivo de mitocondrias
				71	7.912	
				60	6.592	

Tabla 2. Comparación de las subunidades de las ATP sintasas de mitocondrias, cloroplasto y bacterias.

Datos tomados de www.uniprot.org/ y de <https://www.genenames.org/data/genegroup/#!/group/644>

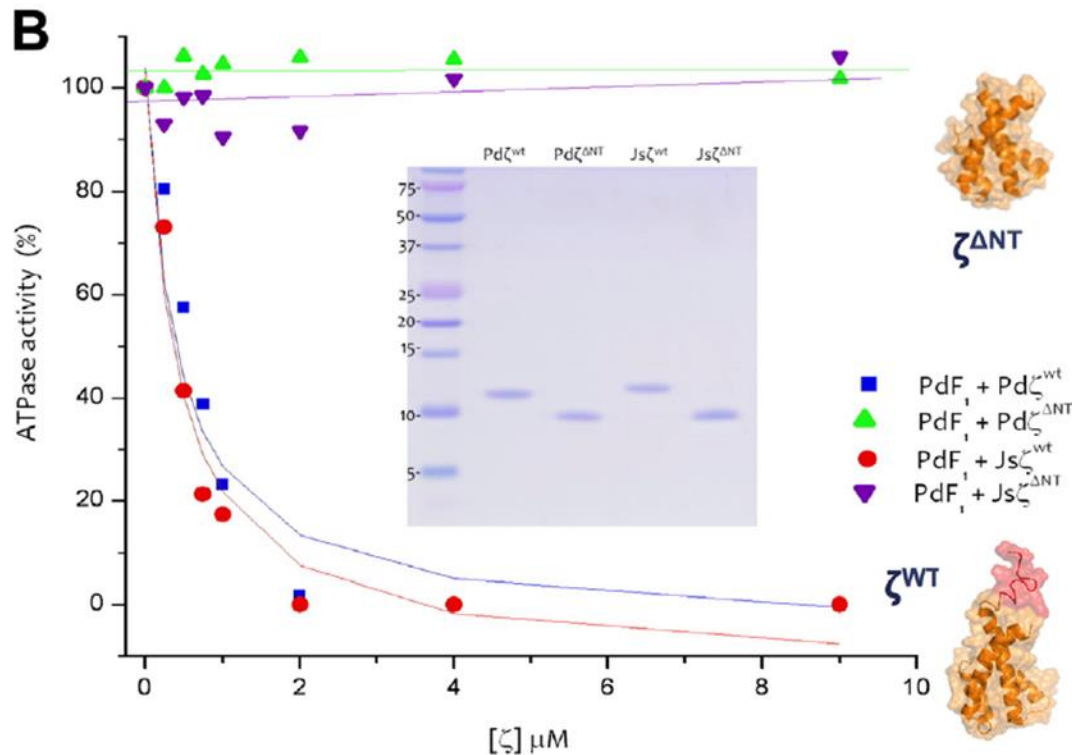


Figura 11. Demostración funcional de que la subunidad ζ es un inhibidor total de la PdF₁-ATPasa y que el N-terminal de ζ posee el dominio inhibitorio. La PdF₁-ATPasa (careciendo de las subunidades ζ y ϵ) fue pre-incubada por 10 minutos con MgATP 1mM con concentraciones crecientes de las subunidades ζ indicadas: Pd- ζ wt, Js- ζ wt, Pd- ζ nt, y Js- ζ Δnt. Las actividades obtenidas de la PdF₁-ATPasa fueron trazadas nuevamente incluyendo un inserto con SDS-PAGE desnaturizante de $\approx 0.5 \mu\text{g}$ de los recombinantes de subunidades Pd- ζ wt, Js- ζ wt, Pd- ζ Δnt, y Js- ζ Δnt purificados. El gel muestra la gran pureza de las preparaciones. La estructura obtenida por RMN de la subunidad completa Pd- ζ wt se muestra en la esquina inferior derecha con el dominio inhibitorio N-terminal en rojo, y el dominio globular 4- α -hélice en naranja. En la esquina superior derecha se muestra a Js- ζ Δnt en ausencia del dominio inhibitorio N-terminal (imagen tomada de Zarco-Zavala, Mendoza-Hoffmann & García-Trejo, 2018).

La subunidad ζ como inhibidor de la F₁F₀-ATPasa de *Paracoccus denitrificans* y demás α -proteobacterias

Pasando a la proteína inhibidora en cuestión, algunas ATP sintasas bacterianas poseen una pequeña subunidad llamada ζ . Tras un primer proceso de purificación en el que F₁ y F₁F₀ fueron aislados de la α -proteobacteria *Paracoccus denitrificans*, se descubrió una subunidad de 11 kDa de peso, adicional a las 5 canónicas α , β , γ , δ & ϵ , que se

denominó ζ y se encontró asociada tanto al dominio PdF₁ junto a las otras subunidades canónicas, α , β , δ , γ & ϵ , como al complejo PdF₁F_O completo. Se le denominó subunidad ζ porque su peso es inferior al de la subunidad más pequeña conocida hasta ese momento, la subunidad ϵ (de la Rosa-Morales, 2005).

Ya que también fue encontrada en el complejo PdF₁F_O, se contempló la posibilidad de que la subunidad ζ poseyera una función de regulación estructural en este complejo. Se sospechó de su potencial capacidad inhibitoria al observarse que co-migraba junto con el IF₁ de las ATP sintasas mitocondriales en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (de la Rosa-Morales, 2005). No obstante las diferencias estructurales que hay entre los tres inhibidores (IF₁ y las subunidades ϵ y ζ), también existen algunas similitudes; después de una degradación de Edman se descubrió que la secuencia de los primeros 15 residuos del N-terminal de la subunidad ζ son sugerentemente similares a los del dominio inhibitorio del IF₁ mitocondrial, si bien el resto de la proteína no se asemeja ni al IF₁ ni a la subunidad ϵ (de la Rosa-Morales, 2005; Morales Ríos et al, 2010; Zarco-Zavala et al, 2014).

A pesar de esta similitud, lo más probable es que la subunidad ζ no sea un ancestro evolutivo del IF₁ mitocondrial y que no guarde relación evolutiva con ϵ , dado que la mayoría de la secuencia de ζ no tiene identidad ni con la IF₁ ni con ϵ . El mecanismo inhibitorio de la subunidad ζ consiste en impedir la rotación del sub-complejo $\gamma\epsilon$ de manera similar al de IF₁, cuyo mecanismo de inhibición consiste en impedir la rotación de la subunidad γ en el rotor central al unirse cerca de un dominio conservado llamado DELSEED en la interfaz α/β (García-Trejo et al, 2016). A pesar de esta similitud, lo más probable es que la subunidad ζ no sea un ancestro evolutivo del IF₁ mitocondrial y que no guarde relación evolutiva con ϵ . El mecanismo inhibitorio de la subunidad ζ consiste en impedir la rotación del sub-complejo $\gamma\epsilon$ de manera similar al de IF₁, cuyo mecanismo de inhibición consiste en impedir la rotación de la subunidad γ en el rotor central al unirse a un dominio conservado llamado DELSEED en la interfaz α/β (García-Trejo et al, 2016).

Mediante mutantes truncas en el N-terminal se demostró que dicho extremo de la subunidad ζ es la región con actividad inhibitoria, puesto que en mutantes carentes de

éste (denominadas Pd- $\zeta^{\Delta NT}$ y Js- $\zeta^{\Delta NT}$) se perdía toda capacidad inhibitoria aunque aún se detectaba la unión entre la subunidad ζ y la PdF₁-ATPasa (Zarco-Zavala et al, 2014). Sin embargo, el efecto inhibitorio de esta subunidad requiere de la presencia de Mg-ATP. Esto se supo tras haber evaluado la capacidad inhibitoria de un extracto rico (pero no completamente puro) en subunidad ζ y observarse una inhibición parcial. Por lo tanto para que haya una inhibición plena por parte de la subunidad ζ se requieren ciertos cambios rotacionales en la ATP sintasa acoplados a la hidrólisis del Mg-ATP. Del mismo modo, la proteína mutante truncada de *Jannaschia sp.* carente de los 19 aminoácidos en su N-terminal igualmente fue capaz de inhibir a la PdF₁-ATPasa, mientras que la variante WT ζ (Js ζ^{WT}) fue tan buena inhibidora como la Pd- ζ . Tal como se puede observar en la **Figura 11**, la presencia de la subunidad ζ disminuye drásticamente la actividad de la ATP sintasa.

En las mutantes ΔNT (Pd- $\zeta^{\Delta NT}$ y Js- $\zeta^{\Delta NT}$), el plegamiento no se vió afectado por la remoción de residuos de aa, esto se concluye al observar que las estructuras resueltas por NMR de las subunidades Pd- ζ y Js- $\zeta^{\Delta NT}$ se sobrepone perfectamente (Zarco-Zavala, 2013, 2014, 2018; García-Trejo, 2015,2016; Mendoza-Hoffmann, 2018a). Por lo tanto, la proteína truncada Js- $\zeta^{\Delta NT}$ mantuvo su estructura cuaternaria original. Se concluye entonces que los primeros 14 residuos del N-terminal de ζ conforman el dominio inhibitorio de dicha subunidad.

Dado que inicialmente se obtuvo un cristal del complejo PdF₁ pero carente de la subunidades ζ , γ , δ y ϵ , cristalizando sólo el par α/β de la PdF₁-ATPasa de *P. denitrificans* (Morales-Ríos et al, 2015) se procedió en el laboratorio del Dr. García trejo a buscar el sitio de unión de la subunidad ζ en la PdF₁-ATPasa mediante modelado y acoplamiento molecular (docking), alineamiento entre la ζ y el IF₁ mitocondrial, experimentos de entrecruzamiento químico y reconstitución homóloga y heteróloga de competencia entre el IF₁ y la ζ por la inhibición de la PdF₁-ATPasa (García-Trejo et al, 2015, 2016).

Con estos experimentos se demostró que el IF₁ y la subunidad ζ compiten por el mismo sitio de unión a la PdF₁-ATPasa para inhibirla y que ζ interacciona con las subunidades α , β y γ , por lo cual se determinó que el sitio de unión de la subunidad ζ se localiza en la

misma interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$ homóloga a la de la F_1 -ATPasa mitocondrial (García-Trejo, et al, 2015, 2016). En este mismo trabajo, se descifró el mecanismo de inhibición que implica, de manera similar a IF_1 , un mecanismo ERAHL (Entrance, Rotation, α -Helix formation & Lock) es decir, entrada por la interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$, rotación de γ/ϵ acoplado a la unión/hidrólisis de Mg-ATP, transición del N-terminal de la subunidad ζ de intrínsecamente desordenado a α -hélice y, por último, la formación de un seguro molecular o freno de la rotación por la unión final inhibitoria de la subunidad ζ a la interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$ (García-Trejo, et al, 2015, 2016; Zarco-Zavala et al, 2018; Mendoza-Hoffmann, et al, 2018b). Finalmente, en estos mismos trabajos se propuso inicialmente que la subunidad ζ debe funcionar por un mecanismo de ñeta-trinquete o matraca, dado que así permitiría el giro del rotor en el sentido de la síntesis del ATP, pero bloquearía de manera unidireccional la hidrólisis del mismo (García-Trejo et al, 2016).

Más adelante este mecanismo sería comprobado por el mismo grupo de trabajo del Dr. García Trejo con la generación de una mutante nula o *knockout* de la subunidad ζ en *Paracoccus denitrificans* (Mendoza-Hoffmann, et al, 2018b). Este mecanismo y sitio de unión de la subunidad ζ se confirmó con la estructura cristalográfica del complejo PdF_1F_0 , donde se resolvieron solamente los dominios N- y C-terminales de la subunidad ζ unida a la PdF_1F_0 y se observó, tal como predijeron García-Trejo et al (2015, 2016) que la subunidad ζ se une de manera análoga a la subunidad IF_1 mitocondrial, en la misma interfaz y adoptando una estructura de α -hélice (Morales-Ríos et al, 2016).

En resumen, el mecanismo ERAHL de la subunidad ζ consiste en ingresar a la ATP sintasa a través de la apertura en la interfaz α_E/β_E , donde dos rotaciones parciales de 120° de γ/ϵ producidas por la hidrólisis de MgATP la acoplan a su posición inhibitoria final. Usando mutantes trucas ΔNT se demostró que es el N-terminal de ζ el que ingresa a la interfaz catalítica para obstruir su rotación de manera similar a como IF_1 se une a la interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$ para bloquearla e inhibir a la F_1F_0 -ATPasa mitocondrial (Zarco-Zavala, Mendoza-Hoffmann & García Trejo, 2018). Finalmente se demostró que la subunidad ζ trabaja por un mecanismo unidireccional de inhibición en donde solamente inhibe la actividad de PdF_1 -ATPasa o PdF_1F_0 -ATPasa, sin inhibir la

actividad y rotación del nanomotor en el sentido de la PdF₁F₀-ATP sintasa este mecanismo se denominó de uñeta-trinquete (García-Trejo et al, 2016; Mendoza-Hoffmann et al, 2018a, 2018b),

En *Paracoccus denitrificans* la subunidad ϵ no posee actividad inhibitoria sobre la PdF₁-ATPasa ni sobre la PdF₁F₀-ATPasa, lo cual sugiere que en el mecanismo de regulación de la ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans*, la subunidad ϵ no está involucrada, y en su lugar la función inhibitoria es realizada por la subunidad ζ (Morales-Ríos, 2010; Zarco-Zavala, 2014). Esto se combinó con los resultados de la construcción de una mutante nula p “knockout” denominada Pd $\Delta\zeta$, que permitió dilucidar los efectos de la ausencia de subunidad ζ .

Al hacérsele crecer en succinato (un medio estrictamente respiratorio) se observó, en comparación con la cepa silvestre (PdWT), un retraso en el crecimiento de la cepa mutante de *P. denitrificans* carente de ζ (Pd $\Delta\zeta$), donde el ATP proviene en su totalidad de la ATP sintasa. Por otro lado, en medio rico (LB), no hubo diferencias entre el crecimiento de la cepa silvestre (PdWT) y la cepa mutante (Pd $\Delta\zeta$). Esto significa que la subunidad ζ es una proteína crucial para el crecimiento respiratorio de la bacteria y conforma el primer fenotipo diferente entre una mutante nula de un inhibidor de la ATP sintasa y su correspondiente cepa silvestre (Mendoza-Hoffmann et al, 2018b). Esto debido a que otras mutantes nulas del IF₁ en ratón (Nakamura, et al, 2013), y levadura (Lu et al, 2001), nemátodos (Fernández-Cárdenas, 2017) y hongos (Lucero et al, 2021) no muestran diferencia significativa alguna en el crecimiento, reproducción y parámetros bioenergéticos o mitocondriales respecto a las cepas silvestres. Esto primeramente se interpretó como si el papel del IF₁ fuese fisiológicamente mínimo; sin embargo, a la luz de nuestra mutante Pd $\Delta\zeta$, donde se muestra la primera mutante nula de un inhibidor natural de la F₁F₀-ATPasa con un fenotipo diferente a su cepa silvestre, se demostró así que estos inhibidores sí poseen un efecto fisiológico importante en condiciones respiratorias, y que el efecto nulo de las mutantes Δ IF₁ o Δ INH en eucariontes se deben seguramente a que apagaron un solo gen del IF₁; mientras que existen al menos dos genes accesorios (STF1 y STF2) además de una o dos copias del gen del IF₁ en eucariontes, de tal modo que apagar un solo gen no tiene ningún

efecto en la fisiología de los eucariontes simplemente porque la ausencia de un gen de IF_1 se complementa o se substituye con los otros genes de IF_1 , STF1 o STF2 que existen desde levaduras y hongos hasta eucariontes más complejos.

En el caso de *Paracoccus denitrificans*, existe una sola copia del gen Pden_2826 que codifica para la subunidad ζ en el cromosoma 2 de la bacteria, hallándose localizado fuera del operón ATP de la ATP sintasa, como corresponde a un gen regulatorio. Por lo tanto, la remoción del gen (y por consiguiente la subunidad ζ), sí tiene un efecto fenotípicamente definido, al no haber copias idénticas ni homólogas de ningún otro gen que codifique para una proteína que la pueda complementar o substituir (Mendoza-Hoffmann et al, 2018a, 2018b; Zarco-Zavala, 2018). En la mutante Pd $\Delta\zeta$ construida en el laboratorio del Dr. García Trejo y del Dr. Miguen Ángel Cevallos Gaos del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM (CCG), se observó además un incremento en las actividades de la Pd F_1 -ATPasa y la bomba de H^+ Pd F_1F_0 -ATPasa aunque la actividad de la ATP sintasa no se vió comprometida, esto además de experimentos de reconstitución de un exceso de ζ en la Pd F_1F_0 -ATPasa y ATP sintasa, mostraron que la subunidad ζ sólo inhibe la actividad de Pd F_1F_0 -ATPasa, dejando intacta la actividad de Pd F_1F_0 -ATP sintasa. Es decir que se comprobó la predicción del laboratorio del Dr. García Trejo, de que la subunidad ζ funciona como un inhibidor unidireccional, o ñeta-trinquete o matraca, permitiendo la síntesis del ATP, pero inhibiendo de manera selectiva la actividad de Pd F_1F_0 -ATPasa (García-Trejo et al, 2015, 2016; Mendoza-Hoffmann et al, 2018a, 2018b; Zarco-Zavala et al, 2018). Esto explica por qué la concentración de ATP intracelular disminuyó a la mitad en el crecimiento de la cepa mutante Pd $\Delta\zeta$, mas no así en la cepa silvestre PdWT en medio respiratorio, dado que al remover la subunidad ζ , se permitió la hidrólisis del ATP por la actividad de Pd F_1F_0 -ATPasa (Zarco-Zavala, Mendoza-Hoffmann & García-Trejo, 2018).

Cabe mencionar que en otro laboratorio como es el de la Dra. Judy Hirst (Varghese et al., 2018) construyeron una mutante nula de ζ en *Paracoccus denitrificans* similar a la obtenida por Mendoza Hoffmann et al., (2018b). Sin embargo, esta otra mutante no es idéntica a la de Mendoza-Hoffmann et al., (2018b), dado que Varghese et al. (2018) construyeron una mutante múltiple en la que removieron 8 genes de operones de

hidrogenasas además de remover el gen de ζ , por lo tanto, su múltiple mutante no sólo es Pd $\Delta\zeta$ como la de Mendoza Hoffmann et al (2018b), sino que es Pd Δ Hyd $\Delta\zeta$. Debido a esto, por complementación entre las 9 deleciones, su mutante tiene un fenotipo idéntico a la cepa silvestre (PdWT), dado que creció igual que la cepa silvestre PdWT en medio respiratorio de succinato (Varghese et al., 2018). Además, la mutante Pd Δ Hyd $\Delta\zeta$ también carece de resistencia a algún antibiótico como marcador de selección, impidiendo la confirmación de que los crecimientos y actividades observadas por (Varghese et al., 2018) sean efectivamente de la cepa mutante Pd Δ Hyd $\Delta\zeta$, y no de la cepa silvestre PdWT. En resumen, la mutante Pd Δ Hyd $\Delta\zeta$ de Varghese et al (2018) no es una construcción clara e inambigua que permita analizar el efecto de la remoción de ζ , dado que carece de otros 8 genes además del gen de ζ (Varghese et al, 2018). En el caso de la cepa Pd $\Delta\zeta$ (Mendoza-Hoffmann et al, 2018b), además de tener el marcador de resistencia a kanamicina sustituyendo al gen de ζ , en esta cepa no se removió ni se mutó ningún otro gen, pero a diferencia de la de Varghese et al., (2018), la cepa Pd $\Delta\zeta$ creció muy deficientemente en medio de succinato, además de que disminuyó a la mitad su concentración intracelular de [ATP], comparado con la cepa silvestre. El hecho de que en la cepa Pd $\Delta\zeta$ no se modificó ningún otro gen, además de la remoción del gen de ζ , se corroboró por experimentos de complementación con la inserción del gen silvestre de ζ en un plásmido de expresión controlada, logrando “curar” a la cepa Pd $\Delta\zeta$ o revertir sus fenotipos de crecimiento retrasado y disminución de la concentración de ATP. Es decir, la cepa Pd $\Delta\zeta$ complementada con el gen de ζ (denominada Pd $\Delta\zeta$ + ζ), creció prácticamente igual a la cepa silvestre en medio respiratorio de succinato y mantuvo sus niveles de concentración de [ATP] intracelular idénticos a los de la cepa silvestre PdWT (Mendoza-Hoffmann et al, 2018b). Si el crecimiento lento y la baja [ATP] de la cepa Pd $\Delta\zeta$ se debieran a mutaciones inespecíficas en otros genes diferentes al de ζ , la complementación con el gen silvestre de ζ en la cepa Pd $\Delta\zeta$ + ζ **no** hubiera revertido los fenotipos de crecimiento lento y baja [ATP], pero el hecho de que la cepa Pd $\Delta\zeta$ + ζ recuperó casi por completo el fenotipo silvestre comprueba que las construcciones Pd $\Delta\zeta$ y Pd $\Delta\zeta$ + ζ son las construcciones correctas e idóneas para poder obtener resultados claros y concluyentes respecto a la función biológica de la subunidad ζ .

Las similitudes en los mecanismos de inhibición de IF_1 y las subunidades ϵ y ζ sugieren que todos funcionan a modo de “uñeta-trinquete” unidireccional que impide la actividad “hacia adelante” de la ATP sintasa, pero no en el sentido contrario; es decir, se bloquea la síntesis de ATP mas no su hidrólisis. Se han propuesto dos mecanismos posibles (García-Trejo et al, 2015, 2016):

1. Mecanismo de uñeta-trinquete conformacional: Para bloquear la rotación en sentido anti horario de la subunidad γ , el N-terminal de ζ se inserta profundamente en la interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$ de donde es liberado hacia el medio acuoso por el gradiente de protones y las energías de unión de ADP/Pi.
2. Mecanismo de uñeta-trinquete mecánico: La subunidad ζ se mantiene en su posición inhibitoria en la interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$, al mismo tiempo que la subunidad γ gira gracias a la energía proporcionada por el gradiente de protones y las energías de unión de ADP/Pi.

Falta resolver cuál de estos dos mecanismos es el que funciona en la ATP sintasa de *P. denitrificans*, pero es claro que es un mecanismo de uñeta-trinquete o matraca, y debe ser el mismo el que utilizan tanto el IF_1 como la subunidade ϵ en las bacterias donde esta última es inhibitoria (por ejemplo, *Escherichia coli*). Es importante mencionar que la subunidad ζ es esencialmente exclusiva de las α -proteobacterias y su N-terminal altamente móvil es uno de los dominios más conservados en la subunidad ζ en este tipo de bacterias (Zarco-Zavala, Mendoza-Hoffmann & García-Trejo, 2018).

Generalidades sobre la α -proteobacteria *Paracoccus denitrificans*

Las α -proteobacterias pertenecen a una clase de proteobacterias muy diversa tanto en su fisiología como en su distribución y modo de vida. El ancestro de las mitocondrias también forma parte de esta clase (Ferla et al, 2013). Entre ellas existe un orden denominado *Rhodobacterales*, al cual pertenece *Paracoccus denitrificans*, un coco extremófilo Gram-negativo, no-móvil, capaz de reducir nitratos y que se caracteriza por ser muy flexible a nivel metabólico (Baker et al, 1998). Se ha demostrado formalmente que *Paracoccus denitrificans* se asemeja a la mitocondria más que otras bacterias a

nivel de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa (excepto por el género *Rickettsia* que también pertenece a las α -proteobacterias y es más similar en su ADN al ADN mitocondrial). Se teoriza que la membrana interna mitocondrial surgió, evolutivamente hablando, de una transición de la membrana plasmática de una bacteria aerobia ancestral similar a *Paracoccus denitrificans* (John & Whatley, 1975). Otro de sus rasgos característicos es la flexibilidad de su cadena de electrones, la cual contiene varias deshidrogenasas, oxidasas y reductasas inducibles por distintos factores. Con excepción de todos los aspectos funcionales de sus distintos citocromos tipo *c*, se conocen bien las secuencias de sus acarreadores de electrones y la estequiometría de su mecanismo de transducción de energía (van Verseveld & Bosma, 1987).

Paracoccus denitrificans puede subsistir a base de compuestos de 1 carbono como el metanol y la metilamina debido a que consigue oxidarlos a formaldehído (mediante la metanol-deshidrogenasa o metilamin-deshidrogenasa; ambas utilizan al cofactor PQQ) y posteriormente a CO₂ por la vía del formiato. Obtiene su biomasa al fijar el CO₂ por la vía del bifosfato de ribulosa. Esta capacidad de catalizar reacciones rédox se debe a que *Paracoccus denitrificans* puede sintetizar al menos 10 tipos distintos de citocromos *c*; cinco de ellos se localizan en el periplasma y cinco en la membrana citoplasmática. La síntesis de algunos de estos citocromos es dependiente de las condiciones del medio y se induce en función de la fuente de carbono disponible (por ejemplo; los citocromos *c551i* y *c5531* solo son sintetizados cuando la bacteria crece en un medio con metanol, metilamina o colina, mientras que otros solo se sintetizan en condiciones de escasez de oxígeno o con nitrato como aceptor de electrones).

Paracoccus denitrificans ha sido considerado un organismo modelo, pues es capaz de crecer en ambientes aerobios y anaerobios y posee la versatilidad de obtener energía tanto de compuestos orgánicos (tales como la metilamina y el metanol), como inorgánicos (tales como el hidrógeno, el tiosulfato, algunos sulfuros y el azufre) (Harms & van Spanning, 1991; Baker et al, 1998). Se le ha usado como referencia para identificar nuevas especies de *Paracoccus*, siendo *Paracoccus denitrificans* la especie tipo de su género y también suele utilizarse como ejemplo de un microorganismo capaz de metabolizar compuestos azufrados. Asimismo se conocen algunas cepas

quimiolitautótrofas capaces de utilizar disulfuro de carbono, tiocianatos, sulfonatos y sulfuro de carbonilo como fuentes de energía (Kelly et al, 2006).

Tal como su nombre lo indica, *Paracoccus denitrificans* puede reducir tanto los nitratos como los nitritos en un proceso llamado desnitrificación en el que pueden utilizar tanto óxido nítrico como óxido nitroso como aceptores finales de electrones. En este sentido, es similar a otra bacteria llamada *Thiosphaera pantotropha*, tanto que incluso se llegó a proponer que esta pasara a llamarse *Paracoccus pantotropha* ya que sus ARNr 16S son idénticos. En comparación con *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas stutzeri*, *Paracoccus denitrificans* fue la bacteria que más ATP obtuvo mediante la desnitrificación en medios ricos en óxido nitroso, nitrato y nitrito de sodio y óxido nítrico; inclusive fue capaz de oxidar amoníaco a nitrito para luego reducirlo en condiciones de crecimiento anaerobio. Además, de las tres especies evaluadas, fue la que generó mayor producción de células, con 78 g/mol de nitrato (Carlson & Ingraham, 1983; Stouthamer et al, 1997). Se sabe que para metabolizar distintos compuestos nitrogenados, posee enzimas como la nitrato-reductasa, nitrito-reductasa, óxido nítrico-reductasa y óxido nitroso-reductasa. Además, el metabolismo de compuestos nitrogenados se lleva a cabo en la membrana periplásmica y en el citoplasma de *P. denitrificans*, donde las enzimas ya mencionadas requieren de cofactores como molibdeno, hierro y cobre. Aunque se desconoce el mecanismo de control de los genes que codifican para éstas enzimas, se ha descubierto que el O₂ inhibe la reducción del nitrato. Asimismo, distintas enzimas como las reductasas y las oxidasas pueden competir por el suministro de electrones de las deshidrogenasas primarias o del ubiquinol, y el óxido nitroso formado a partir del nitrito puede inhibir a las oxidasas (citocromos), resultando en una redistribución en el flujo de electrones (Stouthamer, 1991).

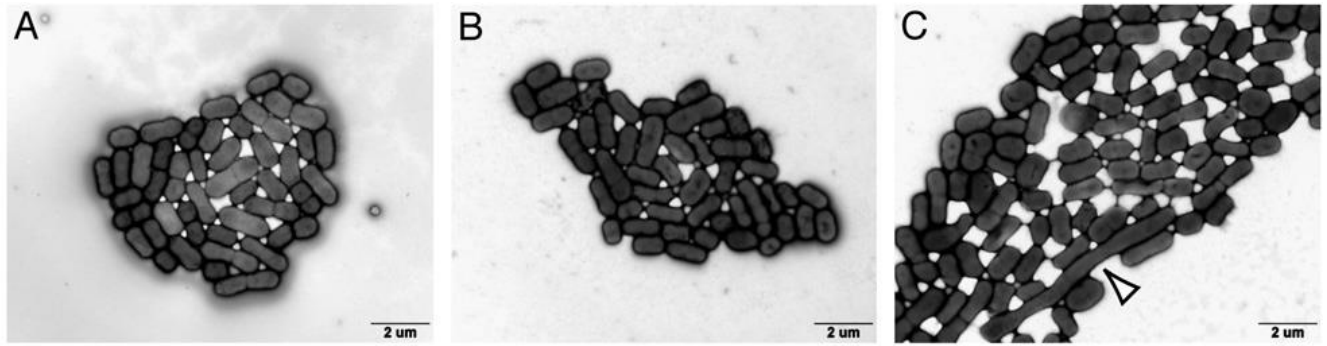


Figura 12. Células de *P. denitrificans* tras ser incubadas en hiperaceleración. Imágenes de microscopio de transmisión de electrones de células de *P. denitrificans* tras incubación a 30° C y 1 x g por 4 h (A) y 134,425 x g por 48 h (B y C). (C) Ocasionalmente, se observaron células altamente alargadas al incubarse a 134,425 x g (flecha blanca). Imágenes tomadas de Deguchi et al, 2011).

Aunado a esto, *Paracoccus denitrificans* puede crecer en condiciones de gravedad extrema como se observa en la **Figura 12**. (Deguchi et al, 2011). También es capaz de crecer en condiciones de temperaturas elevadas, para ello sus proteínas han logrado estabilizarse mediante mecanismos que incluyen un gran número de interacciones iónicas, giros más cortos entre elementos estructurales secundarios y un empaquetamiento más apretado de regiones hidrofóbicas. (Guo, Suzuki & Rubinstein, 2019). Por esto, *Paracoccus denitrificans* ha sido utilizado como modelo para la investigación en mecanismos de transducción energética en bacterias, con especial énfasis en los genes involucrados en la formación de los complejos proteicos de la cadena respiratoria y del transporte periplásmico de electrones. Se sabe que los citocromos de *P. denitrificans* son los encargados de la desnitrificación, con al menos 40 genes involucrados (y otros 20 para la oxidación de compuestos como el metanol). Se cree que esta superfamilia de proteínas deriva de un ancestro común (Stouthamer, 1992; Steinrücke & Ludwig, 1993).

Es interesante mencionar que la ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans* fue de las últimas F-ATP sintasas en purificarse (de la Rosa-Morales, 2005; Morales-Ríos et al, 2014) y cristalizarse (Morales Ríos et al, 2015, 2016). Esta enzima solo puede sintetizar ATP y la inhibición de la hidrólisis del mismo involucra al inhibidor ζ , exclusivo de α -proteobacterias como ya se había mencionado anteriormente. Se escogió a *P. denitrificans* como modelo de estudio porque está filogenéticamente relacionado al

protoendosimbionte que dió origen a las mitocondrias actuales. Además, la ATP sintasa de *P. denitrificans* presenta una propiedad sumamente interesante: es una enzima prácticamente unidireccional, pues sintetiza ATP con una velocidad mucho mayor a la que lo hidroliza, aproximadamente 20 – 60 veces, lo que se ha atribuido a su subunidad ζ (Zarco-Zavala et al, 2014; Zarco-Zavala, Mendoza-Hoffmann & García-Trejo, 2018).

Mediante modelado molecular y experimentos de competencia de ζ vs IF₁, se demostró que la subunidad ζ de *P. denitrificans* se une en la misma interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$ que el IF₁ en la ATP sintasa mitocondrial, y se propuso que ζ debería adoptar una forma de α -hélice inhibitoria como el IF₁. Además, en este mismo trabajo (García-Trejo et al, 2015, 2016) se propuso que ζ debe funcionar como matraca o uñeta trinquete, inhibiendo únicamente la actividad de F-ATPasa sin afectar la de F-ATP sintasa (García-Trejo et al, 2016). En paralelo, por cristalografía de rayos X con una resolución de 4 Å se corroboraron estas predicciones y se confirmó que la subunidad ζ se une al dominio F₁ mediante los residuos 1 – 19 de la α -hélice del N-terminal de una manera similar a como se unen las regiones IF₁ inhibitorias de F₁-ATP sintasas de bovino y de levadura (Morales Ríos et al, 2015b).

La subunidad ζ de *Paracoccus denitrificans* es una homóloga a nivel funcional del IF₁ de células eucariontes, aunque no se ha demostrado que ζ e IF₁ sean proteínas homólogas relacionadas filogenéticamente. La ATP sintasa de esta bacteria impide la hidrólisis de ATP gracias al mecanismo de ζ de uñeta-trinquete (García-Trejo et al, 2016). Otras bacterias como *Caldalkalibacillus thermarum* y *Mycobacterium tuberculosis* también presentan una escasa hidrólisis ATP, aunque se teoriza que esto se debe a una conformación singular de su subunidad γ o a que se inhibe por una muy lenta liberación de ADP. En contraste, Guo et al, (2020) han descubierto que unas extensiones con forma de gancho de la subunidad α de la ATP sintasa de *M. smegmatis* evitan que la enzima vaya en reversa, previniendo así la hidrólisis de ATP y preservando su energía en condiciones hipóxicas.

Como se mencionó anteriormente, en una cepa mutante carente de 8 genes de hidrogenasas y de la subunidad ζ denominada Pd Δ Hyd Δ ζ , se interpretaron erróneamente los resultados obtenidos, dado que, contrario a lo observado por el

laboratorio del Dr. García Trejo (Mendoza-Hofmann et al, 2018) la ausencia total de esta subunidad, aparentemente no activó sustancialmente la hidrólisis del ATP (Varghese et al, 2018).

En comparación con las F-ATPasas de mamíferos y de *E. coli*, la hidrólisis de ATP de *Paracoccus denitrificans*, tras haber removido la subunidad ζ , “aparentemente” se vio incrementada menos de dos veces, por lo que los autores (Varghese et al, 2018) interpretaron que la remoción de esta subunidad no tiene efecto significativo sobre la cantidad de ATP hidrolizado por la enzima. No obstante, las medidas de actividad de ATPasa de este trabajo fueron hechas en presencia de una alta concentración de sulfito, el cual inhibe a las enzimas acoplantes del sistema regenerador de la medida de actividad de ATPasa (García-Trejo, J.J. datos no publicados), en particular a la piruvato cinasa a concentraciones > 3 mM, y en el trabajo de Varghese et al (2018) usaron 10 mM de sulfito en su ensayo acoplado de actividad de ATPasa. Adicionalmente, las preparaciones enzimáticas fueron sometidas a ciclos de congelación/descogelación, originando pérdida de actividad de las enzimas PdF₁-ATPasa y PdF₁F₀-ATPasa. En contraste, nuestras determinaciones de actividad de la PdF₁-ATPasa se obtuvieron de inmediato al purificar a la enzima sin congelarla, mostrando una activación de 2-6 veces de PdF₁F₀-ATPasas y de PdF₁-ATPasa. Por lo tanto, Varghese et al (2018) no vieron la activación de 2-6 veces en la mutante Pd $\Delta\zeta$ e interpretaron que la falta de activación al remover la subunidad ζ se debía a que el C-terminal de la subunidad ϵ adoptaba una conformación inhibitoria que bloquea la hidrólisis del ATP en ausencia de la subunidad ζ tal como se atestiguó en *E. coli* (Varghese et al, 2018). Sin embargo, Morales-Ríos et al (2010) y Zarco-Zavala (2014) demostraron en varios experimentos funcionales de reconstitución homóloga que la subunidad Pd- ϵ no participa en la inhibición de la PdF₁ ni PdF₁F₀-ATPasa, apoyando con todas estas evidencias que la subunidad ζ es un potente inhibidor unidireccional tipo uñeta-trinquete de la PdF₁-ATPasa y de la PdF₁F₀-ATPasa, y que tiene un papel crucial en el crecimiento respiratorio de *Paracoccus denitrificans*. Con base en estos resultados se patentó una mutante Pd $\Delta\zeta$ para posibles aplicaciones de desnitrificación de aguas potables y aguas tratadas (García Trejo, Mendoza Hoffmann, & Cevallos Gaos, patente en trámite).

Retomando el tema del singular metabolismo de *Paracoccus denitrificans*, es algo distintivo que sus aparatos de fosforilación oxidativa compartan tantas similitudes con los de las mitocondrias (Ferguson, 2018). Luego de que John y Whatley destacaran a *P. denitrificans* en 1975, se hizo notorio que esta, durante mucho tiempo relegada especie bacteriana, poseía una capacidad metabólica sumamente interesante y llamativa. Lo primero que llamó su atención fue que *P. denitrificans* posee dos óxido-reductasas distintivas; la óxido-reductasa de flavoproteína-ubiquinona (ETF-UQ) de transferencia de electrones y la oxidasa de sulfito periplásmica dependiente de Mo^{+2} . De igual manera, los citocromos c_1 mitocondriales comparten muchas similitudes con los de α -proteobacterias como *Paracoccus* y *Rhodobacter*, más específicamente a nivel de sus Holo Citocromo *c* Sintetas (HCCS), responsables de la unión post-traducciona de un grupo hemo a un polipéptido para generar un citocromo tipo *c*.

Bacterias como *Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodobacter capsulatus* poseen complejos respiratorios muy parecidos a los de las mitocondrias, aunque con menos subunidades. En *P. denitrificans*, la fosforilación oxidativa es similar a la de los eucariontes porque su cadena respiratoria es parecida a la de las mitocondrias. Una serie de enzimas asociadas a membrana mejor conocidas como complejos respiratorios, llevan a cabo la transferencia de electrones por lo general el último aceptor de electrones en esta cadena es una molécula de O_2 que a su vez termina convirtiéndose en dos moléculas de agua. No obstante, el O_2 también puede sufrir reacciones secundarias que derivan en la formación de superóxidos o especies reactivas de oxígeno (EROs) que comprometen la integridad celular al degradar al ADN, ARN, lípidos, proteínas etc. Los mismos complejos respiratorios son susceptibles al estrés oxidativo (Sedláček & Kučera, 2019). Otro aspecto destacable de *P. denitrificans* es la peculiaridad de sus biopelículas; aunque se sabe que la mayoría de las bacterias forman biopelículas, matrices de polisacáridos habitadas por comunidades de una o más especies de microorganismos, la de ésta especie en particular (un coco Gram negativo no móvil) es delgada (de alrededor de 4 μm de espesor en una interfaz líquido-aire) debido a una gran proteína de superficie denominada BapA (Proteína asociada a biopelícula-A) regulada por monofosfato de diguanosina cíclico (c-di-GMP), un mensajero secundario involucrado en la formación de biopelículas en muchas

bacterias, sin embargo también es capaz de formar biopelículas gruesas. Las proteínas Bap son un grupo de adhesinas monoméricas repetitivas que en bacterias Gram negativas se componen de tres dominios: Un N-terminal, un largo núcleo de monómeros repetidos en tándem y un N-terminal, en su conjunto pueden medir de 1873 a 8682 aa. Suelen ubicarse en la superficie de las células y median la adhesión célula-superficie y célula-célula. En bacterias Gram negativas, las Baps son secretadas del citoplasma al medio extracelular mediante sistemas de secreción Tipo I. Es necesario que haya Ca^{+2} en el medio pues las adhesinas contienen repeticiones de péptidos ricos en aspartato-glicina cuyos C-terminales se unen a un ión Ca^{+2} (Morinaga et al, 2020; Yoshida et al, 2017). El Quórum Sensing (QS) es un proceso de comunicación bacteriano de célula a célula que depende de la producción, detección y respuesta a moléculas de señalización extracelulares llamadas autoinductores. El QS permite a comunidades de bacterias de la misma especie o de distintas especies, sincronizarse unas con otras y modificar su comportamiento para responder a estímulos externos como la presencia de fuentes de carbono, sustancias citotóxicas y otras condiciones desfavorables. No obstante, las bacterias que habitan en biopelículas suelen ser más resistentes a estrés ambiental (como variaciones bruscas de pH, choque osmótico o luz UV) que sus contrapartes de vida libre (Mukherjee & Bassler, 2019). El QS inhibe la formación de biopelículas en *P. denitrificans*. La señal de QS en esta bacteria es hidrofóbica y se transmite a través de vesículas en las membranas celulares. Una biopelícula comienza a formarse cuando una o algunas células colonizadoras se adhiere a una superficie (adherencia inicial), tras lo cual viene la adherencia irreversible; cuando las células comienzan a segregar proteínas y exopolisacáridos (EPS) como la fibrina y el alginato, además de lectinas y ácidos nucleicos extracelulares (ADNe). (Morinaga et al, 2020; Vestby, Grønseth, Simm & Nesse, 2020). La formación de biopelículas se ve acelerada si la bacteria posee flagelos o pili, pues fomenta la generación de microcolonias que se extienden rápidamente por la superficie en donde se han adherido. *Pseudomonas aeruginosa* es ampliamente destacada a nivel clínico por esto gracias a su proteína de adhesión LapA. En cambio, poco se sabe sobre cómo bacterias Gram negativas no móviles forman biopelículas. Por otro lado, es sabido que el óxido nítrico (NO) regula el nivel de BapA que involucra a c-di-GMP, ya que por

ejemplo, en *Pseudomonas aeruginosa*, la acumulación de éste abate la movilidad celular a la vez que fomenta la producción de EPS. Asimismo, las células tienden a dispersarse de las biopelículas cuando el c-di-GMP es degradado por acción de las fosfodiesterasas (PDEs). Kumar y Spiro (2017) han probado que el NO estimula la formación de biopelículas en *P. denitrificans* la síntesis de c-di-GMP está regulada por la proteína H-NOX (Unión de Hemo-Óxido Nítrico/Oxígeno) en base al NO que la bacteria produce como intermediario en sus procesos de desnitrificación. Esto es radicalmente opuesto a lo que sucede en otras biopelículas, donde el NO promueve la dispersión celular. La molécula que *Paracoccus denitrificans* sintetiza para llevar a cabo QS es la *N*-hexadecanil-L-homoserin lactona (C16-HSL) mediante la proteína pdnI. En una mutante carente de esta proteína se forma una biopelícula gruesa en comparación a la producida por la cepa silvestre. Por lo tanto, C16-HSL regula la producción de EPS. En la **Figura 13** se representa la manera en la que se cree que *P. denitrificans* forma biopelículas con base en observaciones realizadas usando una cepa silvestre WT y una cepa mutante PdnI (Morinaga et al, 2020; Yoshida, Tobofuku, Nozomu & Nomura, 2017).

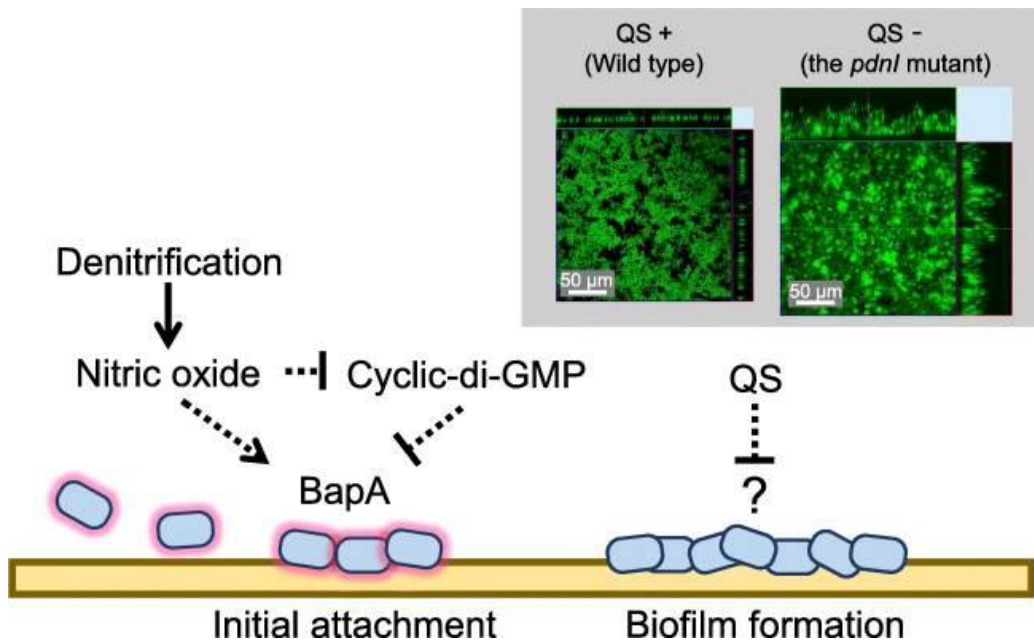


Figura 13. Representación esquemática de la formación de biopelícula en *P. denitrificans*. La proteína BapA es necesaria para la adherencia (Kumar & Spiro, 2017; Yoshida et al, 2017). El c-di-GMP inhibe la expresión del gen *bapA* y la secreción de la proteína BapA (Kumar & Spiro, 2017). El QS inhibe la formación de biopelículas (Morinaga et al, 2018). Mediante escáner de láser confocal se muestran las estructuras de las biopelículas de *Paracoccus denitrificans* WT y la mutante PdnI. La ventaja de formar

biopelículas delgadas es que cada célula puede tener mejor acceso a nutrientes que en biopelículas gruesas (Imagen tomada de Morinaga et al, 2020).

La composición del genoma de las α -proteobacterias difiere entre un género y otro, dependiendo esencialmente de su metabolismo y principal forma de obtención de energía; por ejemplo, las α -proteobacterias asociadas a células de mamíferos suelen tener genomas más pequeños y ricos en adenina y timina (A+T) en comparación de sus congéneres quimioautótrofos cuyos genomas suelen ser más extensos y ricos en guanina y citosina (G+C), si bien existen excepciones como el género *Burkholderia* cuyo genoma es 66.6% C+G y es una patógena oportunista (Moreno, 1998).

Debido a que este tipo de genomas ricos en C+G le confiere a las α -proteobacterias una mayor resistencia a condiciones de vida inhóspitas, este tipo de bacterias puede tener una distribución geográfica más amplia, así como diversos estilos de vida (Ettema & Andersson, 2009). Por ejemplo, la α -proteobacteria marina de vida libre *Pelagibacter ubique* es probablemente el ser vivo más abundante del planeta, ya que constituye un tercio de las células en la superficie del océano (o hasta 25% en verano, desplegando en total un volumen aproximado de 2×10^{28} células) y posee un genoma rico en G+C que es el más pequeño de todos los microorganismos de vida libre. Últimamente se han secuenciado los genomas de muchas especies de α -proteobacterias, encontrándose que muchos géneros, a pesar de no ser filogenéticamente muy cercanos, comparten proteínas similares, especialmente proteínas involucradas en el metabolismo de compuestos sulfurados y nitrogenados, la síntesis de proteínas y la regulación del ciclo celular (Gupta & Mok, 2007).

El contenido de G+C en el genoma de *Paracoccus denitrificans* es del 65.63%, si bien otros autores reportan porcentajes ligeramente diferentes, ya que en ningún caso la diferencia de los valores reportados es de $\pm 1.5\%$ (Baker et al, 1998). El tamaño de su genoma es de 5'242,327 bp, con dos cromosomas y un plásmido, además posee 5308 genes que codifican para proteínas, 54 genes de ARNt y 9 operones de ARNr. El análisis comparativo de los genomas de distintas cepas de *P. denitrificans* reveló que la expresión génica relacionada con procesos como la formación de biopelículas, la desnitrificación y el metabolismo del nitrógeno bajo condiciones aerobias se ve afectada por el tiempo de incubación y la velocidad de agitación (Si et al, 2019).

Análisis bioinformático de la subunidad ζ de *Paracoccus denitrificans*

La estructura primaria (secuencia de aminoácidos) de la subunidad ζ de *Paracoccus denitrificans* (PD1222, número de identificación 138586) usada como referencia para compararla contra una serie de secuencias almacenadas en un banco de datos es la siguiente:

MTTFDDRERA HEAKFAHDAE LNFKAEARRN RLLGEWAAGL LGKTGDDARA
YALTVVTSDF DEPGDEDVFR KLAADLEGKA DEETIRAKMV ELRATAREQI ISEI

Mediante un BLAST en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi> se comparó dicha secuencia de referencia contra otras 500 secuencias similares. Se obtuvieron 494 resultados (incluida la secuencia molde) y se encontró lo siguiente:

La subunidad ζ está presente en prácticamente todas las especies y cepas género *Paracoccus*, así como en muchas otras especies de α -proteobacterias. Como se puede apreciar en las **Figuras 14 y 15** el porcentaje de identidad, es decir, qué tanto coincide (residuo por residuo) una secuencia con la secuencia de referencia, fue siempre considerable, siendo el menor valor encontrado 58.25% (*Cereibacter sphaeroides*) y el máximo 95.19% (la cepa MKU1 de *Paracoccus denitrificans*).

	Description	Scientific Name	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus denitrificans]	Paracoccus denitrificans	206	100%	9e-67	100.00%	104	WP_011749137.1
✓	DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus sp. MKU1]	Paracoccus sp. MKU1	197	100%	2e-63	95.19%	104	WP_058097845.1
✓	DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus pantotrophus]	Paracoccus pantotrophus	197	100%	3e-63	94.23%	104	WP_024843655.1
✓	DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus pantotrophus]	Paracoccus pantotrophus	196	100%	1e-62	93.27%	104	WP_074990430.1
✓	DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus versutus]	Paracoccus versutus	195	100%	1e-62	93.27%	104	WP_036756212.1
✓	MULTISPECIES: DUF1476 domain-containing protein [unclassified Para...]	unclassified Paracoccus	195	100%	1e-62	93.27%	104	WP_028712203.1
✓	DUF1476 family protein [Paracoccus binzhouensis]	Paracoccus binzhouensis	194	100%	2e-62	93.27%	104	WP_199258921.1
✓	MULTISPECIES: DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus]	Paracoccus	194	100%	3e-62	93.27%	104	WP_116220473.1
✓	MULTISPECIES: DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus]	Paracoccus	193	100%	8e-62	91.35%	104	WP_010394038.1
✓	DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus versutus]	Paracoccus versutus	193	100%	1e-61	92.31%	104	WP_114537662.1
✓	DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus pantotrophus]	Paracoccus pantotrophus	193	100%	1e-61	92.31%	104	WP_072462081.1
✓	DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus thiocyanatus]	Paracoccus thiocyanatus	189	100%	5e-60	90.38%	104	WP_115756859.1
✓	DUF1476 family protein [Paracoccus sp. H4-D09]	Paracoccus sp. H4-D09	186	99%	4e-59	90.29%	104	WP_205296286.1
✓	DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus limosus]	Paracoccus limosus	184	100%	3e-58	85.58%	104	WP_155063426.1

Figura 14. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la subunidad ζ de diferentes especies del género *Paracoccus*. La comparación de secuencias se hizo por BLAST y se muestran en orden

descendente del porcentaje de identidad en función de su valor E, tomando como referencia la secuencia reportada para *Paracoccus denitrificans* Pd1222 (resultados 1 – 14).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus laevigluco...]	Paracoccus laevigluco...	182	99%	99%	1e-57	87.38%	104	WP_142662509.1
MULTISPECIES: DUF1476 domain-containing protein [unclassified Para...]	unclassified Paracoccus	181	99%	99%	3e-57	87.38%	104	WP_155044421.1
DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus aminovorans]	Paracoccus aminovorans	180	99%	99%	9e-57	84.47%	104	WP_074965857.1
MULTISPECIES: DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus]	Paracoccus	180	99%	99%	1e-56	84.47%	104	WP_017999788.1
DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus sp. DMF]	Paracoccus sp. DMF	179	99%	99%	4e-56	83.50%	104	TFE55386.1
MULTISPECIES: DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus]	Paracoccus	179	99%	99%	5e-56	86.41%	104	WP_028717872.1
DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus yeei]	Paracoccus yeei	177	99%	99%	1e-55	86.41%	104	WP_080622763.1
MULTISPECIES: DUF1476 domain-containing protein [unclassified Para...]	unclassified Paracoccus	176	99%	99%	5e-55	82.52%	104	WP_154491609.1
MULTISPECIES: DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus]	Paracoccus	176	99%	99%	5e-55	84.47%	104	WP_155037914.1
DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus sulfuroxidans]	Paracoccus sulfuroxidans	176	99%	99%	7e-55	80.58%	104	WP_145396540.1
DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus lutimaris]	Paracoccus lutimaris	175	100%	100%	2e-54	83.65%	104	WP_114348554.1
MULTISPECIES: DUF1476 family protein [unclassified Paracoccus]	unclassified Paracoccus	174	100%	100%	3e-54	80.77%	104	WP_182791478.1
DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus sphaerophysae]	Paracoccus sphaerophysae	174	99%	99%	3e-54	84.47%	104	WP_036716549.1
DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus solventivorans]	Paracoccus solventivor...	172	100%	100%	1e-53	81.73%	104	WP_073060152.1
DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus homiensis]	Paracoccus homiensis	172	99%	99%	1e-53	81.55%	105	WP_090734118.1
DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus sp.]	Paracoccus sp.	172	100%	100%	2e-53	81.73%	104	MBP6677677.1

Figura 15. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la subunidad ζ de diferentes especies del género *Paracoccus*. La comparación de secuencias se hizo por BLAST y se muestran en orden descendente del porcentaje de identidad en función de su valor E, tomando como referencia la secuencia reportada para *Paracoccus denitrificans* Pd1222 (resultados 15 – 30).

Como era de esperarse, el mayor grado de similitud se halló en otros miembros del género *Paracoccus*, tales como *P. pantotrophus*, *P. versutus*, *P. thiocyanatus*, *P. limosus*, *P. aminovorans* etc., los cuales presentaron intervalos de similitud de entre 68.93% a 95.19% (69% a 95.2%). Es oportuno mencionar que algunas de los mayores porcentajes de similitud no se observaron en especies identificadas del género *Paracoccus*, sino en cepas que carecen de una especie concreta asignada o simplemente designadas como *Paracoccus sp.* con alguna clave de identificación, tales como *Paracoccus sp* BP8, J56, H4-D09, DK608 etc.

En cualquier caso, todos los valores de E obtenidos del BLAST no fueron estadísticamente significativas (siendo el menor 1×10^{-71} y el mayor 2×10^{-35}), lo que indica que la probabilidad de que el resultado de similitud obtenido haya sido obtenido por mera coincidencia, no es estadísticamente significativo. A menor valor de E, el

porcentaje de similitud es mayor y en consecuencia, mayor la correspondencia con respecto a la secuencia de referencia. Por otra parte, en la columna llamada Accession Length (longitud de adhesión) puede verse que la longitud de la secuencia de la subunidad ζ está altamente conservada en la gran mayoría de las especies, siendo que en la mayoría mide 104 aminoácidos y en unas cuantas mide 105 o hasta 106 aminoácidos. Esto parece no guardar relación directa con el porcentaje de identidad, ya que algunas de las secuencias de 105 o 106 aminoácidos (por ejemplo, las de *Paracoccus homiensis* y *Paracoccus lichenicola*, respectivamente) guardan más similitud con la secuencia de referencia (81.55% y 76.47% respectivamente) que otras secuencias cuya longitud es igual a la longitud de la secuencia de referencia.

Como es posible observar en la **Figura 16**, no todas las secuencias que guardan similitud con respecto a la secuencia de referencia pertenecen al género *Paracoccus*, sino que pertenecen a otros géneros de α-proteobacterias. Los géneros de este tipo de bacterias que poseen dicha subunidad son (por orden de aparición): *Methylarcula marina*, *Yoonia vestfoldensis*, *Rhodobacter*, *Defluviimonas*, *Sulfitobacter pseudonitzschiae*, *Kocuria rhizophila* etc.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus suum]	Paracoccus suum	155	99%	1e-46	73.79%	104	WP_114076243.1	
DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus sp. Arc7-R13]	Paracoccus sp. Arc7-R13	154	99%	3e-46	73.79%	104	WP_127899035.1	
MULTISPECIES: DUF1476 domain-containing protein [unclassified Para...]	unclassified Paracoccus	153	99%	5e-46	71.84%	105	WP_209059253.1	
DUF1476 domain-containing protein [Yoonia vestfoldensis]	Yoonia vestfoldensis	152	100%	1e-45	70.19%	104	WP_087206840.1	
DUF1476 family protein [Paracoccus amoyensis]	Paracoccus amoyensis	150	99%	5e-45	72.82%	106	WP_187793435.1	
DUF1476 family protein [Paracoccus fontiphilus]	Paracoccus fontiphilus	150	99%	6e-45	74.76%	105	WP_207470793.1	
DUF1476 family protein [Paracoccus caeni]	Paracoccus caeni	150	96%	7e-45	73.00%	106	WP_200684940.1	
DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus sp. I-41R45]	Paracoccus sp. I-41R45	150	99%	1e-44	71.84%	104	WP_131575409.1	
DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus sp. 1011MAR3C25]	Paracoccus sp. 1011M...	150	99%	1e-44	74.76%	105	WP_119751770.1	
DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus tibetensis]	Paracoccus tibetensis	149	99%	3e-44	72.82%	104	WP_090739794.1	
DUF1476 domain-containing protein [Rhodobacteraceae bacterium]	Rhodobacteraceae bac...	148	100%	8e-44	70.19%	104	MBC7154727.1	
DUF1476 domain-containing protein [Paracoccus hibiscisoli]	Paracoccus hibiscisoli	147	99%	1e-43	68.93%	104	WP_136857405.1	
DUF1476 domain-containing protein [Defluviimonas sp. XJ4]	Defluviimonas sp. XJ4	147	99%	1e-43	70.87%	104	WP_126976614.1	
DUF1476 domain-containing protein [Haslibacter halocynthiae]	Haslibacter halocynthiae	147	99%	2e-43	70.87%	106	WP_106159423.1	
MULTISPECIES: DUF1476 domain-containing protein [Sulfitobacter]	Sulfitobacter	147	100%	2e-43	68.27%	106	WP_089422194.1	
DUF1476 domain-containing protein [Yoonia vestfoldensis]	Yoonia vestfoldensis	146	100%	3e-43	68.27%	104	WP_019955121.1	

Figura 16. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la subunidad ζ de diferentes especies

del género *Paracoccus*. La comparación de secuencias se hizo por BLAST y se muestran en orden descendente del porcentaje de identidad en función de su valor E, tomando como referencia la secuencia reportada para *Paracoccus denitrificans* Pd1222 (resultados 31 – 46).

Por otra parte, el grado de similitud que se encontró en otras especies y géneros de α -proteobacterias no fue escaso (hallándose un 76.70 – 58.25%) y sí fue lo suficientemente alto como para considerarse como altamente conservado. Lo anterior, sugiere que el gen que codifica para la subunidad ζ es un gen ortólogo; es decir, un gen que se mantiene constante porque proviene de un ancestro común y cuyas diferencias se deben a un proceso de especiación. Asimismo, se observó una clara disminución en el porcentaje de identidad a medida que hubo una mayor deriva y distancia filogenética con respecto a la secuencia de referencia contra la cual fueron contrastadas y comparadas las demás. Por lo tanto, es altamente probable que un mayor porcentaje de identidad corresponda a una mayor proximidad filogenética y taxonómica. Por ejemplo; el porcentaje de identidad de *Yoonia vestfoldensis* es de 70.19%, lo cual la aproximaría más filogenéticamente a *Paracoccus denitrificans* 1222 que *Devosia enhydra*, cuyo porcentaje de identidad es solo del 59.43%. En la **Figura 17** se presenta un cladograma con doce especies representativas de α -proteobacterias con subunidades ζ homólogas (Zarco-Zavala et al, 2014).

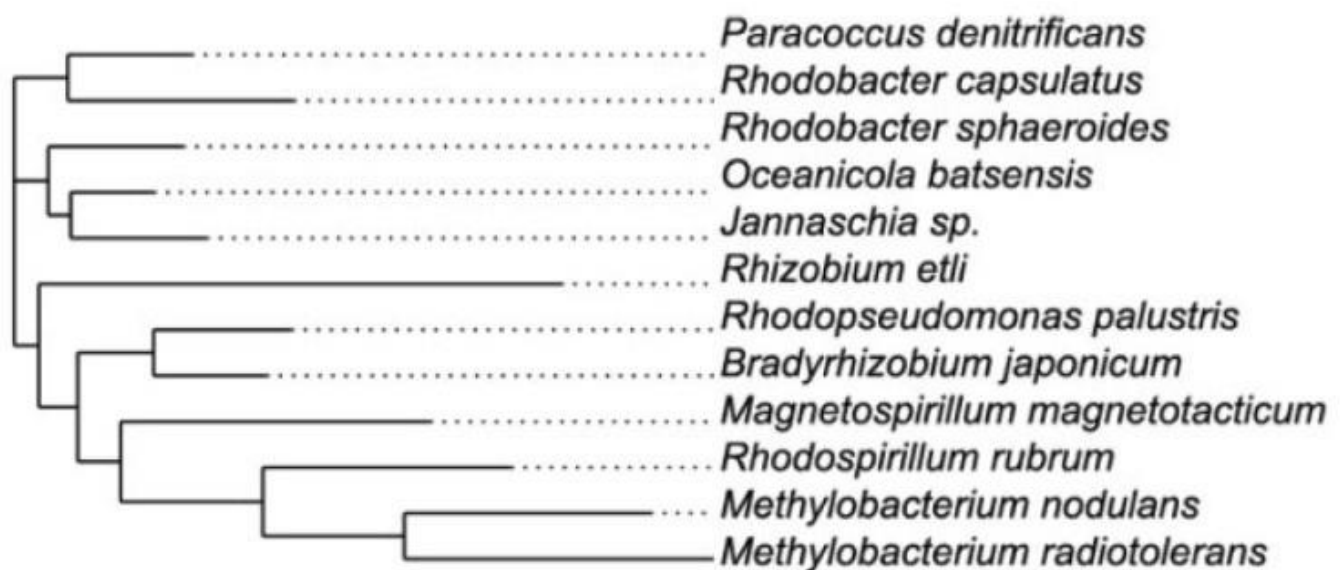


Figura 17. Cladograma de la secuencia de genes de Pd- ζ en α -proteobacterias. El marco abierto de lectura (ORF por sus siglas en inglés) del gen de Pd- ζ en α -proteobacterias fue descargado de BLAST.

Lo anterior está respaldado por los resultados obtenidos por Ettima y Andersson (2009), quienes reportaron que entre el 33 – 97% de todos los genes de α -proteobacterias poseen al menos un homólogo que también pertenece a una α -proteobacteria. Los genomas de estas bacterias varían hasta 10 veces de tamaño unos con respecto a otros, en un intervalo que va de 1 a más de 9 millones de pb, con miles de genes especie-específicos, si bien existen genes presentes en prácticamente todos los genomas, independientemente de su tamaño. Hay aproximadamente 200 genes involucrados en la síntesis de ADN, ARN y proteínas y otros 40 involucrados en la biosíntesis de nucleótidos y cofactores. Estadísticamente, se ha demostrado que hay una tendencia bien definida hacia un aumento en el número de genes involucrados en procesos de adaptación tales como metabolismo energético y funciones regulatorias y de transporte (aproximadamente 80 – 100 genes por cada millón de bp), lo que culmina en genomas más extensos y complejos. También se ha observado que en α -proteobacterias patógenas intracelulares, como algunas Rickettsiales (un orden cercano al género *Paracoccus*), hay una tendencia a perder genes, principalmente aquellos involucrados en la síntesis de metabolitos (por ejemplo, vitaminas y aminoácidos) que en su lugar son importados del citoplasma rico en nutrientes de su célula eucariote hospedera. Esta tendencia puede conllevar a la pérdida de hasta el 30% del genoma de la bacteria. Las Rhodobacterales (el orden de α -proteobacterias al que pertenece *Paracoccus denitrificans*) amplían su acervo genético por transferencia horizontal de genes y mediante replicones extensos llamados megaplásmidos. Las α -proteobacterias de vida libre tienden a poseer más genes que las parasitarias intracelulares (Ettima & Andersson, 2009). Otras α -proteobacterias como *Rhodobacter sphaeroides* poseen su propia subunidad homóloga a la subunidad ζ , lo cual sugiere que esta subunidad actúa como un inhibidor de la F_1 -ATPasa en la mayoría de las α -proteobacterias (Zarco-Zavala et al, 2014).

Como se ha mencionado anteriormente, casi todas las bacterias que poseen una secuencia similar a la de la subunidad ζ pertenecen a la clase de las α -proteobacterias. En la **Figura 18** es posible observar que prácticamente todas las secuencias que comparten cierto grado de porcentaje de identidad con respecto a la secuencia de referencia son α -proteobacterias a excepción de ocho, las cuales son: *Pseudomonas*

stutzeri (una γ -proteobacteria), *Rhodoferax sp* (una β -proteobacteria), *Kocuria rhizophila* y *Mycobacterium sp* (bacterias Gram + ricas en C+G, característica que comparten con *Paracoccus denitrificans*), las bacterias candidatas *Falkowbacteria* y *Saccharibacteria*, una bacteria sin clasificar que no ha sido cultivada y finalmente la bacteria GNS (verde no del azufre o Green Non Sulphur por sus siglas en inglés) *Chloroflexi*.

Es probable que la presencia de secuencias similares a la de la secuencia de referencia se deba a un proceso de transferencia horizontal de genes. Sin embargo, cabe mencionar que, en estos casos, la cobertura no es del 100%, es decir que estos genes de ζ exógenos a las α -proteobacterias, corresponden a genes truncos o incompletos de la subunidad ζ , de tal modo que no es seguro que sean genes funcionales, mientras que en las α -proteobacterias los genes de la subunidad ζ son genes completos y sabemos que en varios casos son funcionales (Mendoza-Hoffmann, 2018).

. . . . Rhodobacterales bacterium RIFCSPHIGH02_12_FULL_62_75	a-proteobacteria	131	1	Rhodobacterales bacterium RIFCSPHIGH02_12_FULL_62_75 hits
. . . . Rhodobacterales bacterium 32-66-7	a-proteobacteria	130	1	Rhodobacterales bacterium 32-66-7 hits
. . . . Rhodobacterales bacterium 17-64-5	a-proteobacteria	130	1	Rhodobacterales bacterium 17-64-5 hits
. . . . Rhodobacterales bacterium HKCCD4356	a-proteobacteria	127	1	Rhodobacterales bacterium HKCCD4356 hits
. . . Alphaproteobacteria bacterium	a-proteobacteria	161	10	Alphaproteobacteria bacterium hits
. . . Alphaproteobacteria bacterium GH1-50	a-proteobacteria	136	1	Alphaproteobacteria bacterium GH1-50 hits
. . . Alphaproteobacteria bacterium HGW-Alphaproteobacteria-4	a-proteobacteria	134	1	Alphaproteobacteria bacterium HGW-Alphaproteobacteria-4 hits
. . . Alphaproteobacteria bacterium KMM 3653	a-proteobacteria	133	1	Alphaproteobacteria bacterium KMM 3653 hits
. . . Alphaproteobacteria bacterium HGW-Alphaproteobacteria-1	a-proteobacteria	132	1	Alphaproteobacteria bacterium HGW-Alphaproteobacteria-1 hits
. . . Devosia pacifica	a-proteobacteria	130	2	Devosia pacifica hits
. . . Roseibium sp. RKSG952	a-proteobacteria	128	1	Roseibium sp. RKSG952 hits
. . Pseudomonas stutzeri	γ-proteobacteria	157	1	Pseudomonas stutzeri hits
. . Rhodoferax sp.	β-proteobacteria	132	1	Rhodoferax sp. hits
. . Alphaproteobacteria	a-proteobacteria	128	1	Alphaproteobacteria hits
. Kocuria rhizophila	high GC Gram+	170	1	Kocuria rhizophila hits
. Candidatus Falkowbacteria bacterium	bacteria	134	1	Candidatus Falkowbacteria bacterium hits
. Candidatus Saccharibacteria bacterium	bacteria	133	1	Candidatus Saccharibacteria bacterium hits
. Mycobacterium sp.	high GC Gram+	130	1	Mycobacterium sp. hits
. uncultured bacterium	bacteria	128	1	uncultured bacterium hits
. Chloroflexi bacterium	GNS bacteria	127	1	Chloroflexi bacterium hits

Figura 18. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la subunidad ζ de diferentes especies del género *Paracoccus*. La comparación de secuencias se hizo por BLAST y se muestran en orden descendente del porcentaje de identidad en función de su valor E, tomando como referencia la secuencia reportada para *Paracoccus denitrificans* Pd1222 (últimos resultados).

Por lo tanto, es probable que los porcentajes de identidad menores sean en realidad pseudogenes, es decir, genes que han perdido su función y de los cuales solo quedan fragmentos sin función. Se conjetura que esto sucede debido a un proceso de transferencia horizontal de genes en el que una célula de *Paracoccus denitrificans* o

alguna otra α -proteobacteria, le transfirió el gen Pden_2826 a alguna de estas bacterias. Este gen no habría conseguido acoplarse correctamente al genoma de dicha bacteria debido a algún tipo de incompatibilidad como la longitud fragmento o el tamaño del genoma de la bacteria receptora, sin embargo, la secuencia permaneció dentro de la bacteria y a medida que pasó el tiempo fue degenerándose hasta eventualmente convertirse en un pseudo-gen. *P. denitrificans*, y en particular la cepa Pd1222, tiene una alta frecuencia de conjugación, lo cual permitiría la transferencia horizontal de sus genes a otras α -proteobacterias o incluso a bacterias de otras clases que sean compatibles con la conjugación con *P. denitrificans*, como las eubacterias que contienen el gen Pden_2826 incompleto fuera de la clase α -proteobacterias. Por ejemplo, la mutante Pd $\Delta\zeta$ construida en el laboratorio del Dr García-Trejo y del Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, se construyó por conjugación entre *P. denitrificans* y *E. coli*, la cual es una γ -proteobacteria (Mendoza-Hoffmann et al, 2018b).

Esto puede estar relacionado con lo señalado por Maxmen (2010), sobre la existencia de unas partículas semejantes a virus llamadas GTA's (Gene Transfer Agents o Agentes de Transferencia de Genes) que insertan fragmentos de ADN y hasta genes completos en los genomas de bacterias, generando una tasa de transferencia horizontal de genes de 1,000 a 100'000,000 de veces mayor a lo esperado, lo cual sugiere que los GTA's juegan un rol crucial en la evolución de las bacterias, especialmente de las bacterias marinas (Maxmen, 2010).

Si bien *Paracoccus denitrificans* no es una bacteria comúnmente hallada en ambientes marinos, no se descarta la posibilidad de que hayan sido GTA's los responsables de transferir la secuencia o parte de la secuencia de la subunidad ζ a otras bacterias. Se comparó la estructura primaria (secuencia de aminoácidos) mediante el Visor de Alineamiento de Múltiples Secuencias de NCBI contra cien secuencias representativas las **Figuras 19, 20, 21, 22 y 23**. Un aspecto que vale la pena destacar de los alineamientos realizados es que, de las 494 secuencias contra las que se comparó la secuencia de referencia de *Paracoccus denitrificans*, muchas no corresponden a especies o géneros de α -proteobacterias que sean filogenéticamente cercanas a *P.*

denitrificans, de acuerdo a los resultados obtenidos por Hördt et al, (2020), géneros de este tipo de bacterias que son próximos a *P. denitrificans* incluyen a *Haematobacter* (el género taxonómicamente más cercano), *Paenirhodobacter*, *Bieblia*, *Frigidibacter*, *Tabrizicola*, *Gemmobacter*, *Cyprionkella* etc. Y sin embargo, otros géneros de α -proteobacterias que taxonómicamente se ubican más distantes a *P. denitrificans*, tales como *Cereibacter*, *Jannaschia* y *Amylibacter*, sí aparecen en los resultados de los alineamientos.

Lo anterior puede explicarse con base en los resultados obtenidos por Hördt y colaboradores (2020) quienes analizaron más de 1000 secuencias de cepas de α -proteobacterias con el fin de esclarecer su clasificación taxonómica tomando como base el tamaño de su genoma y su contenido de C+G, con el fin de corregir incongruencias previas basadas en antiguas comparaciones de su ARNr 16S. La corrección de estos erroresha permitido generar una clasificación mucho más precisa de las diversas familias y géneros de α -proteobacterias.

Alignment	Organism	Mismatches
21 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41		
L N F K A E A R R N R L L G E W A A G I L L	Paracoccus denitrificans	0
*	Paracoccus sp. MKU1	5
*	Paracoccus pantotrophus	6
*	Paracoccus pantotrophus	7
*	Paracoccus versutus	7
*	unclassified Paracoccus	7
*	Paracoccus binzhouensis	7
*	Paracoccus	7
*	Paracoccus versutus	8
*	Paracoccus	8
*	Paracoccus	9
*	Paracoccus thiocyanatus	10
*	Paracoccus sp. H4-D09	10
*	Paracoccus laevigulosi...	13
*	unclassified Paracoccus	13
*	Paracoccus	14
*	Paracoccus yeei	14
*	Paracoccus limosus	15
*	Paracoccus aminovorans	16
*	Paracoccus	16
*	Paracoccus	16
R	Paracoccus sphaerophy...	16
*	Paracoccus lutimaris	17
*	Paracoccus sp. DMF	17
*	unclassified Paracoccus	18
R	Paracoccus aestuariiviv...	18
R	Paracoccus chinensis	18
R	Paracoccus solventivorans	19
*	Paracoccus sp.	19
R	Paracoccus solventivorans	19
R	Paracoccus homiensis	19
Q	Paracoccus aurantiacus	19
R	Paracoccus endophyticus	19
R	unclassified Paracoccus	20
*	Paracoccus ravus	20
*	Paracoccus sp.	20
M	Paracoccus sulfuroxidans	20
R	Paracoccus zeaxanthini...	20
R	Paracoccus aerius	20
R	Paracoccus salipaludis	20
Q	Paracoccus sp. S1E-3	21
R	Paracoccus sp.	21
R	Paracoccus sanguinis	21
R	Paracoccus isoporae	21
Q	Paracoccus xiamenensis	21
R	Paracoccus luteus	21
R	Paracoccus	21
R	Paracoccus aeridis	21
R	Paracoccus seriniphilus	23
R	Paracoccus saliphilus	25

Figura 20. Alineamiento de cien secuencias representativas del género *Paracoccus* contra la secuencia de referencia *Paracoccus denitrificans* Pd1222, residuos 21 – 41 (imagen tomada de BLAST).

Alignment	Organism	Mismatches
41 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 L G K T G D D A R A Y A L T V V T S D F D		0
.....	Paracoccus denitrificans	0
.....	Paracoccus sp. MKU1	5
.....	Paracoccus pantotrophus	6
.....	Paracoccus pantotrophus	7
.....	Paracoccus versutus	7
..... E	unclassified Paracoccus	7
.....	Paracoccus binzhouensis	7
.....	Paracoccus	7
.....	Paracoccus versutus	8
.....	Paracoccus	8
..... S	Paracoccus	9
..... S	Paracoccus thiocyanatus	10
..... K	Paracoccus sp. H4-D09	10
.....	Paracoccus laevigulosi...	13
..... M N	unclassified Paracoccus	13
..... E	Paracoccus	14
..... E	Paracoccus yeii	14
..... S	Paracoccus limosus	15
..... I	Paracoccus aminovorans	16
..... I S	Paracoccus	16
..... S	Paracoccus	16
..... S	Paracoccus	16
..... T	Paracoccus sphaerophy...	16
..... S	Paracoccus lutimaris	17
..... I S	Paracoccus sp. DMF	17
..... S	unclassified Paracoccus	18
..... E	Paracoccus aestuariiviv...	18
..... E T	Paracoccus chinensis	18
..... E T	Paracoccus solventivorans	19
..... K	Paracoccus sp.	19
..... E T	Paracoccus solventivorans	19
..... E T	Paracoccus	19
..... Q	Paracoccus homiensis	19
..... S E	Paracoccus aurantiacus	19
..... S E	Paracoccus endophyticus	19
..... E T	unclassified Paracoccus	20
M	Paracoccus ravus	20
..... K	Paracoccus sp.	20
..... S	Paracoccus sulfuroxidans	20
..... S E	Paracoccus zeaxanthini...	20
..... M S	Paracoccus aerius	20
.....	Paracoccus salipaludis	20
..... N	Paracoccus salipaludis	20
..... S	Paracoccus sp. S1E-3	21
..... E T	Paracoccus sp.	21
..... E T	Paracoccus sanguinis	21
..... S E	Paracoccus isoporae	21
..... S E	Paracoccus xiamenensis	21
..... S E	Paracoccus luteus	21
.....	Paracoccus	21
..... T	Paracoccus aeridis	21
..... S E	Paracoccus seriniphilus	23
..... S E	Paracoccus saliphilus	25

Figura 21. Alineamiento de cien secuencias representativas del género *Paracoccus* contra la secuencia de referencia *Paracoccus denitrificans* Pd1222, residuos 41 – 61 (imagen tomada de BLAST).

Alignment	Organism	Mismatches
61 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81		
D E P G D E D V F R K L A A D L E G K A D		0
.	<i>Paracoccus denitrificans</i>	0
.	<i>Paracoccus</i> sp. MKU1	5
.	<i>Paracoccus pantotrophus</i>	6
.	<i>Paracoccus pantotrophus</i>	7
.	<i>Paracoccus versutus</i>	7
T	unclassified <i>Paracoccus</i>	7
.	<i>Paracoccus binzhouensis</i>	7
.	<i>Paracoccus</i>	7
.	<i>Paracoccus versutus</i>	8
.	<i>Paracoccus</i>	8
.	<i>Paracoccus</i>	9
.	<i>Paracoccus thiocyanatus</i>	10
.	<i>Paracoccus</i> sp. H4-D09	10
.	<i>Paracoccus laevigulosi</i> ...	13
.	unclassified <i>Paracoccus</i>	13
A	<i>Paracoccus</i>	14
A	<i>Paracoccus yeei</i>	14
.	<i>Paracoccus limosus</i>	15
.	<i>Paracoccus aminovorans</i>	16
.	<i>Paracoccus</i>	16
.	<i>Paracoccus</i>	16
E	<i>Paracoccus sphaerophy</i> ...	16
.	<i>Paracoccus lutimaris</i>	17
.	<i>Paracoccus</i> sp. DMF	17
E R	unclassified <i>Paracoccus</i>	18
.	<i>Paracoccus aestuariiviv</i> ...	18
E	<i>Paracoccus chinensis</i>	18
.	<i>Paracoccus solventivorans</i>	19
.	<i>Paracoccus</i> sp.	19
.	<i>Paracoccus solventivorans</i>	19
E	<i>Paracoccus homiensis</i>	19
E	<i>Paracoccus aurantiacus</i>	19
E	<i>Paracoccus endophyticus</i>	19
E	unclassified <i>Paracoccus</i>	20
.	<i>Paracoccus ravus</i>	20
.	<i>Paracoccus</i> sp.	20
N	<i>Paracoccus sulfuroxidans</i>	20
E	<i>Paracoccus zeaxanthini</i> ...	20
E	<i>Paracoccus aerius</i>	20
E	<i>Paracoccus salipaludis</i>	20
E	<i>Paracoccus</i> sp. S1E-3	21
.	<i>Paracoccus</i> sp.	21
E Q	<i>Paracoccus sanguinis</i>	21
E	<i>Paracoccus isoporae</i>	21
E	<i>Paracoccus xiamenensis</i>	21
E	<i>Paracoccus luteus</i>	21
E	<i>Paracoccus</i>	21
E	<i>Paracoccus aeridis</i>	21
E	<i>Paracoccus seriniphilus</i>	23
E	<i>Paracoccus saliphilus</i>	25

Figura 22. Alineamiento de cien secuencias representativas del género *Paracoccus* contra la secuencia de referencia *Paracoccus denitrificans* Pd1222, residuos 61 – 81 (imagen tomada de BLAST).

Alignment		Organism	Mismatches																							
82	90	100	104																							
E	E	T	I	R	A	K	M	V	E	L	R	A	T	A	R	E	Q	I	I	S	E	I		0		
.		0
.	D	L	5
.	A	L	6
.	A	L	7
.	D	A	L	7
.	.	A	L	7
.	.	A	M	7
.	A	A	L	7
.	A	A	L	8
.	D	I	A	L	8
.	T	A	L	9
.	.	A		10
.	D	T		10
.	V	A		13
.	A	A		13
.	P	A	A		14
.	P	A	A		14
.	T	A		15
A	.	A		16
.	Q	S	Q		16
.	A	S		16
.	A	A		16
.	A	A		17
.	Q	S	Q		17
A	D	Q		18
.	P	.	L	S	S	M		18
.	A		18
.	A	R	.	A		19
A	G	I		19
.	A	R	.	D		19
A	A	A		19
.	A	A		19
.	A	A	D		19
.	A	S		20
.	A	T	Q		20
A	G	A		20
.	T		20
A	D	T		20
.	S	E		20
.	A		20
.	A	A	A		21
.	A	R	.	A		21
.	A	.	V	A		21
.	A	E	A		21
.	A	A	A		21
.	A	D		21
.	S	E		21
A	A	D		21
A	A		23
A	A	A		25

Figura 23. Alineamiento de cien secuencias representativas del género *Paracoccus* contra la secuencia de referencia *Paracoccus denitrificans* Pd1222, residuos 82 – 104. Las columnas azules representan los residuos menos conservados. En última instancia el mayor grado de desemejanza ocurre en la última región de la secuencia. Una columna final con algunos residuos en gris indica que éstas secuencias poseen más residuos que la secuencia de referencia (imagen tomada de BLAST).

En la **Figura 19** la diferencia más notoria ocurre a nivel del onceavo aminoácido; en *P. denitrificans* Pd1222 es una histidina (H), mientras que en la mayoría de las demás secuencias en su lugar hay una tirosina (Y) o una glutamina (Q), siendo que químicamente hablando estos aminoácidos no se parecen. La segunda diferencia más

notoria ocurre a nivel del décimo aminoácido; en *P. denitrificans* Pd1222 es una alanina (A) en muchos otros es reemplazado por una serina (S). Hasta los primeros nueve aminoácidos, las secuencias son prácticamente iguales a la secuencia de referencia, con mínimas desemejanzas (por ejemplo; el cambio de una treonina (T) por S en el caso de *Paracoccus solventivorans* o un ácido aspártico (D) por un ácido glutámico (E) en el caso de *Paracoccus aerius*). Existen residuos altamente conservados que en ninguna secuencia difieren con respecto a la secuencia de referencia, éstos son los residuos 1, 3, 4, 5, 7, 12, 15, 16 y 18. Por otro lado, se observan más diferencias significativas en los residuos 13 y 17 donde una alanina (A) y una histidina (H) son sustituidas por serina (S), treonina (T) o asparagina (N) y arginina (R) y lisina (L) respectivamente. Asimismo, se observan cambios menores, como la sustitución de alanina por ácido glutámico en 5 especies de *Paracoccus* y la sustitución de este mismo aminoácido por ácido aspártico en 11 especies de este género.

En la **Figura 20** los únicos cambios notorios se observan a nivel del residuo 22, siendo que en la secuencia de referencia es asparagina (N), en 18 especies es reemplazado por una arginina (R), existen algunas sustituciones menores en los residuos 39, 40 y 41. No obstante, este segmento de la secuencia es el más conservado y, curiosamente, en ninguna de las secuencias contra las cuales se comparó la secuencia de referencia parecen poseer cisteína en su composición, salvo las subunidades ζ de *Rhodospirillum rubrum* y *Methylobacterium radiotolerans*, que contienen una cisteína (C) en su extremo C-terminal.

En la **Figura 21** se aprecia un considerable grado de conservación, mas no tanto como en el segmento anterior. Los cambios más significativos son residuos de treonina siendo reemplazadas por serina y residuos de ácido aspártico (D) siendo sustituidos por ácido glutámico (E). Este tipo de sustitución de un aminoácido cargado negativamente por otro con esta misma característica es relativamente común. Es notoria la escasez de aminoácidos aromáticos como la histidina, el triptófano, la tirosina y la fenilalanina, sugiriendo que, para funcionar correctamente, la subunidad ζ debe ser pequeña, para permanecer versátil y flexible.

En la **Figura 22** se observa un gran número de disimilitudes. Por ejemplo; el residuo 77 de Pd1222, un ácido glutámico, es reemplazado por alanina en casi todas las secuencias. Asimismo, se observa una sustitución de D por E en los residuos 61 y 65, viéndose nuevamente la sustitución de un aminoácido cargado negativamente por otro. También se aprecia una sustitución de fenilalanina por tirosina a nivel del residuo 69, es decir, la sustitución de un aminoácido aromático por otro. En general, la estructura primaria es rica en aminoácidos cargados negativamente (D y E), balanceado con aminoácidos cargados positivamente (R y K) pero con predominante abundancia de aminoácidos pequeños e hidrófobos (A, L, I, V & G) y casi ausencia de aminoácidos aromáticos (Y, F, W y H).

En la **Figura 23** se observa la mayor cantidad de disimilitudes, correspondiendo a la región menos conservada de la subunidad ζ ya que solo 6 residuos presentan un alto grado de conservación. No obstante, puede considerarse que es una secuencia con un significativo grado de conservación, ya que son pocas las especies del género *Paracoccus* cuyas secuencias difieren en más de 20 aminoácidos (de 104 en total) con respecto a la secuencia de referencia, por ejemplo; *Paracoccus sanguinis* (21), *Paracoccus luteus* (21), *Paracoccus seriniphilus* (23) y *Paracoccus saliphilus* (25). Asimismo destacan 4 columnas azules en contraste a la coloración roja del alineamiento a nivel de los aminoácidos 83 (E), 94 (A), 98 (E) y 102 (S). Este cambio de color representa un bajo grado de conservación, al contrario del color rojo que representa un alto grado de conservación. El que únicamente 4 aminoácidos de una secuencia de 104 en total sean diferentes, demuestra que la subunidad ζ mantiene un alto grado de conservación en especies del género *Paracoccus*. Finalmente, en la última columna se observa que, especialmente en las secuencias más similares a la secuencia de referencia, el último aminoácido, que en la secuencia de referencia es una isoleucina (I), en otras especies (tales como *Paracoccus pantotrophus* y *Paracoccus versutus*) es frecuentemente reemplazado por una leucina (L). Este tipo de cambio es normal ya que ambos aminoácidos son estructuralmente similares y a menudo son intercambiados entre sí. Los gaps que se distinguen se deben a que algunas especies poseen 103 residuos en su cadena de aminoácidos en lugar de 104 como la secuencia de referencia.

En última instancia, la secuencia de referencia es rica en alanina (17 residuos), ácido glutámico (13 residuos), ácido aspártico (11 residuos) y arginina (10 residuos) que en su totalidad constituyen casi la mitad de la proteína. Posee cantidades moderadas de leucina (9 residuos), treonina (7 residuos), lisina (6 residuos), glicina (6 residuos), valina (4 residuos) e isoleucina (4 residuos). Y es pobre en metionina (2 residuos), asparagina (2 residuos), glutamina, tirosina, triptófano y prolina (1 residuo de cada uno). Extrañamente, en general, las subunidades ζ de las α -proteobacterias carecen de cisteína (C) pese a que los miembros del género *Paracoccus* son capaces de metabolizar una amplia gama de compuestos azufrados. Esto puede deberse a que la cisteína puede ser tóxica, incluso a bajas concentraciones, por ello su concentración intracelular está estrictamente controlada a nivel de su biosíntesis, pues la cisteína se sintetiza a partir de serina con un azufre proveniente de metionina. Debido a su posible citotoxicidad y a que puede coordinar iones metálicos, además de que puede participar en regulación redox y/o proveer fuentes disulfuro (S-S), la cisteína no se sintetiza a menos que sea estrictamente necesario (Takumi & Nonaka, 2016). Sin embargo, dos excepciones son: 1) la subunidad ζ de *Rhodospirillum rubrum* que contiene una cisteína (**Figura 30**), que probablemente sea indicio de una regulación redox, dado que se trata de una α -proteobacteria fotosintética. 2) la subunidad ζ de *Methylobacterium radiotolerans* que contiene dos cisteínas, (**Figuras 29 y 30**), podría ser un indicio también de regulación redox, como en el caso de *R. rubrum*, o de una estrategia de aumento de estabilidad, necesaria por tratarse de un extremófilo resistente a la radioactividad. Valdría la pena explorar ambas posibilidades.

Retomando un punto anterior, según lo reportado por Zarco-Zavala et al (2014) luego de la serie de alineamientos con BLAST y ClustalW aquí presentados, se demostró que la subunidad ζ no presenta una similitud significativa ni con la subunidad ϵ bacteriana ni con el IF₁ mitocondrial. No obstante, sí existe cierto grado de similitud entre los primeros 14 residuos del N-terminal de la subunidad ζ con el dominio inhibitorio de IF₁. Ya que se ha encontrado a dicha subunidad como un marco de lectura abierto (ORF) o DUF1476 a lo largo de la familia de las α -proteobacterias, anteriormente se construyó un árbol filogenético con 100 secuencias representativas para determinar las relaciones evolutivas entre distintas subunidades ζ homólogas (Zarco-Zavala et al, 2014). Tal

como se muestra en las **Figuras 17 y 24**, las especies cuya subunidad ζ presenta un mayor grado de similitud con respecto a la de *P. denitrificans* son *Rhodobacter sphaeroides*, *R. capsulatus*, *Oceanicola batsensis* y una especie no identificada de *Jannaschia*. Esto concuerda con observaciones anteriores donde se estudió la relación entre *Paracoccus* y *Jannaschia* a nivel estructural y funcional. Al no haber encontrado ORF's ni DUF's de la subunidad ζ completa fuera de la clase de las α -proteobacterias, se comprueba que esta subunidad es esencialmente exclusiva de la F_1F_0 -ATP sintasa de esta clase de bacterias.

En la **Figura 24** está representado un alineamiento de 12 secuencias representativas escogidas para construir el cladograma de la ya vista **Figura 17**, en donde en general se observa un alto grado de conservación en la secuencia de aminoácidos en el N-terminal encargado de la función inhibitoria. También hay residuos con muy bajo grado de conservación, especialmente en el extremo C-terminal y algunos gaps en los residuos 45, 46, 81–83 y 102–104. Es notorio que en la secuencia de *Methylobacterium nodulans* es donde se encuentra la mayor cantidad de gaps, siendo 28 de 104. Esta bacteria pertenece al orden de las Hyphomicrobiales, a diferencia de *P. denitrificans* que pertenece al orden de las Rhodobacterales (Zarco-Zavala et al, 2014).

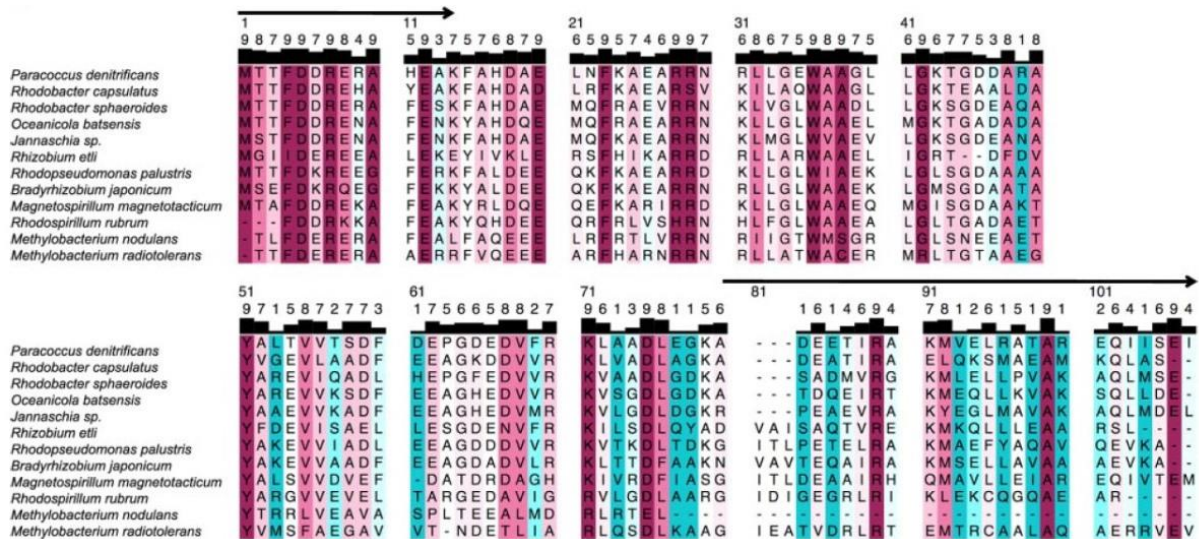


Figura 24. Alineamiento de secuencias de proteínas generado con Consurf con 12 subunidades ζ representativas y enumeradas de acuerdo a la secuencia de Pd- ζ . Los aminoácidos están coloreados de acuerdo a su grado de conservación, (códigos de color: azul, variable; blanco, promedio y rojo cereza, altamente conservado). Los puntajes de conservación se muestran en barras y números [escala 1

(menos conservado) a 10 (totalmente conservado) en la parte superior de cada residuo] (imagen de Zarco-Zavala et al, 2014).

Se analizó la estructura secundaria (es decir, el plegamiento adoptado por la cadena de polipéptidos a partir de la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos que forman el enlace peptídico) de la subunidad ζ mediante CD (Dicroísmo Circular) una técnica de espectroscopía basada en la polarización circular de la luz a través de compuestos ópticamente activos con grupos cromóforos o quirales. Los análisis demostraron que en un intervalo de pH de 6.0–8.0, la subunidad ζ está compuesta por α -hélices en más de un 90% (Zarco-Zavala et al, 2014) y, mediante RMN (Zarco-Zavala et al, 2014; Serrano et al, 2015), se dilucidó la estructura terciaria de dicha subunidad; encontrándose que esta exhibe una estructura de 4 α -hélices en haz, distinta a otros inhibidores de la F₁-ATPasa (tanto IF₁ como la subunidad ϵ son α -hélices extendidas). Tanto su N-terminal como su C-terminal convergen en la estructura terciaria de la proteína (su configuración tridimensional) donde el extremo N-terminal sobresale del dominio central 4 α -hélice-globular como se observa en la **Figura 25**.

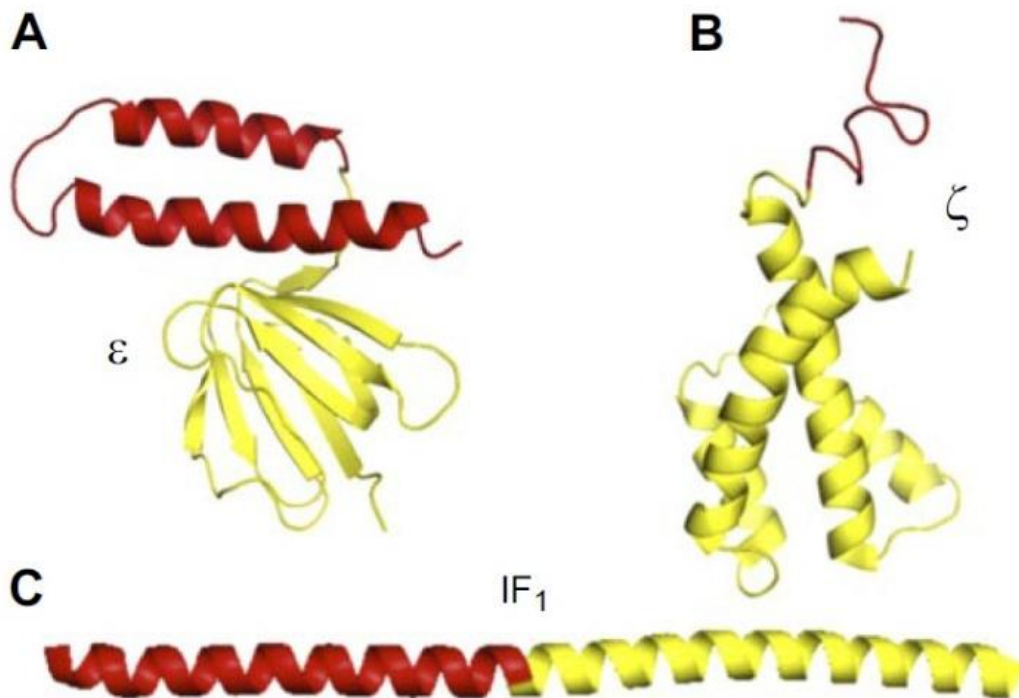


Figura 25. Estructuras de los inhibidores proteicos de la F₁-ATPasa. **A)** Estructura de rayos X de la subunidad ϵ de *E. coli* (Ec- ϵ). **B)** Estructura de rayos X de la proteína inhibitoria ζ de *P. denitrificans*. **C)**

Estructura de rayos X de la proteína inhibitoria IF₁ de *Bos taurus*. En todas las estructuras el segmento en rojo corresponde al dominio inhibitorio, el C-terminal de las 2 α-hélices en Ec-ε (A), los 14 residuos móviles del N-terminal de Pd-ζ (B), y la región N-terminal del IF₁ de la F₁-ATPasa mitocondrial (C). El entrecruzamiento y la comparación estructural indican que el dominio inhibitorio de Pd-ζ se une a la interfaz rotor/estator para bloquear la catálisis rotacional de la PdF₁-ATPasa (imagen tomada de Zarco-Zavala et al, 2014).

Para finalizar el presente trabajo, mediante el BLAST de NCBI se construyó un reducido árbol filogenético que en resumidas cuentas muestra la relación que existe a nivel taxonómico entre la secuencia de referencia y las 494 secuencias contra las cuales fue comparada, es destacable que prácticamente todas las secuencias que presentaron similitud con la secuencia de referencia Pd1222 sean α-proteobacterias, inclusive la rama más distante que aparece en la **Figura 26** y que a primera vista podría parecer que no es una α-proteobacteria, *Phaeobacter gallaeciensis*, en realidad sí lo es, y pertenece al orden de las Rhodobacterales, y por lo tanto está emparentada a *P. denitrificans*.

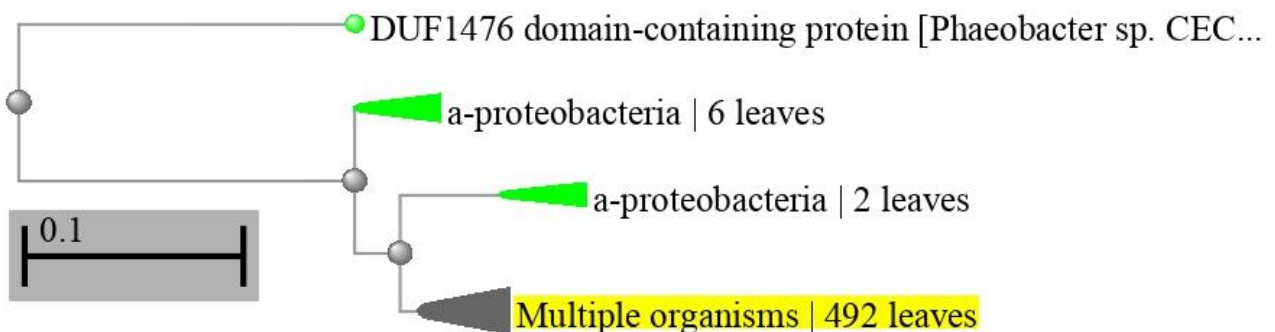


Figura 26. Primer árbol filogenético generado a partir de las secuencias contra las cuales fue comparada la secuencia de referencia de Pd1222 (imagen obtenida del BLAST).

Simultáneamente se construyó un segundo árbol filogenético (**Figura 27**) con la diferencia de que en éste, 100 α-proteobacterias (de un total de 494) no están plenamente identificadas, de ellas destacan dos que se muestran en ramas distantes, una de ellas es *Amylibacter cionae*, mientras que en una rama menos lejana se encuentra *Marivivens niveibacter*, ambas α-proteobacterias pertenecientes al orden de las Rhodobacterales, probando una vez más que la subunidad ζ es exclusiva de esta clase de bacterias. Existe un gran número de géneros distintos de bacterias dentro de este orden que se caracterizan por poseer una gran versatilidad metabólica. Cabe

mencionar que de manera similar a lo observado por Mendoza-Hoffmann (2018c), hay algunos ejemplos de bacterias fuera de la clase de las α -proteobacterias que tienen el gen de ζ (DUF1476), pero en todos los casos es un gen incompleto que probablemente se adquirió por transferencia horizontal, así que faltaría corroborar si esos genes de ζ existentes fuera de las α -proteobacterias se expresan *in vivo* y además, faltaría corroborar si son o no funcionales como inhibidores de las F-ATPasas respectivas.

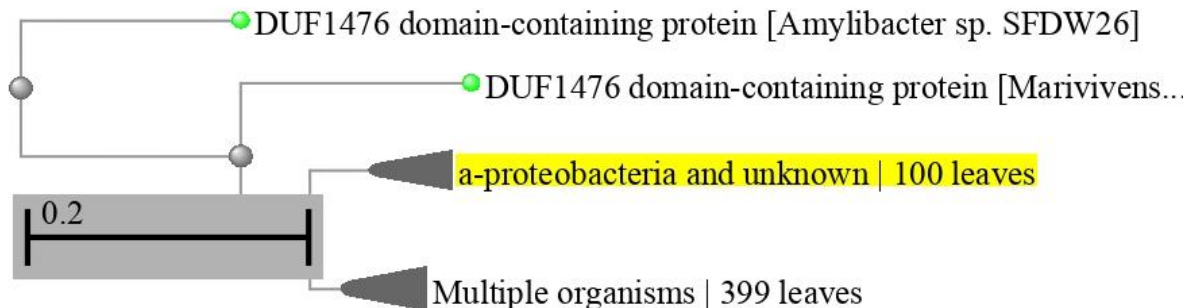


Figura 27. Segundo árbol filogenético de las secuencias contra las cuales fue contrastada la secuencia de referencia de Pd1222 (imagen obtenida del BLAST).

Para finalizar el presente trabajo, con el propósito de efectuar una actualización de diversas secuencias que en su momento Zarco-Zavala et al (2014) mostraron de manera incompleta (**Figuras 17 y 24**), se generó un nuevo alineamiento mediante Chimera, ya que en dichas imágenes se observaron gaps en varias secuencias, por ejemplo; en la secuencia correspondiente a *Methylobacterium nodulans* existe un notorio gap entre los residuos 76 – 104, mismo que ya fue actualizado y puede verse ya completo en la **Figura 28**. En esta misma imagen se observa un gap entre los residuos 81 – 83 en las secuencias de las primeras cuatro especies del alineamiento (*Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter capsulatus*, *R. sphaeroides* y *Oceanicola batsensis*). Esto se debe no a que la secuencia esté incompleta, sino a que el programa que efectúa el alineamiento tiende a formar la mayor cantidad de alineamientos de aminoácidos posible, y para mantener dichos alineamientos tiende a crear estos gaps artificiales con el fin de que se mantenga la concordancia entre los alineamientos de aminoácidos de las distintas secuencias, ya que éstas no poseen todas la misma longitud, pues mientras que la secuencia de referencia de *P. denitrificans* mide 104 aa, las secuencias de *Methylobacterium* miden 110 aa y las de *Magnetospirillum magnetotacticum* mide 106 aa. Esta diferencia en las longitudes de las secuencias es la

que forza al programa (ya sea ClustalW o Chimera) a formar gaps en pos de mantener el mayor número de alineamientos posible. No obstante, esto no debe ser motivo para creer que existen gaps en las secuencias o que éstas están incompletas. Como se muestra en este trabajo, todas las secuencias previamente trabajadas por Zarco-Zavala et al (2014) ya han sido plenamente actualizadas. Adicionalmente, se decidió añadir la secuencia actualizada de *Sinorhizobium meliloti*, una bacteria perteneciente a la familia de las Rhizobiaceae y por lo tanto filogenéticamente cercana a *Rhizobium etli* y *Bradyrhizobium japonicum*.

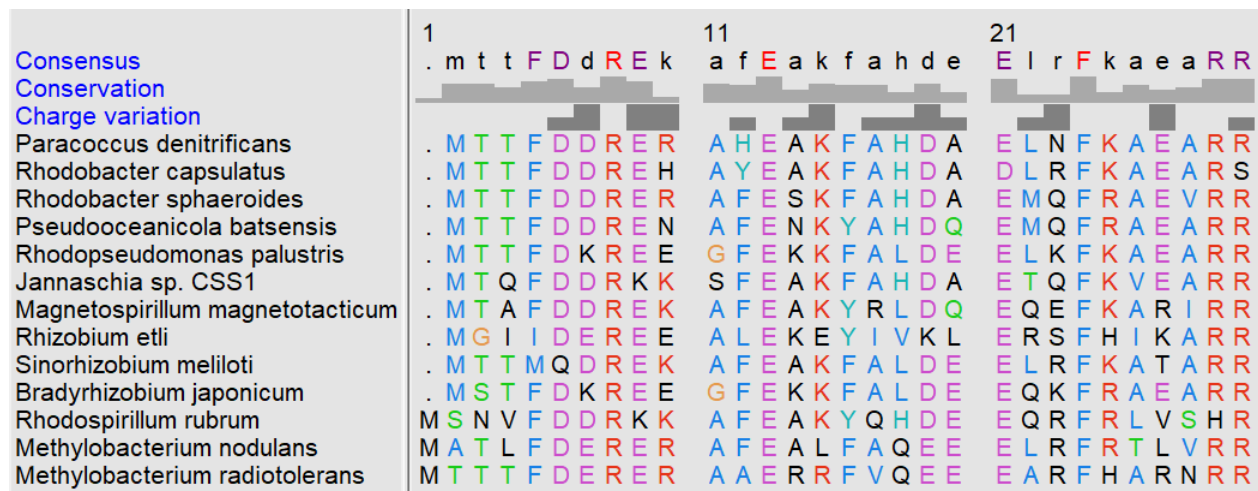


Figura 28. La secuencia de la subunidad ζ en diversas especies de α -proteobacterias de la familia Rhodobacteraceae (residuos 1 – 30). En la base de datos de Protein Database, la proteína aparece en todos los casos como DUF1476 (proteína con dominio de función desconocida) y de las 494 secuencias que fueron comparadas contra la secuencia de referencia, se escogió una docena de entre las más taxonómicamente similares para contrastarlas contra la secuencia de la subunidad ζ de PD1222.

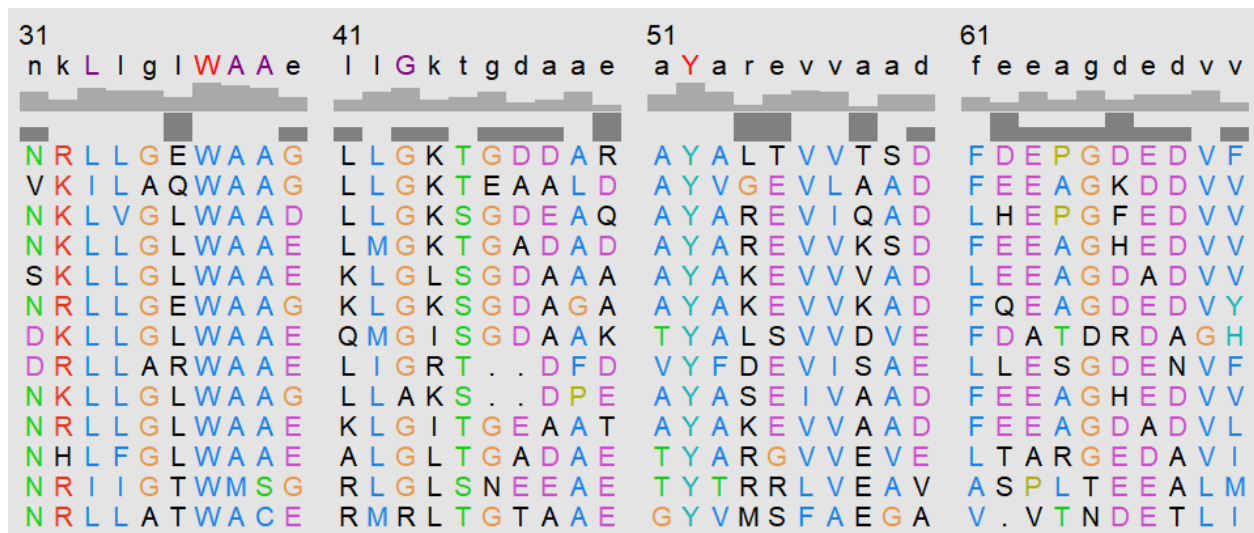


Figura 29. Continuación de **Figura 28**. La secuencia de la subunidad ζ en diversas especies de α -proteobacterias de la familia Rhodobacteraceae (residuos 31 – 70). El código de colores suele mostrar a los ácidos glutámico y aspártico en magenta, glicina en ocre, triptófano, leucina, isoleucina, valina y alanina en azul, tirosina e histidina en cian, treonina, glutamina y serina en verde, arginina y lisina en rojo y prolina en olivo. Cuando en un determinado residuo no hay un aminoácido predominante, el código de colores muestra a los residuos de una misma columna en negro.

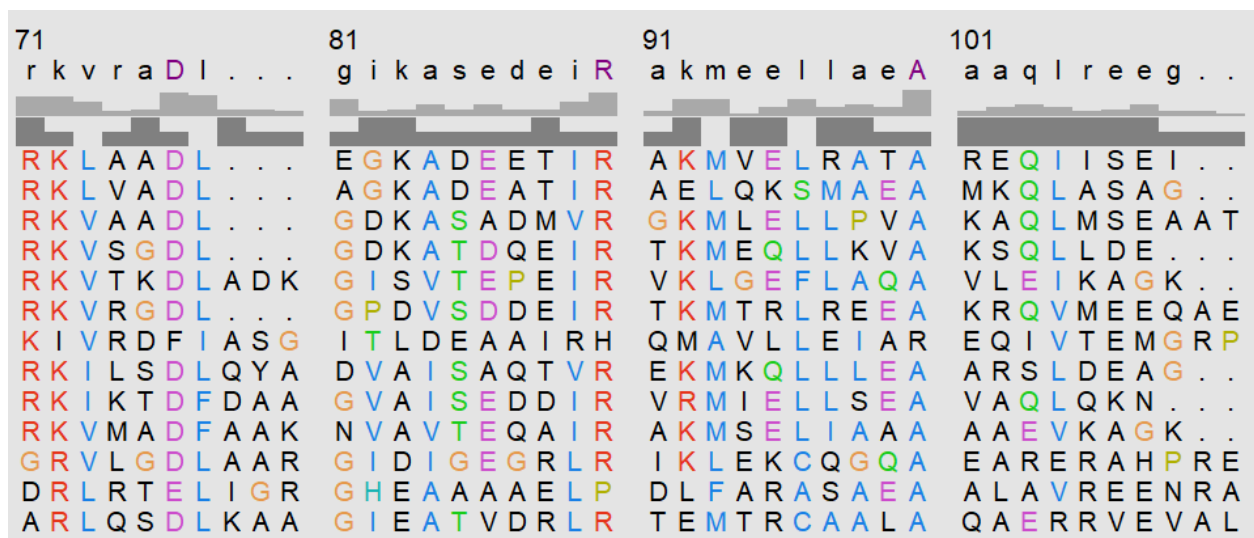


Figura 30. Continuación de **Figura 29**. La secuencia de la subunidad ζ en diversas especies de α -proteobacterias de la familia Rhodobacteraceae (residuos 71 – 10X o C-terminal). Las cepas utilizadas fueron: *Paracoccus denitrificans* (PD1222), *Rhodobacter capsulatus* (WP_013067880.1), *R. sphaeroides* (ATCC17025), *Pseudoceanicola batsensis* (WP_009804758.1), *Rhodopseudomonas palustris* (WP_119855633.1), *Jannaschia* sp (CCS1), *Magnetospirillum magnetotacticum* (WP_041039918.1), *Rhizobium etli* (CFN 42), *Sinorhizobium meliloti* (1021), *Bradyrhizobium japonicum* (WP_211385245.1), *Methylobacterium nodulans* (ORS2060) y *M. radiotolerans* (WP_012317426.1).

Comparando la **Figura 24** originalmente obtenida por Zarco-Zavala y colaboradores (2014) con las **Figuras 28, 29 y 30**, es claramente visible que las secuencias de diversas especies han sido actualizadas y completadas. Ejemplos de esto son las secuencias de *Rhodospirillum rubrum* y *Methylobacterium nodulans*, que en la **Figura 24** en el alineamiento previo de Zarco-Zavala et al, (2014), carecen de los primeros 2 o 3 aminoácidos del N-terminal, mientras que en el alineamiento actualizado se completaron estos 2-3 aminoácidos (ver **Figura 28 vs Figura 24**, en las últimas tres secuencias).

Asimismo, la secuencia de *Methylobacterium nodulans* muestra un gran gap a partir del residuo 77 en el alineamiento previo de Zarco-Zavala et al, (2014) y de la **Figura 24**, mismo que en las **Figuras 29 y 30**, puede verse ya completado, demostrándose que posee un alto grado de similitud con *M. radiotolerans*, perteneciente al mismo género. Es posible afirmar que existe un alto grado de conservación entre las distintas secuencias mostradas. Tal como se aprecia en la **Figura 28**, en los primeros 30 residuos de la secuencia se mantiene un grado constante de conservación, puesto que solo los residuos 3, 12, 21 y 22 muestran una alta tasa de variabilidad con respecto a la secuencia de referencia y unos con otros. Si se dividiese a la secuencia de referencia en tres secciones, la primera sección sería la de mayor grado de conservación, esto es congruente con lo ya reportado puesto que el N-terminal de la subunidad ζ es el que posee el dominio inhibitorio (Zarco-Zavala et al, 2014). Por ello, resulta lógico que se mantenga un alto grado de conservación, de no ser así, probablemente la función inhibitoria de la subunidad ζ se vería disminuída, o incluso totalmente abatida.

También cabe destacar que la secuencia de *Rhodospirillum rubrum* es la que más difiere con respecto a la secuencia de referencia, dado que muchos de sus residuos no coinciden con los de secuencias aledañas ni con los de la secuencia de referencia. En la parte superior de los alineamientos se muestran tres elementos que permiten una mejor visualización de los mismos. El primero de ellos es Consensus (consenso), el cual indica qué aminoácido es más abundante en cada particular residuo de la secuencia, por ejemplo; el residuo 1 siempre está constituido por una metionina, los residuos 7 y 20 siempre se componen de una arginina (R), excepto en la secuencia de

R. rubrum (que como se ha mencionado anteriormente, es la que presenta mayor variabilidad), el residuo 20 siempre es un ácido glutámico (E), con excepción de la secuencia de *Rhodobacter capsulatus*, donde es sustituido por ácido aspártico (D), este tipo de sustitución se le denomina sustitución conservativa.

En la **Figura 29**, que corresponde a la parte media de la proteína, se continúa observando un alto grado de conservación, siendo los residuos más conservados y abundantes: arginina (R), ácido glutámico (E), ácido aspártico (D), alanina (A), leucina (L), triptófano (W), valina (V) y glicina (G). Asimismo los residuos menos conservados son el 35, 40, 42, 47, 49, 53 y 57, mostrándose en color negro, indicativo de que no existe un consenso sobre cuál aminoácido debe ser el predominante en ese segmento de la secuencia. Este fenómeno puede observarse más notoriamente en la **Figura 30**, donde el grado de conservación disminuye, siendo pocos los residuos que se mantienen conservados. Un ejemplo de esto es, sorprendentemente, una metionina en el residuo 92, además de lisina (K) en los residuos 71 y 91, D en el residuo 75, leucina e isoleucina en el residuo 88 (otro caso de sustitución conservativa) y alanina en el residuo 99.

Curiosamente, las únicas bacterias que poseen un residuo de cisteína (C) cada una en su secuencia son *R. rubrum* y *M. radiotolerans* sin que se conozca el motivo de esto. El menor grado de conservación puede deberse a que este dominio de la proteína es menos rígido y por ende puede tener mayor flexibilidad en su composición. En general, la secuencia de la subunidad ζ mantiene un alto grado de conservación a lo largo de distintos géneros de α -proteobacterias, estando algunos más o menos lejanos filogenéticamente con respecto a *P. denitrificans*, lo cual es indicativo de que esta proteína exclusiva de esta clase de bacterias es determinante en su ubicuidad medioambiental.

Finalmente, para visualizar las regiones más conservadas y más variables de la subunidad ζ en la clase de las α -proteobacterias, el alineamiento de aproximadamente 500 secuencias de esta subunidad se analizó y procesó mediante el programa ConSurf, el cual despliega las regiones conservadas y variables de las proteínas en la estructura terciaria de las mismas en alguna estructura atómica resuelta para las proteínas de

interés. Dado que hay ya varias estructuras de la subunidad ζ aislada resueltas por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), se usó la estructura de la subunidad ζ de *Paracoccus denitrificans* identificada por el código del Protein Data Bank (PDB) denominado 2LL0. De esta estructura se tomó el primer confórmero mayormente representado de entre los confórmeros resueltos por RMN y los alineamientos mostrados anteriormente, actualizados y depurados, se cargaron en el programa ConSurf en línea en el sitio: <https://consurf.tau.ac.il/>. Para aumentar la precisión de este procedimiento, se usaron los alineamientos obtenidos en este trabajo para evitar que el programa hiciera alineamientos de manera automatizada dado que estos programas suelen cargar secuencias que no corresponden a la familia de proteínas en estudio.

Esto mejoró la exactitud del procedimiento y se obtuvieron claramente los aminoácidos y posiciones más conservados que se muestran en color guinda, mientras que los más variables se muestran en color azul claro, con las posiciones intermedias en conservación en rosa, y las intermedias en variabilidad en blanco. Como puede observarse en la última **Figura 31**, las regiones más conservadas corresponden a la región inhibitoria del N-terminal intrínsecamente desordenado, así como la α -hélice 1, y las hélices 2 y 3 y el asa que las conecta.

Con esta información evolutiva y funcional, se contribuye al desarrollo y diseño de mutantes puntuales para definir el papel de aminoácidos o regiones específicas de la proteína. Es notorio que de acuerdo a los modelos estructurales de la interacción ζ -PdF₁F₀, la región más conservada de ζ forma parte del dominio N-terminal inhibitorio que se inserta a la interfaz $\alpha_{DP}/\beta_{DP}/\gamma$, así como del dominio α -hélice-2-asa-2- α -hélice-3, que forma parte del dominio de interacción entre la subunidad ζ y la subunidad *b* catalítica de la PdF₁F₀-ATPasa. Por otro lado, la región variable de la superficie externa de la α -hélice 4 del C-terminal no establece interacciones con ningún dominio de las subunidades *a*, *b* o *c* de la F₁F₀-ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans*.

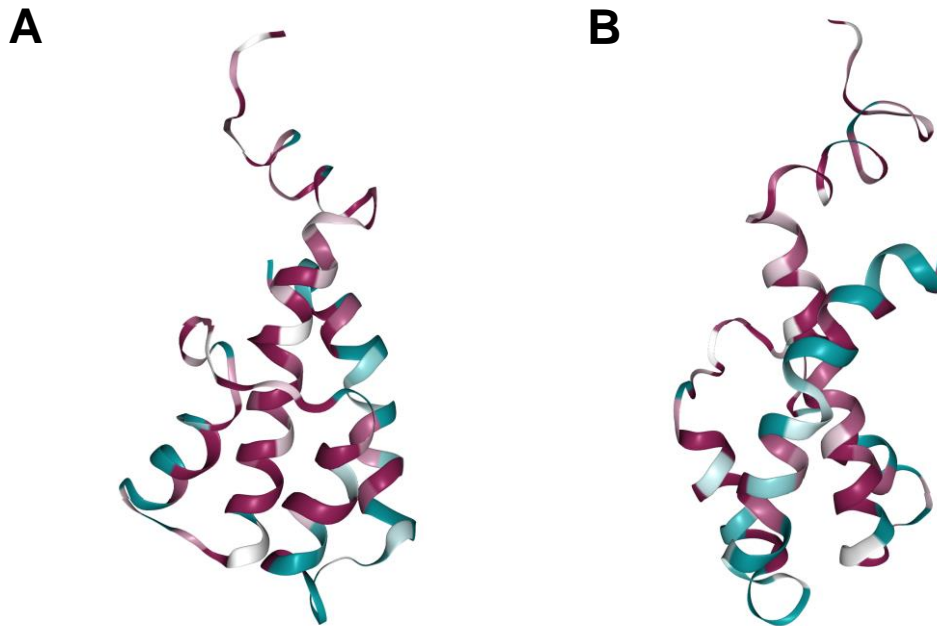


Figura 31. Conservación y variación de la subunidad ζ como inhibidor de la F_1F_0 -ATPasa de las α -proteobacterias mostrada en la estructura de la subunidad ζ de *Paracoccus denitrificans*. Los alineamientos mostrados en este trabajo se cargaron al programa ConSurf en línea y se obtuvo la representación en listones de la subunidad ζ en el programa Chimera mostrando el mismo código de colores de la **Figura 24** tomada de Zarco-Zavala et al (2014). Es decir: guinda, posiciones mayormente conservadas; rosa, medianamente conservadas; blanco, medianamente variables y azul claro, muy variables. Se observa que las regiones más conservadas (guinda) son el N-terminal inhibitorio desordenado, la α -hélice-1, y el dominio α -hélice-2-asa2- α -hélice-3 que inhiben y se unen a las subunidades α_{DP} , β_{DP} , γ de la PdF_1F_0 -ATPasa. Por otro lado, la α -hélice-4 del C-terminal es la región más variable y la superficie externa de ésta no tiene interacciones importantes con la ATP sintasa de *P. denitrificans*. Ver texto para más detalles. La estructura de la subunidad ζ es PDB_id: 2LL0.

CONCLUSIONES

- Es probable que el mecanismo de uñeta-trinquete observado en la subunidad ζ se conserve para el IF_1 en mitocondrias y las subunidades ϵ de otras eubacterias fuera de la clase de las α -proteobacterias.
- La subunidad ζ permite a la ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans* prácticamente unidireccional, en el sentido de que permite libremente la síntesis de ATP y al mismo tiempo que inhibe su hidrólisis.
- La subunidad ζ es exclusiva de la clase de las α -proteobacterias y en el género *Paracoccus* mantiene un alto grado de conservación en su estructura primaria.
- El alineamiento actualizado de las diversas secuencias demuestra que las α -proteobacterias que son más cercanas a *Paracoccus denitrificans* poseen un mayor grado de similitud en la composición de sus subunidades ζ .
- El N-terminal de la subunidad ζ es el más conservado de la proteína y coincide con el hecho de que este dominio ejerce el efecto inhibitorio sobre la actividad de F_1 - y F_1F_0 -ATPasa de *P. denitrificans* y otras α -proteobacterias.
- Esta actualización en las secuencias puede ayudar en futuras investigaciones de mutagénesis sitio-dirigida y en experimentos concernientes a *Paracoccus denitrificans* u otras α -proteobacterias estén éstas emparentadas o no.
- *Paracoccus denitrificans* es una α -proteobacteria de sumo interés para la investigación pues su versatilidad metabólica la vuelve una candidata idónea para ser un microorganismo modelo.

BIBLIOGRAFÍA

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* Vol. 370, 621 – 628.

<https://doi.org/10.1038/370621a0>

Aggeler, R., Haughton, M. A. & Capaldi, R. A. (1995). Disulfide bond formation between the COOH-terminal domain of the β subunits and the γ and ε subunits of the *Escherichia coli* F₁-ATPase. Structural implications and functional consequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(16), 9185 – 9191. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.16.9185>

Alabduladhem, T. O & Bordoni, B. Physiology, Krebs Cycle. [Updated 2021 Feb 7]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556032/>

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York, USA. Garland Science, 4th Ed.

Amzel M. L., Bianchet, M. A. Leyva, A. J. (2003). Understanding ATP synthesis: structure and mechanism of the F₁-ATPase. *Molecular Membrane Biology*. 20 (1), 27 – 33. [doi:10.1080/0968768031000066532](https://doi.org/10.1080/0968768031000066532)

Antes, I., Davis, C., Wang, H. & Oster, G. (2003). The unbinding of ATP from F₁-ATPase. *Biophysical Journal*, 85(2), 695 – 706. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74513-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74513-5)

Antonieli, M., Giorgio, V., Fogolari, F., Glick, G. D., Bernardi, P. & Lippe, G. (2014). The oligomycin-sensitivity conferring protein of mitochondrial ATP synthase: emerging new roles in mitochondrial pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 7513 – 7536. <https://doi.org/10.3390/ijms15057513>

Arselin, G., Giraud, M. F., Dautant, A., Vaillier, J., Brethes, D., Coulary-Salin, B., Schaeffer, J. & Velours, J. (2003) The GxxxG motif of the transmembrane domain of subunit ε is involved in the dimerization/oligomerization of the yeast ATP synthase

complex in the mitochondrial membrane. *European Journal of Biochemistry*, 270(8), 1875 – 1884. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03557.x>

Arselin, G., Vaillier, J., Salin, B., Schaeffer, J., Giraud, M. F., Dautant, A., Brethes, D. & Velours, J. (2004) The modulation in subunits ϵ and γ amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *The Journal of Biological Chemistry* 279(39), 40392 – 40399. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404316200>

Baker, S. C., Ferguson, S. J., Ludwig, B., Page, M. D., Richter, O. M., & van Spanning, R. J. (1998). Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1046 – 1078. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.4.1046-1078.1998>

Bárcena, C., Mayoral, P. & Quirós, P. M. (2018). Mitohormesis, an antiaging paradigm. *International Reviews of Cell and Molecular Biology*, Vol. 340, 35 – 77. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.002>

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 F_1 -ATPase. *PNAS*, 111(31), 11305 – 11310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411560111>

Baumann, B., Snozzi, M., Zehnder, A. J., & Van Der Meer, J. R. (1996). Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *Journal of Bacteriology*, 178(15), 4367 – 4374. <https://doi.org/10.1128/jb.178.15.4367-4374.1996>

Bongers, L. (1967). Phosphorylation in hydrogen bacteria. *Journal of bacteriology*, 93(5), 1615 – 1623. <https://doi.org/10.1128/JB.93.5.1615-1623.1967>

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. (1997). The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 66, 717 – 749. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.717>

Brandt, K., Maiwald, S., Herkenhoff-Hesselmann, B., Gnirß, K., Greie, J. C., Dunn, S. D., & Deckers-Hebestreit, G. (2013). Individual interactions of the *b* subunits within the stator of the *Escherichia coli* ATP synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(34), 24465 – 24479. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.465633>

Bravo, C., Minauro-Sanmiguel, F., Morales-Ríos, E., Rodríguez-Zavala, J. S. & García-Trejo, J. J. (2004). Overexpression of the inhibitor protein IF₁ in AS-30D hepatoma produces a higher association with mitochondrial F₁F₀ ATPsynthase compared to normal rat liver: functional and cross-linking studies. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36(3), 257 – 264. <https://doi.org/10.1023/b:jobb.0000031977.99479.ea>.

Brodie, A. F., & Gutnick, D. L. (1967). Electron transport and oxidative phosphorylation in microbial systems. United States. <https://doi.org/10.2172/6566186>

Bustos, D. M. & Velours, J. (2005). The modification of the conserved GXXXG motif of the membrane-spanning segment of subunit γ destabilizes the supramolecular species of yeast ATP synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(32), 29004 – 29010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502140200>

Cabezón, E. P., Butler, J. G., Runswick, M. J. & Walker, J. E. (2000). Modulation of the oligomerization state of the bovine F₁-ATPase inhibitor protein, IF₁, by pH. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25460 – 25464. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003859200>

Cabezón, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. & Walker, J. E. (2003) The structure of bovine F₁-ATPase in complex with its regulatory protein IF₁. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(9), 744 – 750. <https://doi.org/10.1038/nsb966>

Carbajo, R. J., Kellas, F. A., Runswick, M. J., Montgomery, M. G., Walker, J. E. & Neuhaus, D. (2005). Structure of the F₁-binding domain of the stator of bovine F₁F₀-ATPase and how it binds an α -Subunit. *Journal of Molecular Biology*, 351(4), 824 – 838. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.012>

Carlson, C. A. & Ingraham, J. L. (1983). Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*. *Applied and*

Environmental Microbiology, 45(4), 1247 – 1253. <https://doi.org/10.1128/aem.45.4.1247-1253.1983>

Collins, M. P. & Forgac, M. (2018). Regulation of V-ATPase assembly in nutrient sensing and function of V-ATPases in breast cancer metastasis. *Frontiers in Physiology*, Vol. 9, 902. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00902>

Collopy-Itallo, J., Rodrigues, M. L., Celuta, A. S., Travassos, L. R. & Meyer-Fernandes, J. R. (2005). Characterization of an ecto-ATPase activity in *Cryptococcus neoformans*. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research*, 5(10), 899 – 907. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2005.04.005>.

De la Rosa-Morales, F. (2005). Composición de Subunidades y Mecanismo de Regulación de la F₁F₀-ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans*. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Biológicas (Biología Experimental), Facultad de Ciencias, (Dirección General de Bibliotecas: Universidad Nacional Autónoma de México, U.N.A.M.). <http://132.248.9.195/ptd2005/00377/0346694/Index.html>

Deguchi, S., Shimoshige, H., Tsudome, M., Mukai, S., Corkey, R. W., Ito, S. & Horikoshi, K. (2011). Microbial growth at hyperaccelerations up to 403,627 × g. *PNAS*, 108(19), 7997 – 8002. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018027108>

Dienhart, M., Pfeiffer, K., Schagger, H. & Stuart, R. A. (2002). Formation of the yeast F₁F₀-ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, Inh1. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39289 – 39295. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205720200>

Dibrova, D. V., Galperin, M. Y., Mulkidjanian, A. Y. (2010). Characterization of the N-ATPase, a distinct, laterally transferred Na⁺-translocating form of the bacterial F-type membrane ATPase. *Bioinformatics*, 26(12), 1473 – 1476. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq234>

Dreyfus, G. La ATP sintasa, un viejo amor del doctor Gómez Puyou. *Revista Digital Universitaria* [en línea]. 1 de enero de 2015, Vol. 16, No.1 [Consultada:]. Disponible en Internet: <<http://www.revista.unam.mx/vol.16/num1/art03/index.html>> ISSN: 1607-6079.

Ettema, T. J. G. & Andersson, S. G. E. (2009). The α -proteobacteria: the Darwin finches of the bacterial world. *Biology Letters*, 5(3), 429 – 432. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0793>

Feniouk, B. A., Suzuki, T. & Yoshida, M. (2006). The role of subunit ϵ in the catalysis and regulation of F_0F_1 -ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1757 (5 - 6), 326 – 338. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.03.022>

Ferguson, S. J. (2018). *Paracoccus denitrificans* oxidative phosphorylation: retentions, gains, losses, and lessons en route to mitochondria. *IUBMB Life*, 70(12), 1214 – 1221. <https://doi.org/10.1002/iub.1962>

Ferla, M. P., Thrash, J. C., Giovannoni, S. J., & Patrick, W. M. (2013). New rRNA gene-based phylogenies of the α -proteobacteria provide perspective on major groups, mitochondrial ancestry and phylogenetic instability. *PloS one*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083383>

Fernández-Cárdenas, L.P., Villanueva-Chimal, E., Salinas, L.S., José -Núñez, C., Tuena de Gómez Puyou, M. & Navarro, R.E. (2017). *Caenorhabditis elegans* ATPase inhibitor factor 1 (IF₁) MAI-2 preserves the mitochondrial membrane potential (Dcm) and is important to induce germ cell apoptosis. *PLoS ONE*, 12(8), e0181984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181984>

Fillingame, R. H., Angevine, C. M. & Dmitriev, O. Y. (2003). Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 555 (1), 29 – 34. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01101-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01101-3)

Flores-Vyeira, R., Raya-Pérez, J. C. & Torres-Márquez, E. M. (2005). Proteínas cinasas dependientes de Ca^{+2} : características y activación. *Revista de Educación Bioquímica*, 24(3,4), 74 – 80. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Disponible en http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2005/03/f_74-80_PCinasas.pdf

Gabellieri, E., Strambini, G. B., Baracca, A. & Solaini, G. (1997). Structural mapping of the ϵ -subunit of mitochondrial H(+)-ATPase complex (F_1). *Biophysical Journal*, 72(4), 1818 – 1827. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78828-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78828-3)

García-Aguilar, A. & Cuezva, J. M. (2018). A Review of the Inhibition of the Mitochondrial ATP Synthase by IF_1 in vivo: Reprogramming energy metabolism and inducing mitohormesis. *Frontiers in Physiology*, Vol. 9, 1 – 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01322>

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 Trejo, J. J. (2019). La subunidad ζ de *Paracoccus denitrificans* es una uñeta-trinquete o inhibidor unidireccional del nanomotor F_1F_0 ATPasa. *Mensaje Bioquímico*, 43, 29 – 41. <http://bq.facmed.unam.mx/tab/wp-content/uploads/2019/12/4-Garc%C3%ADa-Trejo-Jos%C3%A9.pdf>

García, J. J., Minauro-Sanmiguel, F. & Bravo, C. (2002) Mitochondrial ATP synthase: Structure, function, assembly, and a topography model for human subunit 6. Capítulo 6. En: *Recent research developments in human mitochondrial myopathies*. Editor: García J.J. Research Signpost. Trivandrum, India. ISBN: 81-7736-139-2. Vol. 1; Pág. 127-150. 1ª Edición, 1000 ejemplares.

García-Trejo, J. J. & Morales-Ríos, E. (2008). Regulation of the F_1F_0 -ATP synthase rotary nanomotor in its monomeric-bacterial and dimeric-mitochondrial forms. *Journal of Biological Physics*, Vol. 34, 197 – 212. <https://doi.org/10.1007/s10867-008-9114-z>

García-Trejo, J. J., Morales-Ríos, E., Cortés-Hernández, P. & Rodríguez-Zavala, J. S. (2006). The inhibitor protein (IF_1) promotes dimerization of the mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase. *Biochemistry*, 45(42), 12695 – 12703. <https://doi.org/10.1021/bi060339j>

García-Trejo, J. J., Ogilvie, I., Robinson, B. & Capaldi, R. A. (2000). Structure, functioning, and assembly of the ATP synthase in cells from patients with the T8993G mitochondrial DNA mutation. Comparison with the enzyme in $\rho 0$ cells completely lacking

mtDNA. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 11075 – 11081.
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.11075>

García-Trejo, J. J., Zarco-Zavala, M. & Morales-Ríos, E. (2012). Estructura y mecanismo de la nueva subunidad inhibitoria ζ del nanomotor F_1F_0 -ATP sintasa de las α -proteobacterias en *Paracoccus denitrificans*. *Mensaje Bioquímico*, Vol. 36, 106 – 126.

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 F_1F_0 -ATPase nanomotor of *Paracoccus denitrificans* and related α -Proteobacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(2), 538 – 546.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.688143>

García-Trejo, J. J., Zarco-Zavala, M. & Morales-Ríos, E. (2012). Estructura y regulación del nanomotor que le da energía a la vida: la F_1F_0 -ATP sintasa. *Mensaje Bioquímico*, Vol. 35, 39 – 52.

Gressert, M. J., Myers, J. A. & Boyer, P. D. (1982). Catalytic site cooperativity of beef heart mitochondrial F₁ adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(20), 12030 – 12038. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)69515-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)69515-3)

Gromet-Elhanan, Z., Khananshvil, D., Weiss, S., Kanazawa, H., & Futai, M. (1985). ATP synthesis and hydrolysis by a hybrid system reconstituted from the β -subunit of *Escherichia coli* F_1 -ATPase and β -less chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(23), 12635 – 12640. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38918-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38918-4)

Guo, H., Suzuki, T. & Rubinstein, J. L. (2019). Structure of a bacterial ATP synthase. *eLife*, 8, e43128. <https://doi.org/10.7554/eLife.43128>

Guo, H., Courbon, G.M., Bueler, S.A. et al. Structure of mycobacterial ATP synthase bound to the tuberculosis drug bedaquiline. *Nature*, Vol. 589, 143–147 (2021).
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-3004-3>

Gupta, R. S., & Mok, A. (2007). Phylogenomics and signature proteins for the α -proteobacteria and its main groups. *BMC Microbiology*, Vol. 7, 106. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-106>

Hakulinen, J. K., Klyszejko, A. L., Hoffmann, J., Eckhardt-Strelau, L., Brutschy, B., Vonck, J. & Meier, T. (2012). Structural study on the architecture of the bacterial ATP synthase F_0 motor. *PNAS*, 109(30), 2050 – 2056. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203971109>

Harms, N. & van Spanning, R. J. (1991). C1 metabolism in *Paracoccus denitrificans*: genetics of *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 23(2), 187 – 210. <https://doi.org/10.1007/BF00762217>

Haughton, M. A., & Capaldi, R. A. (1995). Asymmetry of *Escherichia coli* F_1 -ATPase as a function of the interaction of α - β subunit pairs with the γ and ϵ subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(35), 20568 – 20574. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.35.20568>

Higuti, T., Tsurumi, C., Osaka, F., Kawamura, Y., Tsujita, H., Yoshihara, Y., Taki, I., Tanaka, K. & Ichihara, A. (1991). Molecular cloning of cDNA for the import precursor of human subunit *b* of H^+ -ATP synthase in mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 178(3), 1014 – 1020. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)90993-H](https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)90993-H)

Hilbers, F., Eggers, R., Pradela, K., Friedrich, K., Herkenhoff-Hesselmann, B., Becker, E., & Deckers-Hebestreit, G. (2013). Subunit δ is the key player for assembly of the H^+ -translocating unit of *Escherichia coli* F_0F_1 -ATP synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(36), 25880 – 25894. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484675>

Horak, A., Horak, H., Dunbar, B., Fothergill, J. E. & Wilson, S. B. (1989). Plant mitochondrial F_1 -ATPase. The presence of oligomycin-sensitivity-conferring protein (OSCP). *Biochemical Journal*, 263(1), 301 – 304. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81316-g](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81316-g)

Hördt, A., López, M. G., Meier-Kolthoff, J. P., Schleuning, M., Weinhold, L. M., Tindall, B. J., Gronow, S., Kyrpides, N. C., Woyke, T., & Göker, M. (2020). Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of

Alphaproteobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11 (Apr 7), 468.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00468>

John, P. & Whatley, F. R. (1975). *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature*, Vol. 254, 495 – 498. <https://doi.org/10.1038/254495a0>

Karnkowska, A., Vacek, V., Zubáčová, Z., Treitli, S. C., Petrželková, R., Eme, L., Novák, L., Žárský, V., Barlow, L. D., Herman, E. K. & Soukal, P. (2016). An eukaryote without a mitochondrial organelle. *Current Biology*, 26 (10), 1274 – 1284.
<https://doi:10.1016/j.cub.2016.03.053>

Kato, S., Yoshida, M. & Kato-Yamada, Y. (2007). Role of the subunit of thermophilic F₁-ATPase as a sensor for ATP. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(52), 37618 – 37623. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707509200>

Keis, S., Stocker, A., Dimroth, P. & Cook, G. M. (2006). Inhibition of ATP hydrolysis by thermoalkaliphilic F₁F₀-ATP synthase is controlled by the C-terminus of the epsilon subunit. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 3796 – 3804.
<https://doi.org/10.1128/JB.00040-06>

Kelly, D. P., Euzéby, J. P., Goodhew, C. F. & Wood, A. P. (2006). Redefining *Paracoccus denitrificans* and *Paracoccus pantotrophus* and the case for a reassessment of the strains held by international culture collections. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(10), 2495 – 2500.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.64401-0>

Krah, A. (2015). Linking structural features from mitochondrial and bacterial F-type ATP synthases to their distinct mechanisms in ATPase inhibition. *Progress in Physics and Molecular Biology*, Vol. 119, 94 – 102.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.06.005>

Kühlbrandt, W. (2004). Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 5, 282 – 295. <https://doi.org/10.1038/nrm1354>

Kumar, S. & Spiro, S. (2017). Environmental and genetic determinants of biofilm formation in *Paracoccus denitrificans*. *American Society for Microbiology Journals*, 2(5), 1 – 11. <https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00350-17>

Lapierre P., Shial, R. & Gogarten, P. J. (2006). Distribution of F- and A/V-type ATPases in *Thermus scotoductus* and other closely related species. *Systematics and Applied Microbiology*, 29(1), 15 – 23. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.06.004>

Liu, S., Charlesworth, T. J., Bason, J. V., Montgomery, M. G., Harbour, M. E., Fearnley, I. M., & Walker, J. E. (2015). The purification and characterization of ATP synthase complexes from the mitochondria of four fungal species. *The Biochemical Journal*, 468(1), 167 – 175. <https://doi.org/10.1042/BJ20150197>

Lu, Y.M., Miyazawa, K., Yamaguchi, K., Nowaki, K., Iwatsuki, H., Wakamatsu, Y., Ichikawa, N. & Hashimoto, T. (2001). Deletion of mitochondrial ATPase inhibitor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* decreased cellular and mitochondrial ATP levels under non-nutritional conditions and induced a respiration- deficient cell-type. *Journal of Biochemistry*, 130(6), 873 – 878. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003060>

Matthies, D., Preiss, L., Klyszejko, A. L., Müller, D. J., Cook, G. M., Vonck, J. & Meier, T. (2009). The c13 ring from a thermoalkaliphilic ATP synthase reveals an extended diameter due to a special structural region. *Journal of Molecular Biology*, 388(3), 611 – 618. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.052>

Maxman, A. (2010). Virus-like particles speed bacterial evolution. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/news.2010.507>

Mendoza Hoffmann, Francisco., Zarco Zavala, Mariel., Ortega, Raquel. & García Trejo, J. J. (2018a). Control of rotation of the F₁F₀-ATP synthase nanomotor by an inhibitory α -helix from unfolded ϵ or intrinsically disordered ζ and IF₁ proteins. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 50(5), 403 – 424. <https://doi.org/10.1007/s10863-018-9773-9>

Mendoza-Hoffmann, F., Pérez-Oseguera, Á., Cevallos, M. A., Peña-Segura, C., Espinoza, S. E., Uribe-Carvajal, S. & García-Trejo, J. J. (2018b). The biological role of

the ζ subunit as unidirectional inhibitor of the F_1F_0 -ATPase of *Paracoccus denitrificans*. Cell Reports, Vol 22, 1067 – 1078. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.106>

Mendoza-Hoffmann, F., Tesis Doctoral (2018c). Rol biológico de la subunidad ζ como un inhibidor unidireccional de la F_1F_0 -ATPasa de *Paracoccus denitrificans*. Tesis de Doctor en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México. https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/QGYHDSBTTY78A6SPCK9PSNFIFPSAL8KPQAKUCUAVI551UM5D8D-31530?func=find-b&local_base=TES01&request=mendoza+hoffmann+&find_code=WRD&adjacent=N&filter_code_2=WYR&filter_request_2=&filter_code_3=WYR&filter_request_3=

Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C. & García-Trejo, J. J. (2002). Cross-linking of the endogenous inhibitor protein (IF_1) with rotor (γ , ϵ) and stator (α) 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., Wilkins, S. & García-Trejo, J. J. (2005). Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: Novel F_0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogénesis. PNAS, 102(35), 12356 – 12358. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0503893102

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

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 F_1F_0 -ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related-proteobacteria. The FASEB Journal, Vol. 45, 599 – 608. <https://doi.org/10.1096/fj.09-137356>

Morales-Ríos, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., García-Trejo, J. J. & Walker, J. E. (2015a). Structure of a catalytic dimer of the α - and β -subunits of the F-ATPase from *Paracoccus denitrificans* at 2.3 Å resolution. Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications, Oct; 71(Pt 10), 1309 – 1317. <https://doi.org/10.1107/S2053230X15016076>

- Morales-Ríos, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. (2015b). Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution. PNAS, 112(43), 13231 – 13236. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1517542112
- Moreno, E. (1998). Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome?, FEMS Microbiology Reviews, 22(4), 255 – 275. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00370.x>
- Morinaga, K., Yoshida, K., Takahashi, K., Nomura, N. & Toyofuku, M. (2020). Peculiarities of biofilm formation by *Paracoccus denitrificans*. Applied Microbiology and Biotechnology, 104(6), 2427 – 2433. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10400-w>
- Mukherjee, S., & Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. Nature reviews. Microbiology, 17(6), 371 – 382. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0186-5>
- Müller, W. E. G., Schröder, H. C. & Xiaohong, W. (2019). The phosphoanhydride bond: One cornerstone of life. Elements in Biochemistry, 41(4), 22 – 27. <https://doi.org/10.1042/BIO04104022>
- Nakamoto, R. K., Baylis-Scanlon, J. A., & Al-Shawi, M. K. (2008). The rotary mechanism of the ATP synthase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 476(1), 43 – 50. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.05.004>
- Nakamura, J., Fujikawa, M. & Yoshida, M. (2013). IF₁, a natural inhibitor of mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice. Bioscience Reports, 33(5), 735 – 741. <https://doi.org/10.1042/BSR20130078>
- Nath, S. & Villadsen, J. (2015). Oxidative phosphorylation revisited. Biotechnology and Bioengineering, 112(3), 429 – 437. <https://doi.org/10.1002/bit.25492>
- Nirody, J. A., Budin, I. & Rangamani, P. (2020). ATP synthase: evolution, energetics, and membrane interactions. Journal of General Physiology, 152(2), 1 – 29. <https://doi.org/10.1085/jgp.201912475>

Noyi, H., Yasuda, R., Yoshida, M. & Kinosita, K Jr. (1997). Direct observation of rotation of the F₁-ATPase. *Nature*, 386(6622), 299 – 302. <https://doi.org/10.1038/386299a0>

Nuevo Tapioles, C. (2019). Regulación de la OXPHOS mediada por IF1 y su potencial como terapéutica en cancer. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Molecular. https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/688592/nuevo_tapioles_cristina.pdf?sequence=1

Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brethes, 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>

Pullman, M. E. & Monroy, G. C. (1963). A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 238(11), 3762 – 3769.

Radax, C., Sigurdsson, O., Hreggvidsson, G. O., Aichinger, N., Gruber, C., Kristjansson, J. K., Stan-Lotter, H. (1998). F- and V-ATPases in the genus *Thermus* and related species. *Systematics and Applied Microbiology* 21(1), 12 – 22. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(98\)80003-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80003-9)

Rich, P. (2003). The cost of living. *Nature*, Vol 421, 583.

Romero-Aguilar, L., Esparza-Perusquía, M., Langner, T., García-Cruz, G., Feldbrügge, M., Zavala, G., Pardo, J. P., Martínez, F. & Flores-Herrera, O. (2021). Deletion of the natural inhibitory protein Inh1 in *Ustilago maydis* has no effect on the dimeric state of the F₁F₀-ATP synthase but increases the ATPase activity and reduces the stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1862(7), 148429. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2021.148429>

Rouslin W. (1991). Regulation of the mitochondrial ATPase in situ in cardiac muscle: role of the inhibitor subunit. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 23(6), 873 – 888. <https://doi.org/10.1007/BF00786006>

Rouslin, W. & Broge C. W. (1993). Mechanisms of ATP conservation during ischemia in slow and fast heart rate hearts. *American Journal of Physiology*, 264(1), 209 – 216. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.264.1.C209>

Schep, D. G., Zhao, J. & Rubinstein, J. L. (2016). Models for the *a* subunits of the *Thermus thermophilus* V/A-ATPase and *Saccharomyces cerevisiae* V-ATPase enzymes by cryo-EM and evolutionary covariance. *PNAS*, 113(12), 3245 – 3250. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521990113>

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)

Sedláček, V., & Kučera, I. (2019). Modifications of the aerobic respiratory chain of *Paracoccus denitrificans* in response to superoxide oxidative stress. *Microorganisms*, 7(12), 640 – 653. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120640>

Senior, A. E., Nadanaciva, S. & Weber, J. (2002). The molecular mechanism of ATP synthesis by F_1F_0 -ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1553(3), 188 – 211. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(02\)00185-8](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(02)00185-8)

Si, Y. Y., Xu, K. H., Yu, X. Y., Wang, M. F. & Chen X. H. (2019). Complete genome sequence of *Paracoccus denitrificans* ATCC 19367 and its denitrification characteristics. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(7) 486 – 495. <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0037>

Steinrücke, P. & Ludwig, B. (1993). Genetics of *Paracoccus denitrificans*. *FEMS Microbiology Reviews*, 10 (1-2), 83 – 117. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(93\)90505-v](https://doi.org/10.1016/0378-1097(93)90505-v)

Stouthamer, A. H. (1991). Metabolic regulation including anaerobic metabolism in *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 23(2), 163 – 185. <https://doi.org/10.1007/BF00762216>

Stouthamer, A. H. (1992). Metabolic pathways in *Paracoccus denitrificans* and closely related bacteria in relation to the phylogeny of prokaryotes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 61(1) 1 – 33. <https://doi.org/10.1007/BF00572119>

- Stouthamer, A. H., de Boer, A. P., van der Oost, J. & van Spanning, R. J. (1997). Emerging principles of inorganic nitrogen metabolism in *Paracoccus denitrificans* and related bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 71 (1 - 2), 33 – 41. <https://doi.org/10.1023/a:1000113824961>
- Takumi, K. & Nonaka, G. (2016). Bacterial cysteine-inducible cysteine resistance systems. *Journal of Bacteriology*, 198(9), 1384 – 1392. <https://doi.org/10.1128/JB.01039-15>
- Tanigawara, M., Tabata, K. V., Ito, Y., Ito, J., Watanabe, R., Ueno, H., Ikeguchi, M. & Noji, H. (2012). Role of the DELSEED loop in torque transmission of F₁-ATPase. *Biophysical Journal*, 103(5), 970 – 978. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.06.054>
- Toei, M., Saum, R. & Forgac, M. (2010). Regulation and isoform function of the V-ATPases. *Biochemistry*, 49 (23), 4715 – 4723. <https://doi.org/10.1021/bi100397s>
- Tsunoda, S. P., Rodgers, A. J. W., Aggeler, R., Wilce, M. C. J., Yoshida, M. & Capaldi, R. A. (2001). Large conformational changes of the ϵ subunit in the bacterial F₁F₀-ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme. *PNAS*, 98(12), 6560 – 6564. <https://doi.org/10.1073/pnas.111128098>.
- Van Verseveld, H. W. & Bosma, G. (1987). The respiratory chain and energy conservation in the mitochondrion-like bacterium *Paracoccus denitrificans*. *Microbiological Sciences*, 4(11), 329 – 333.
- Varghese, F., Blaza, J. N., Jones, A., Jarman, O. D., & Hirst, J. (2018). Deleting the IF₁-like ζ subunit from *Paracoccus denitrificans* ATP synthase is not sufficient to activate ATP hydrolysis. *Open Biology*, 8(1), 170 – 206. <https://doi.org/10.1098/rsob.170206>
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., & Nesse, L. L. (2020). Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9 (2), 59. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>
- Walker, J. E., Fearnley, I. M., Gay, N. J., Gibson, B. W., Northrop, F. D., Powell, S. J., Runswick, M. J., Saraste, M. & Tybulewicz, V. L. J. (1985). Primary structure and

subunit stoichiometry of F₁-ATPase from bovine mitochondria. *Journal of Molecular Biology*, 184(4), 677 – 701. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(85\)90313-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(85)90313-4)

Wilkins, S., Borchardt, D., Weber, J. & Senior A. E. (2005) Structural characterization of the interaction of the δ and α subunits of the *Escherichia coli* F₁F₀-ATP synthase by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 44(35), 11786 – 11794. <https://doi.org/10.1021/bi0510678>

Wilson, D. F. (2017). Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism. *The Journal of Physiology*, 595(23), 7023 – 7038. <https://doi.org/10.1113/JP273839>

Wu, Q., Andranaivomamanjaona, T., Tetaud, E., Corvest, V. & Haraux, F. (2014). Interactions involved in grasping and locking of the inhibitory peptide IF₁ by mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1837(6), 761 – 772. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.01.023>

Yahalomi, D., Atkinson, S. D., Neuhof, M., Chang, S. E., Hervé, P., Cartwright, P., Jerri, B. L. & Huchon, D. (2020). A cnidarian parasite of salmon (Myxozoa: Henneguya) lacks a mitochondrial genome. *PNAS*, 117(10), 5358 – 5363. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909907117>

Yoshida, K., Toyofuku, M., Obana, N. & Nomura, N. (2017). Biofilm formation by *Paracoccus denitrificans* requires a type I secretion system-dependent adhesin BapA. *FEMS Microbiology Letters*, 364(4), 1 – 7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx029>

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*, Vol. 28, 2146 – 2157. <https://doi.org/10.1096/fj.13-241430>

Zarco-Zavala, M., Mendoza-Hoffmann, F. & García Trejo, J. J. (2018). Unidirectional regulation of the F₁F₀-ATP synthase nanomotor by the ζ pawl-ratchet inhibitor protein of *Paracoccus denitrificans* and related α -proteobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, Vol. 1859, 762 – 774. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.06.005>

Zarco-Zavala, M. Watanabe, R., McMillan, D. G. G., Suzuki, T., Ueno, H., Mendoza Hoffmann, F., García Trejo, J. J. & Noji, H. (2020). The 3 × 120° rotary mechanism of *Paracoccus denitrificans* F₁-ATPase is different from that of the bacterial and mitochondrial F₁-ATPases. PNAS, 117(47), 29647 – 29657. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2003163117

Zhong, X. & Guidotti, G. (1999). A yeast Golgi E-type ATPase with an unusual membrane topology. The Journal of Biological Chemistry, 274(46), 32704 – 32711. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32704>