



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis funcional del extremo *N*-terminal de la subunidad  $\zeta$  de la ATP sintasa de  
*Paracoccus denitrificans*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Gilberto Garduño Javier

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. José de Jesús García Trejo  
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Miguel Ángel Carlos Cevallos Gaos  
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM  
Dr. Alfredo Torres Larios  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad de México. Noviembre, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

*Para mis maestros y para mis amigos. En especial a todas aquellas personas que, enseñándome un poco de cualquier cosa me compartieron su emoción por aprender y me brindaron su amistad simultáneamente, convirtiéndose en maestros y amigos al mismo tiempo.*

# Agradecimientos

(En orden alfabético)

Se Agradece al *Biól. Mol. Emiliano Salinas López*, por el apoyo al analizar los contactos e interacciones entre la subunidad  $\zeta$  y F1, empleando el software Getcontacts y PLIP.

Se Agradece a los *colegas del laboratorio*, por todo el innumerable apoyo experimental brindado durante la realización de esta tesis. Además de todos los momentos que pasamos que llevaron a disfrutar enormemente el camino y hacerlo más agradable cuando no fuera tan sencillo. Gracias Alan, Emiliano, Jorge, Joselin, Sharon, y Oliver.

Se Agradece a CONACYT por la beca de maestría otorgada durante el proyecto.

Se Agradece al *Departamento de superación académica de la Facultad de Química*, por la formación en el subprograma 121 de formación de profesores.

Se Agradece al *Dr. Francisco Guillermo Mendoza Hoffmann*, por compartirme e incentivarme la pasión por la ciencia y en específico por la ATP sintasa. Por ser mi maestro en la mayoría de las técnicas utilizadas en esta tesis. Por motivarme cuando los experimentos no salían como deberían y por compartir la emoción cuando si salían. Por todo el apoyo que no tiene que ver con la academia. En resumen, por ser mi maestro y por tu amistad. Gracias Pancho.

Se Agradece al *Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre*, por permitirme formar equipo con usted para impartir la clase de Bioquímica a los alumnos de licenciatura. Por todo lo que aprendí durante ese periodo y por permitirme presentar las clases con toda la confianza de su apoyo.

Se Agradece al *Dr. José de Jesús García Trejo*, por la dirección y comentarios que guiaron la realización de este proyecto, y por el apoyo para asistir al congreso XII de Bioenergética y Biomembranas.

Se Agradece al *Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos*, además de por los agradecimientos referentes al comité tutorial, por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio y aprender a fondo las técnicas de biología molecular que se emplearon en esta tesis.

Se Agradece a la *Dra. Gloria Hernández Alcántara*, por la donación de plásmidos, cepas y demás reactivos, que facilitaron el trabajo experimental de la tesis. Además de por sus útiles comentarios que nos ayudaron a hacer más eficientes los experimentos.

Se Agradece a la *Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares*, por permitirme retomar sus clases de bioquímica, lo que me motivo a participar como profesor en formación posteriormente. Gracias también por todos los comentarios y dudas que con gusto me resolvió y por compartirme el gusto por la ciencia.

Se Agradece a la *Dra. Leticia Haydeé Ramírez Silva*, por la donación de reactivos como resinas para purificar proteína, antibióticos, entre otros. Por sus comentarios y dudas resultas durante los seminarios, y sus clases (y también afuera de clases). Y por su participación como sinodal de la tesis donde sus correcciones fueron de gran ayuda para la versión final de esta.

Se Agradece a *Gumersindo G. V.*, por el apoyo económico otorgado durante la realización de esta tesis y los estudios de licenciatura, sin el cual la conclusión de estos se hubiera logrado en términos muy diferentes. Además del apoyo brindado durante la pandemia, el cual permitió continuar con algunos de los experimentos que se mencionan en la sección de perspectivas, pero que ya no se incluyen como resultados de esta tesis.

Se Agradece a *Héctor Adán Martínez Torres* y a la *Mtra. Raquel Ortega*, por el apoyo con los medios de cultivo, amortiguadores, soluciones, etc. Además de por todo el apoyo que no necesariamente tuvo que ver con el trabajo académico.

Se Agradece a los *Miembros de seminario de la Dra. M. Tuena*, por los comentarios y sugerencias durante las presentaciones del seminario.

Se Agradece a los *Miembros del comité tutorial (Dr. José de Jesús García Trejo, Dr. Alfredo Torres Larios (QDEP), y al Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos)*, por su guía en la realización de este proyecto, por sus útiles comentarios y enseñanzas.

Se Agradece a los *Miembros organizadores del XXII Congreso de Bioenergética y Biomembranas*, por la beca otorgada para asistir a dicho congreso.

Se Agradece al *Programa de apoyo a estudiantes de posgrado (PAEP)*, por su apoyo para asistir al XXI congreso de Bioenergética y Biomembranas.

Se Agradece a *Rachel*, por todos los acentos y otras correcciones de estilo, en mis presentaciones de clase y partes de esta tesis. Y por *todo* lo demás.

Se Agradece a los *Sinodales de esta tesis (Dra. Marina Gavilanes-Ruiz Ruíz, Dra. Leticia Haydeé Ramírez Silva, Dra. María Soledad Funes Argüello, Dra. Lilian González Segura, y al Dr. Salvador Uribe Carbajal)*, por sus correcciones y comentarios para lograr hacer de esta la mejor versión de la presente tesis.

Por último, se agradece a la *UNAM*, por todo el innumerable apoyo y por acogerme como mi casa de estudios desde la Escuela Nacional Preparatoria hasta el posgrado.

Se agradece también a los desarrolladores de los programas gratuitos (o su versión gratuita) empleados en esta tesis, tales como Biorender, ChimeraX, Getcontacts, JSmarvin, PLIP, y Sci-Hub (incluyendo además de a Alexandra Elbakyan, a Aaron Swartz por su idea precursora para el acceso libre a la ciencia).

# Índice

<b>Dedicatoria.....</b>	<b>2</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>3</b>
<b>Índice .....</b>	<b>6</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>9</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>12</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>13</b>
ATP sintasas.....	13
Función .....	13
Estructura de la ATP sintasa .....	17
Regulación de la ATP sintasa .....	34
I.    Regulación por producto/sustrato .....	34
II.   Regulación por una proteína inhibidora .....	36
a)    Subunidad IF <sub>1</sub> .....	36
b)    Subunidad ε .....	38
c)    Subunidad ζ .....	41
III.  Otros mecanismos de regulación .....	43
<i>P. denitrificans</i> y su ATP sintasa como modelos de estudio .....	45
<b>Antecedentes directos y planteamiento del problema .....</b>	<b>48</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>51</b>
Objetivo General .....	51
Objetivos particulares .....	51
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>52</b>
Extracción de ADN plasmídico .....	52
Diseño de desoxioligonucleótidos para la amplificación del gen de la subunidad ζ mutante.....	52

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	54
Transformación por choque térmico .....	54
Clonación de las subunidades $\zeta$ mutantes de <i>P. denitrificans</i> .....	55
Pruebas de inducción con IPTG.....	56
Cuantificación de proteína por el método de Lowry-TCA.....	56
Cuantificación de proteína con ácido bicinónico .....	57
Purificación de la subunidad $\zeta$ silvestre (recombinante) de <i>P. denitrificans</i> .....	58
Purificación de la subunidad $\zeta$ T2_D5del (-4aa) de <i>P. denitrificans</i> .....	59
Purificación de la subunidad $\zeta$ T2_R9del (-8aa) de <i>P. denitrificans</i> .....	60
Electroforesis en geles de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	61
Inmunorréplica tipo Western blot .....	62
Obtención de partículas sub-bacterianas (PSBs) .....	63
Actividad de hidrólisis de ATP en medio regenerante .....	64
<b>Resultados .....</b>	<b>66</b>
La mutagénesis de la subunidad $\zeta$ se consiguió mediante PCR.....	66
Clonación a pJET1.2/Blunt (plásmido de mantenimiento) y pT7-7 (plásmido de sobre expresión) .....	67
La presencia de las mutaciones deseadas se confirmó por secuenciación .....	70
Purificación de la subunidad $\zeta$ silvestre y mutantes .....	72
Subunidad $\zeta$ silvestre de <i>P. denitrificans</i> .....	72
Purificación de la subunidad $\zeta$ T2_D5del (-4aa).....	73
Purificación de la subunidad $\zeta$ T2_R9del (-8aa) .....	75
Las partículas sub-bacterianas (PSBs) obtenidas presentan una actividad de $0.53\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ .....	77
La presencia o ausencia de la subunidad $\zeta$ en PSBs silvestres y PSBs $\Delta\zeta$ se confirma mediante ensayos de inmunorréplica tipo Western blot.....	77

Las deleciones de los aminoácidos 2-5 y 2-9 en la subunidad $\zeta$ generan una pérdida de la función inhibitoria de dicha subunidad.....	80
<b>Discusión.....</b>	<b>83</b>
Efectos de las mutaciones en la actividad de ATPasa .....	87
Implicaciones sobre el mecanismo de inhibición de la subunidad $\zeta$ .....	93
<b>Conclusiones .....</b>	<b>100</b>
<b>Perspectivas .....</b>	<b>101</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>103</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>119</b>

# Abreviaturas

- aa: aminoácido.
- ADP: siglas del inglés Adenosine Diphosphate, en español: adenosín difosfato.
- AMP: siglas del inglés Adenosine Monophosphate, en español: adenosín monofosfato.
- ATP: siglas del inglés Adenosine Triphosphate, en español: adenosín trifosfato
- CAM: Cloranfenicol.
- dATP: Siglas del inglés Deoxyadenosine Diphosphate, en español: desoxiadenosina trifosfato.
- DEAE: Siglas de Dietilaminoetil.
- DELSEED: región específica de la subunidad  $\beta$  descrita en la sección de estructura de la ATP sintasa.
- DNA: Siglas del inglés Deyoxyribonucleic acid en español: ácido desoxiribonucleico
- DO: Densidad óptica.
- EDTA: Siglas del inglés Ethylenediaminetetraacetic acid en español: ácido etilendiaminotetraacético.
- F<sub>0</sub>: Fracción F cero o F “o”.
- F<sub>1</sub>: Fracción F 1.
- FAD: Siglas del inglés flavin adenine dinucleotide en español: flavín adenín dinucleótido.
- Fig: Figura.
- FRET: Siglas del inglés Förster Resonance Energy Transfer en español: Transferencia de energía de resonancia de Förster.
- G y C: Guaninas y Citocinas.
- IPTG: Siglas del inglés Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside en español: isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
- KAN: Kanamicina
- LB: Siglas Luria Broth, tipo de medio de cultivo

- $Mg^{2+}ADP$ : compuesto de coordinación entre el ADP y el catión Magnesio
- $NAD^+$ : Siglas del inglés Nicotinamide Adenine Dinucleotide en español: dinucleótido de nicotinamida y adenina (en este caso en forma de catión u oxidada)
- $NADH$ : Siglas del inglés Nicotinamide Adenine Dinucleotide en español: dinucleótido de nicotinamida y adenina (en este caso en su forma reducida)
- PCR: Siglas del inglés Polymerase Chain Reaction, en español: reacción en cadena de la polimerasa
- $Pd\Delta\zeta$ : cepa de *P. denitrificans* carente del gen de la subunidad  $\zeta$  de la ATPasa
- $P_i$ : fosfato inorganico,  $PO_4^{3-}$
- PMSF: Siglas del inglés Phenylmethylsulfonyl Fluoride, en español: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- PSBs: Partículas Sub Bacterianas
- RNA: Siglas del inglés RiboNucleic Acid, en español: ácido ribonucleico
- RNAasa: Enzima que degrada el RNA
- rpm: Revoluciones por minuto
- SDS: Siglas del inglés Sodium dodecyl sulfate, en español: dodecilsulfato sódico
- SDS-PAGE: Siglas del inglés Sodium dodecyl sulfate - PolyAcrylamide Gel Electroforesis, en español: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida - dodecilsulfato sódico
- TCA: Siglas del inglés Trichloroacetic Acid, en español: ácido tricloroacético
- $T_m$ : temperatura de fusión (referente al alineamiento de desoxioligonucleótidos en una PCR)
- tRNA: RNA de transferencia
- UV: ultravioleta
- Vis: visible
- $\beta_{DP}$ : Conformación de la subunidad  $\beta$  (ver sección estructura de la ATP sintasa)
- $\beta_E$ : Conformación de la subunidad  $\beta$  (ver sección estructura de la ATP sintasa)
- $\beta_{TP}$ : Conformación de la subunidad  $\beta$  (ver sección estructura de la ATP sintasa)

- $\Delta G$ : Energía libre de Gibbs
- $\Delta G^\circ$ : Energía libre de Gibbs estándar
- $\Delta G^{\circ\prime}$ : Energía libre de Gibbs estándar en condiciones fisiológicas
- $\zeta T2\_D5del$ : Mutante de la subunidad  $\zeta$  con una deleción de los aminoácidos (aa) 2-4
- $\zeta T2\_R9del$ : Mutante de la subunidad  $\zeta$  con una deleción de los aa 2-8.

Los nombres de los aminoácidos se abreviaron de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC. Su abreviatura en 3 letras y 1 letra se puede consultar en el anexo I.

# Resumen

La ATP sintasa es una enzima ubicua que provee de ATP a las células de los tres dominios de la vida. Esta enzima funciona como un nanomotor, empleando la energía acumulada en los gradientes electroquímicos de diversas membranas para catalizar la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi. Bajo ciertas condiciones, esta enzima puede catalizar la reacción en la dirección contraria, es decir llevar a cabo la hidrólisis de ATP. Esta actividad hidrolítica debe ser estrictamente regulada para evitar depletar las reservas de ATP, por lo que a lo largo de la evolución han surgido diversos mecanismos con este fin. En *Paracoccus denitrificans*, la regulación de la enzima recae sobre una subunidad particular: la subunidad  $\zeta$ . Esta subunidad funciona como un inhibidor unidireccional de la rotación de la ATP sintasa, con una región inhibitoria comprendida en los primeros 14 aminoácidos de la subunidad  $\zeta$ , sin embargo, se desconocía la región mínima inhibitoria en la secuencia de la subunidad  $\zeta$ .

Se obtuvieron dos mutantes de la subunidad  $\zeta$ , las cuales consisten en dos deleciones secuenciales (removiendo 4 y 8 aminoácidos en el extremo amino respectivamente) y se evaluó su capacidad inhibitoria. En ambas mutaciones se observó pérdida de actividad, lo que coloca a la región mínima inhibitoria de la subunidad  $\zeta$  dentro de los primeros cuatro aminoácidos únicamente. A su vez estos resultados permitieron ahondar en el mecanismo por el cual la subunidad  $\zeta$  inhibe la actividad hidrolítica de la ATP sintasa de *P. denitrificans*.

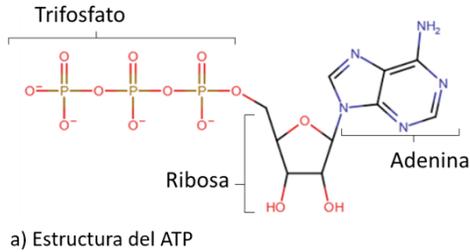
# Introducción

## ATP sintasas

### Función

La ATP sintasa es una enzima que cataliza la condensación de ADP y Pi para formar ATP, liberando una molécula de agua en el proceso. Esta enzima ha recibido diferentes nombres que enfatizan su función en diferentes contextos, además de ATP sintasa también se le conoce como: ATPasa (ya que la enzima también cataliza la reacción de hidrólisis de ATP), complejo V (en el contexto de la cadena de fosforilación oxidativa), y F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP sintasa o F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPasa (en donde F<sub>1</sub> y F<sub>0</sub> se refieren a las dos porciones que componen a la enzima). La ATP sintasa es una enzima ubicua, presente prácticamente en todos los organismos vivos, en los tres dominios de la vida (Archaea, Bacteria y Eukarya), siendo las únicas excepciones a esto algunos pocos organismos parásitos como el caso de *Giardia sp.* (Benchimol & de Souza, 2022) entre otros.

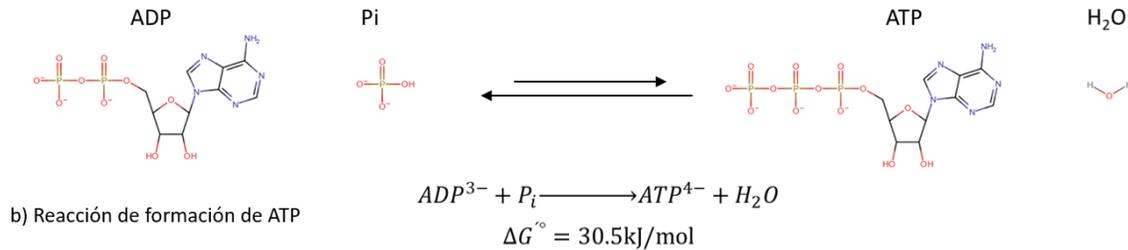
El producto de la reacción catalizada por la ATP sintasa, es decir el ATP, es una de las moléculas más importantes para la vida, ya que la célula emplea esta molécula como un donador de energía para acoplar la mayoría de las reacciones endergónicas que se llevan a cabo en los procesos celulares cotidianos. Por este motivo, el ATP se considera coloquialmente como la “fuente de energía de la célula”. Esta molécula está compuesta por una ribosa (azúcar de cinco carbonos) unida por el carbono uno a una adenina (base nitrogenada) y por el carbono cinco a un grupo trifosfato (Figura 1).



**Fig. 1** ATP y reacción de formación de ATP

a) Estructura de la molécula de ATP, se indica la posición de la adenina, la ribosa y el grupo trifosfato.

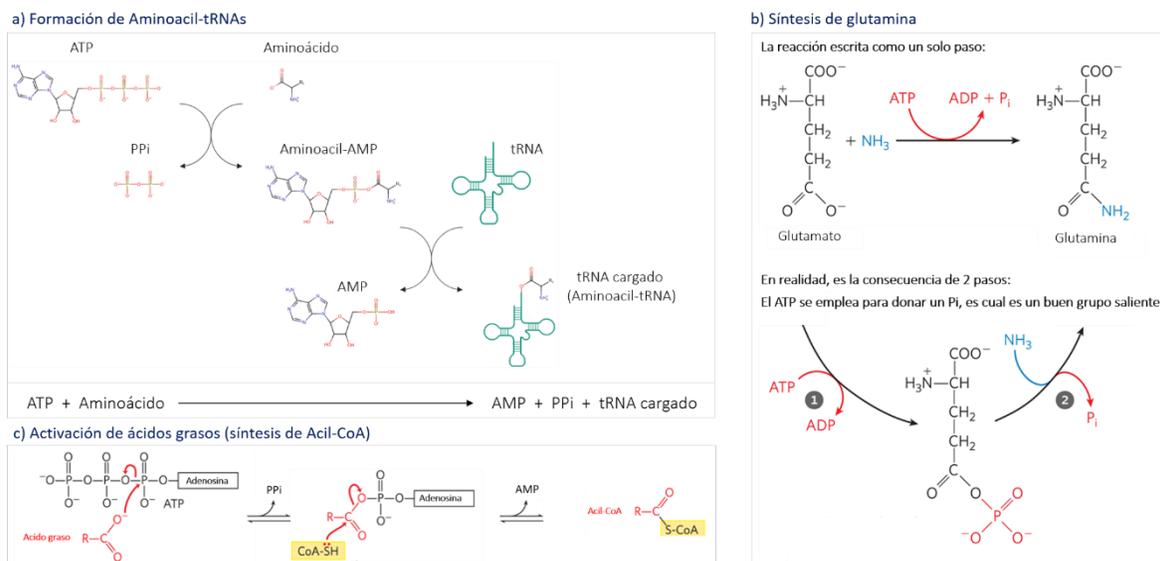
b) Esquema de la reacción de condensación entre un ADP y un Pi, para formar un ATP. Se indica la



El grupo trifosfato en el ATP posee dos enlaces fosfoanhídrido (Oxígeno-Fósforo-Oxígeno), los cuales al reaccionar con un nucleófilo liberan una gran cantidad de energía. Por esta razón a este tipo de enlaces se les conoce como enlaces de alta energía y su hidrólisis es una reacción exergónica, con un  $\Delta G^\circ$  negativo; por lo tanto, la hidrólisis de ATP es un proceso termodinámicamente favorable. El  $\Delta G^\circ$  negativo de la reacción se puede explicar tomando en cuenta varios factores entre los que se encuentran: una menor repulsión electrostática entre los grupos fosfato de los productos (ADP y Pi), en comparación de los reactivos (ATP), una mejor solvatación de los productos que de los reactivos, y una mejor deslocalización electrónica en los productos que en los reactivos (Bruice, 2013). En condiciones fisiológicas se suma otro factor de suma importancia para incrementar la diferencia de energía libre estándar de la hidrólisis de ATP: en las células se procura mantener a la reacción fuera del equilibrio, manteniendo concentraciones de ATP y ADP relativamente constantes y con una proporción  $[ATP]/[ADP]$  relativamente grande (alrededor de  $1 \times 10^3$  dependiendo del tipo celular) (Nicholls & Ferguson, Tabla 3.1, 2013). Esto disminuye el valor de  $[ADP][Pi]/[ATP]$ , a su vez haciendo más negativo el valor real de la energía libre de Gibbs en condiciones celulares, a comparación del valor estándar.

$$\left( \Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[ADP][Pi]}{[ATP]} \right) \quad \Delta G_{En \text{ la célula}} < \Delta G^\circ$$

La célula aprovecha el valor del  $\Delta G$  en la reacción de la hidrólisis de ATP para emplear a esta molécula como una forma de transferir y almacenar temporalmente la energía química que se obtuvo durante el catabolismo. La simple unión e hidrólisis de un ATP puede impulsar varios procesos celulares como lo son el movimiento de las fibras de actina/miosina, el bombeo de  $H^+$  por ATPasas, o el cambio conformacional de proteínas G. Sin embargo, en la mayoría de los casos el ATP se utiliza para acoplar reacciones endergónicas a la reacción de hidrólisis de ATP y así obtener una reacción global espontánea. Como ejemplos de lo anterior se puede tomar el caso del proceso de unión de un aminoácido a su tRNA correspondiente, para lo cual se emplea un ATP para adenilar el aminoácido, activándolo, y posteriormente unirlo covalentemente al tRNA (Figura 2, se muestran además otros dos ejemplos de reacciones donde se emplea la hidrólisis de ATP para acoplarla una reacción endergónica). En estos casos el ATP actúa como una molécula capaz de transferir grupos  $P_i$ ,  $PP_i$ , o adenilato, los cuales son buenos grupos salientes y activan químicamente el compuesto, permitiendo que la reacción posterior avance con un  $\Delta G$  negativo.



**Fig. 2 Ejemplos de reacciones que involucran ATP**

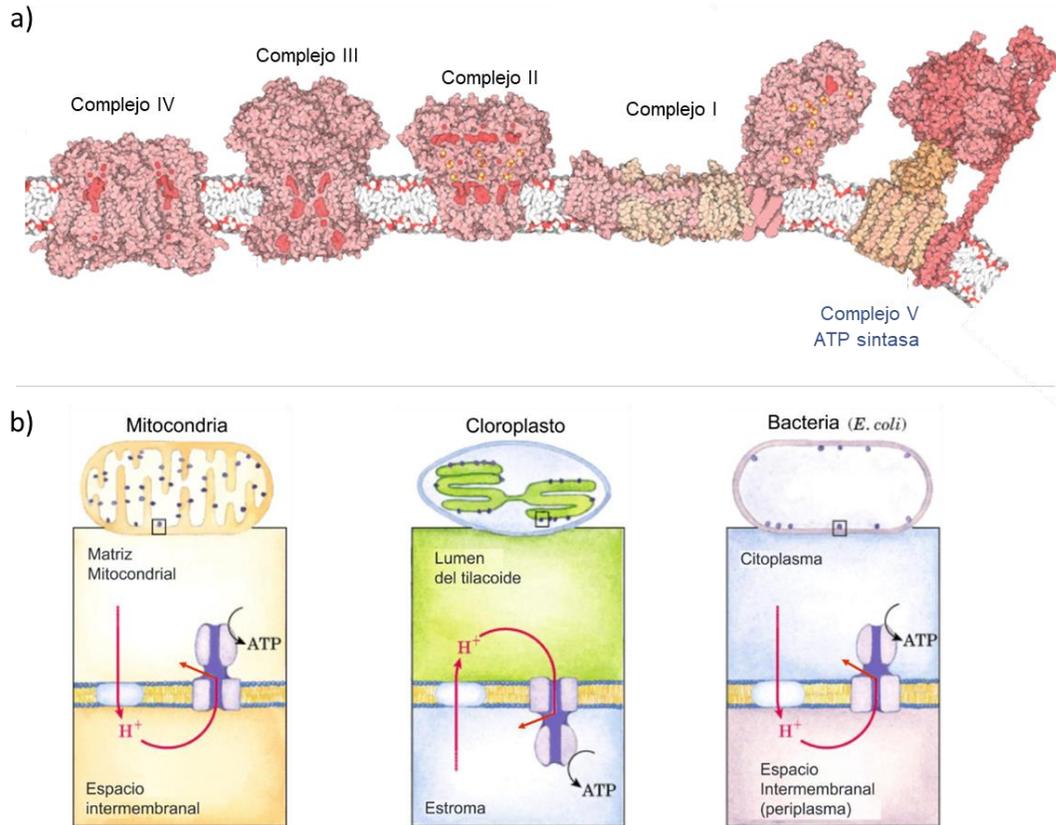
Algunos ejemplos donde el ATP se emplea como donador de grupos salientes ya sea  $AMP$ , o  $P_i$  en estos casos. ( b ) y c ) modificados de: Nelson & Cox, 2021).

Además de su papel en la bioenergética celular, la molécula de ATP se emplea para formar parte de la estructura del RNA, ADN (previa conversión a dATP), y al de algunos cofactores como el NAD<sup>+</sup>, FAD, y la coenzima A. Otros fines de la molécula consisten en fosforilar diferentes compuestos ya sea como parte de una ruta metabólica o fosforilar proteínas para su regulación enzimática, e incluso la producción de luz por el sistema luciferina-luciferasa en el caso de los organismos quimioluminiscientes.

El uso de ATP como fuente de energía química es una característica conservada en todos los organismos vivos que se conocen hasta la fecha. La mayor parte de este ATP que es producido por las células se forma gracias a la ATP sintasa. En condiciones aerobias se estima que puede llegar a ser hasta el 90% (Domínguez-Ramírez & Tuena de Gómez-Puyou, 2005; Tuena de Gómez-Puyou & García-Trejo, 2015), siendo menos el ATP formado por fosforilación a nivel de sustrato. Por lo tanto, la ATP sintasa es una enzima fundamental para la vida y su ubicuidad en los tres dominios de la vida es un reflejo de esto (Figura 3).

La ATP sintasa es una proteína transmembranal que se encuentra ubicada en la membrana plasmática de arqueas y bacterias Gram positivas, en el caso de bacterias Gram negativas en la membrana interna y en el caso de células eucariontes se puede encontrar tanto en mitocondrias (membrana interna) como en cloroplastos (membrana tilacoidal). Para catalizar la formación de ATP a partir de ADP y Pi, la enzima emplea la energía almacenada en el gradiente de protones formado por la cadena de transporte de electrones ubicada en la misma membrana. Sin embargo, esta enzima es capaz de catalizar la reacción en ambos sentidos, (síntesis o hidrólisis de ATP) dependiendo de las condiciones específicas de ese momento. Bajo condiciones fisiológicas como la ausencia de nutrientes o de moléculas aceptoras de electrones (como el O<sub>2</sub> en mitocondrias) la ATP sintasa cataliza la reacción en la dirección de hidrólisis, es decir actúa como una ATPasa, hidrolizando al ATP para formar ADP y Pi, mientras bombea H<sup>+</sup> del interior al exterior de la membrana. En algunos microorganismos, como *Streptococcus sp.* o *Escherichia coli*, la actividad de ATPasa es una actividad fisiológica de la enzima,

ya que provee una forma de mantener el potencial de membrana a expensas de la hidrólisis de ATP en condiciones donde la cadena de transporte de electrones no puede hacerlo (Ferrándiz & De La Campa, 2002; Ugurbil et al., 1978).



**Fig. 3 Ubicación de la ATP sintasa**

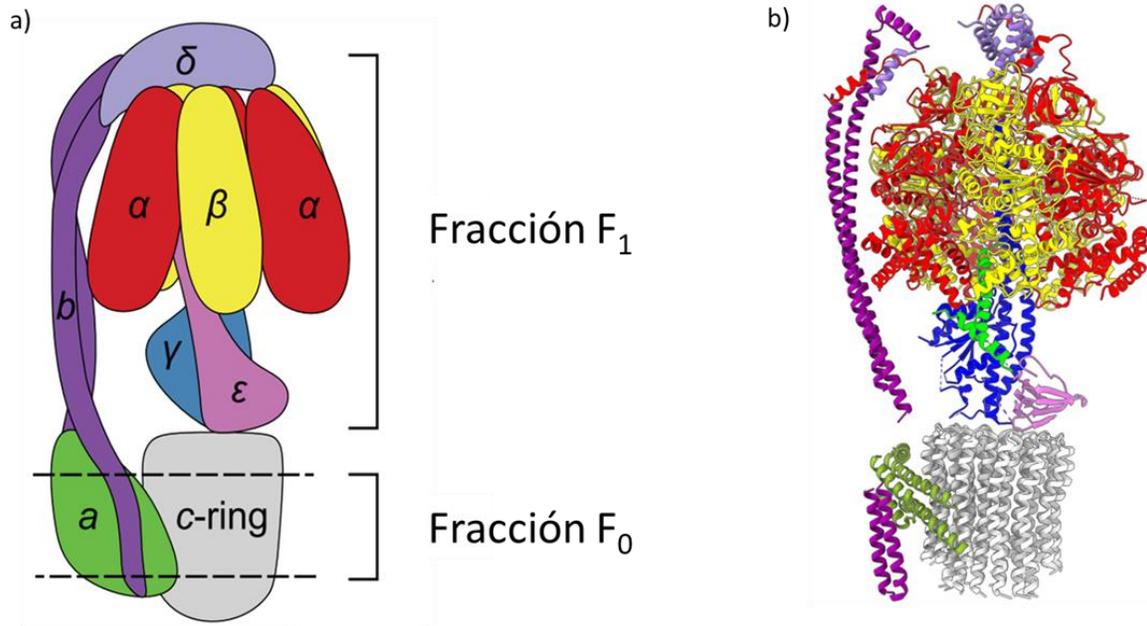
a) cadena de transporte de electrones/ fosforilación oxidativa. Se muestran los 5 complejos de la respiración embebidos en una membrana lipídica. Modificada del Protein Data Bank (Goodsell, et al., 2014).

b) Localización de la ATP sintasa en diferentes organismos y membranas. Modificada de (García-Trejo, et al., 2012; Nelson & Cox, 2008)

## Estructura de la ATP sintasa

La ATP sintasa es un complejo multiproteico que se compone de dos fracciones conocidas como  $F_0$  y  $F_1$ , (Figura 4). La fracción  $F_0$  corresponde a la porción intermembranal de la enzima y la fracción  $F_1$  a la parte hidrosoluble de la enzima

que en el caso de las mitocondrias está ubicada hacia la matriz mitocondrial, en cloroplastos hacia el estroma y en bacterias hacia el citosol. Cada fracción a su vez está compuesta de varias subunidades que se detallan más adelante.



**Fig. 4 Estructura de una ATP sintasa bacteriana**

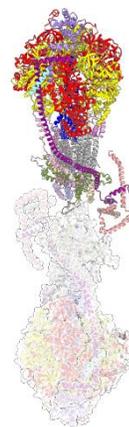
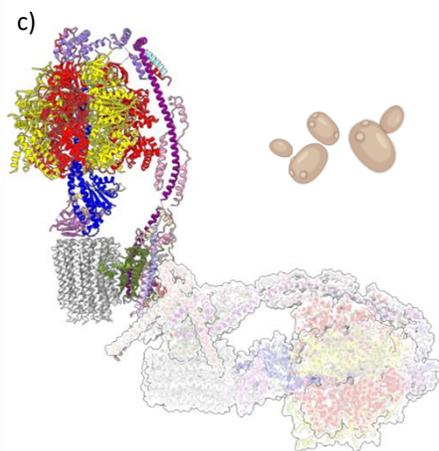
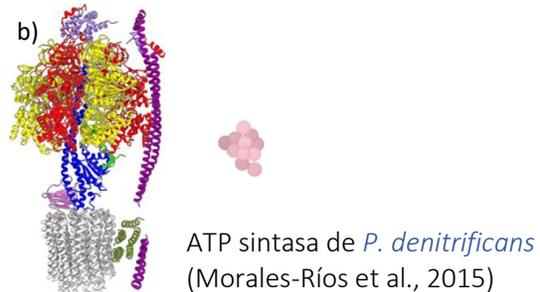
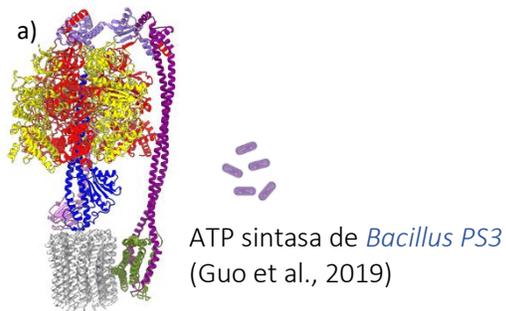
a) Se muestra una representación en caricatura de la estructura de la enzima de *Bacillus PS3* (modificado de Guo Et al., 2019). b) Se muestra una representación en hilos y listones de la ATP sintasa de *P. denitrificans* (PDB 5DN6, Morales-Ríos et al., 2015). El color de las subunidades se indica a continuación:  $\alpha$  color rojo,  $\beta$  color amarillo,  $\gamma$  color azul,  $\delta$  color morado claro,  $\epsilon$  color rosa,  $\zeta$  color verde,  $b$  color morado,  $a$  color verde oscuro,  $c$  color gris.

Cabe recalcar que existen diferencias importantes entre las estructuras de las ATP sintasas de diferentes organismos, las enzimas más simples son las pertenecientes a bacterias. En organismos más complejos, la enzima presenta varias subunidades extra, además de que la estructura de las mismas subunidades puede ser más compleja. En general, se considera que las subunidades canónicas de la enzima, es decir las que componen a la enzima más simple y que están presentes en la mayoría de los organismos son, en la fracción  $F_0$ , las subunidades:  $a$  y  $c$ , con 8-17 monómeros dependiendo de la especie (Kühlbrandt, 2019; Nesci et al., 2016), y en la fracción  $F_1$  las subunidades:  $\alpha$  (tres subunidades),  $\beta$  (tres subunidades),  $\gamma$ ,  $\delta$ , y  $\epsilon$ . Además, conectando a las fracciones  $F_1$  y  $F_0$ , en el brazo periférico, las subunidades  $b$  (dos subunidades). En el caso de

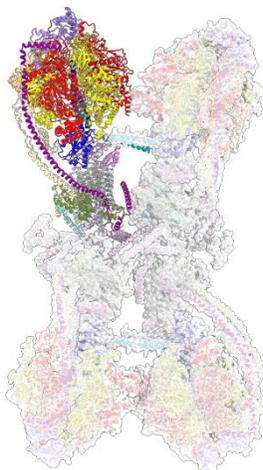
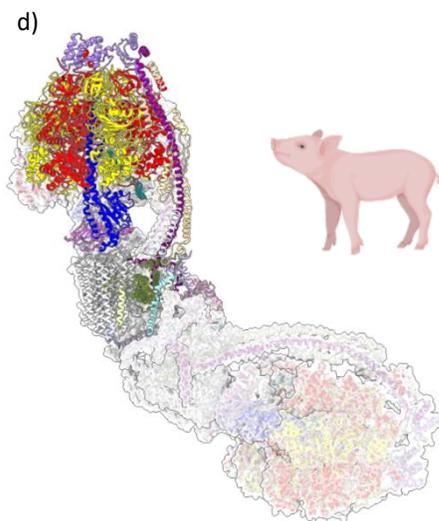
las ATP sintasas de mitocondrias se ha observado que las subunidades extra numerarias permiten que la enzima se asocie formando dímeros y tetrámeros (Flygaard et al., 2020; Gu et al., 2019; Guo et al., 2020; Minauro-Sanmiguel et al., 2005; Pinke et al., 2020), recientemente se han observado incluso hexámeros de la ATP sintasa en mitocondrias de *Toxoplasma sp* (Mühleip et al., 2021). Se ha planteado que estas asociaciones de la enzima ayudan a crear y estabilizar la curvatura de las crestas mitocondriales (Blum et al., 2019; Davies et al., 2011). Ya que las diferencias entre las enzimas de diferentes especies son considerables y el tipo de asociación entre las enzimas también lo es, existe una amplia diversidad estructural de las ATP sintasas tal como se ejemplifica en la figura 5, en dicha figura en los incisos c) y d) se observan los dímeros y tetrámeros de la ATP sintasa que se forman en las mitocondrias de levadura y mamífero, respectivamente. A continuación, se describen más detalladamente las fracciones y subunidades de la enzima canónica bacteriana.

#### Fracción $F_0$

A esta fracción se le otorgó el nombre de  $F_0$  (subíndice 0, no cero) ya que se descubrió que este era el sitio en donde actuaba el antibiótico oligomicina, de ahí que se abrevió  $F_0$  y con el tiempo paso a ser escrita también como  $F_0$  (F subíndice cero). Como se mencionó anteriormente, esta parte de la enzima se encuentra embebida en la membrana y por lo tanto las subunidades que la componen tienen una gran cantidad de residuos hidrofóbicos que pueden interactuar con el carácter no polar de los lípidos membranales. La fracción  $F_0$  está formada por un número variable de subunidades  $c$  y una sola subunidad  $a$ . La subunidad  $c$  tiene un peso de 7.6 kDa (en *P. denitrificans*) y está formada por dos alfa hélices perpendiculares al plano de la membrana, que interactúan entre sí para formar una estructura circular similar a un anillo. El número de subunidades  $c$  formando el anillo es específico de cada organismo, con anillos formados con 8 hasta 17 subunidades. Esto tiene implicaciones importantes en la estequiometría de la reacción de síntesis de ATP, ya que entre más grande es el número de subunidades  $c$  por anillo se necesita un mayor flujo de protones para impulsar la



ATP sintasa de levadura  
*S. cerevisiae* (Guo et al.,  
2017)  
(Dímeros)



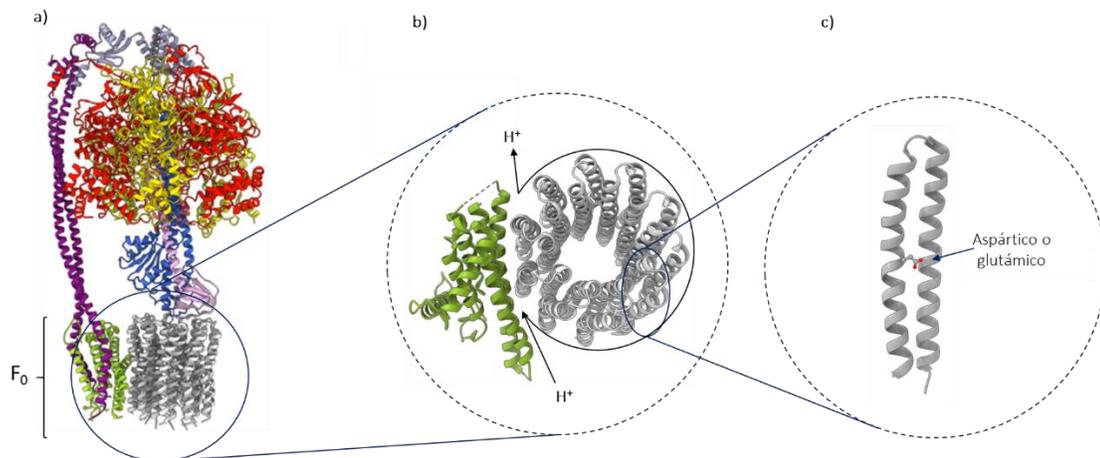
ATP sintasa de mamífero  
*S. scrofa* (Gu et al., 2019)  
(Tetrámeros (dímeros de  
dímeros))

**Fig. 5 ATP sintasas de diferentes especies.**

a) *Bacillus PS3* (PDB 6n2y), b) *P. denitrificans* (PDB 5dn6), c) *Saccharomyces cerevisiae* (PDB 6b8h), d) *Sus scrofa* (PDB 6j5k).

En levadura y mamíferos la ATPsintasa se organiza como dímeros y tetrámeros respectivamente, las transparencias en los incisos c) y d) muestran las enzimas adicionales presentes para formar dichos dímeros y tetrámeros. En los incisos c) y d) en la parte derecha se muestra una vista superior. Subunidades  $\alpha$  en rojo,  $\beta$  amarillo,  $\gamma$  azul,  $\delta$  morado claro,  $\epsilon$  rosa,  $\zeta$  verde,  $b$  morado,  $a$  verde oscuro,  $c$  gris.

rotación de éste y por lo tanto se emplean más  $H^+$  para que el rotor complete un giro de  $360^\circ$ , sintetizando 3 ATPs. Posiblemente el tamaño del anillo de subunidades  $c$  sea un reflejo de las adaptaciones evolutivas de la enzima a diferentes condiciones fisiológicas, ya que un anillo más grande implica una mayor eficiencia como bomba de protones (actividad de ATPasa) y un anillo más pequeño como el de las mitocondrias una eficiencia mayor para la síntesis de ATP (Kühlbrandt, 2019). Como ejemplos tenemos el caso de *Bacillus pseudofirmus* con 13 subunidades  $c$  formando el anillo (Preiss et al., 2014), mientras que en *E. coli*, una de las bacterias más estudiadas hasta la fecha, el anillo se forma por diez subunidades  $c$  (Sobti et al., 2020), y en mitocondrias de mamífero (*S. scrofa*) por ocho subunidades  $c$  (Gu et al., 2019). En *P. denitrificans*, la bacteria pertinente a este proyecto, el anillo se forma por 12 subunidades  $c$ . La figura 6 detalla la estructura de esta región.

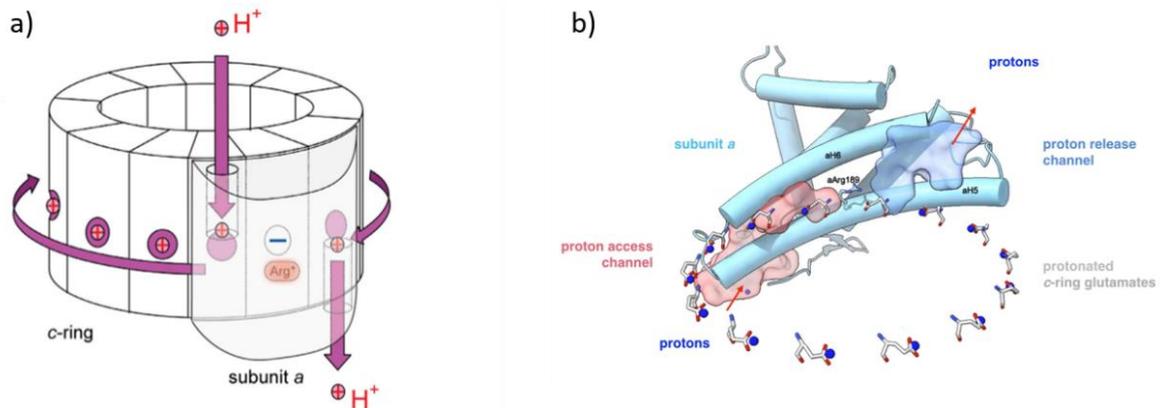


**Fig. 6 Estructura de la fracción  $F_0$**

a) Estructura de la ATP sintasa de *Bacillus PS3* la zona dentro del círculo azul se magnifica en el inciso b). b) Estructura del anillo de subunidades  $c$  y la subunidad  $a$ , la zona dentro del círculo azul se magnifica en el inciso c). c) Subunidad  $c$  en la cual se indica el residuo protonable ya sea glutámico (en este caso) o aspártico (en otras especies). (PDB 6N2Y).

La otra subunidad de la fracción  $F_0$  es la subunidad  $a$ , la cual es una proteína de 27.6 kDa (en *P. denitrificans*) que está formada principalmente por hélices alfa intramembranales. Entre la intercara de las subunidades  $a$  y  $c$  se forman dos

hemicanales que le permiten a la ATP sintasa translocar protones de un lado a otro de la membrana. Un hemicanal forma un conducto desde la parte externa hasta el centro del anillo de subunidades *c* y el otro hemicanal desde la parte interna hasta otra región localizada a la altura del centro de la bicapa lipídica en el anillo de subunidades *c*, tal como se puede ver en la figura 7 (Kühlbrandt, 2019; Zubareva et al., 2020).



**Fig. 7** Estructura de los hemicanales en  $F_0$ .

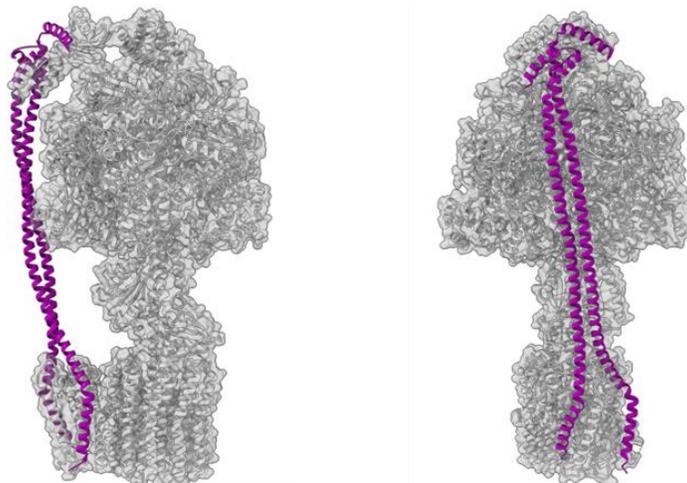
a) Diagrama de la estructura de los hemicanales, en purpura se ilustra el camino que siguen los protones para translocarse al otro lado de la membrana. b) Hemicanales de la ATP sintasa de *Spinacia oleracea* el hemicanal de entrada y de salida se ejemplifican con colores azul y rojo. (Kühlbrandt, 2019; Zubareva et al., 2020). Una vista detallada de los hemicanales se muestra en el anexo II. Para apreciar una animación del movimiento de los protones a través de los hemicanales se recomienda revisar el video suplementario 5, en (Kühlbrandt, 2019): <https://www.annualreviews.org/doi/suppl/10.1146/annurev-biochem-013118-110903>

Aproximadamente en el centro de cada subunidad *c*, en la región que está a la altura de la parte más profunda de los hemicanales, existe un residuo de aminoácido con características ácidas (ácido aspártico o ácido glutámico según la especie), ver figuras 6 y 7, el cual es capaz de protonarse o desprotonarse según sea el caso. Para que se transloque un protón al otro lado de la membrana, ocurren los siguientes pasos de forma secuencial: primero la subunidad *c* debe de protonarse, posteriormente la subunidad *c* protonada debe girar en forma paralela a la membrana hasta llegar al otro hemicanal, realizando un giro prácticamente de 360°, y por último el residuo ácido de la subunidad *c* se desprotona y el protón resultante se libera al otro lado de la membrana por medio del hemicanal (Figura

7). Para que este proceso pueda llevarse a cabo es indispensable que los dos hemicanales no estén conectados directamente, ya que entonces los protones fluirían sin impulsar el giro de la enzima, por esto existe un residuo de arginina muy conservado que se encuentra dividiendo ambos hemicanales.

### Brazo periférico

Las fracciones  $F_0$  y  $F_1$  se conectan por un brazo periférico que además de mantener unidas a las dos fracciones, permite que una parte de la enzima se mantenga inmóvil (subunidad  $a$ , la fracción  $F_1$  y el brazo periférico), mientras el anillo de subunidades  $c$  y el centro de la enzima rotan sobre sí mismas. Las subunidades  $b$  se ilustran en color morado en la figura 8. En las ATP sintasas más simples el brazo periférico está compuesto por un dímero de subunidades  $b$ , las cuales son proteínas de 20.1 kDa (en *P. denitrificans*), con una estructura secundaria de alfa hélice. En ATP sintasas más complejas el brazo periférico tiene subunidades extra y una estructura mucho más compleja tal como ocurre en *Polytomella sp.* (Murphy et al., 2019).



**Fig. 8** Estructura del brazo periférico de la ATP sintasa de *Bacillus PS3*

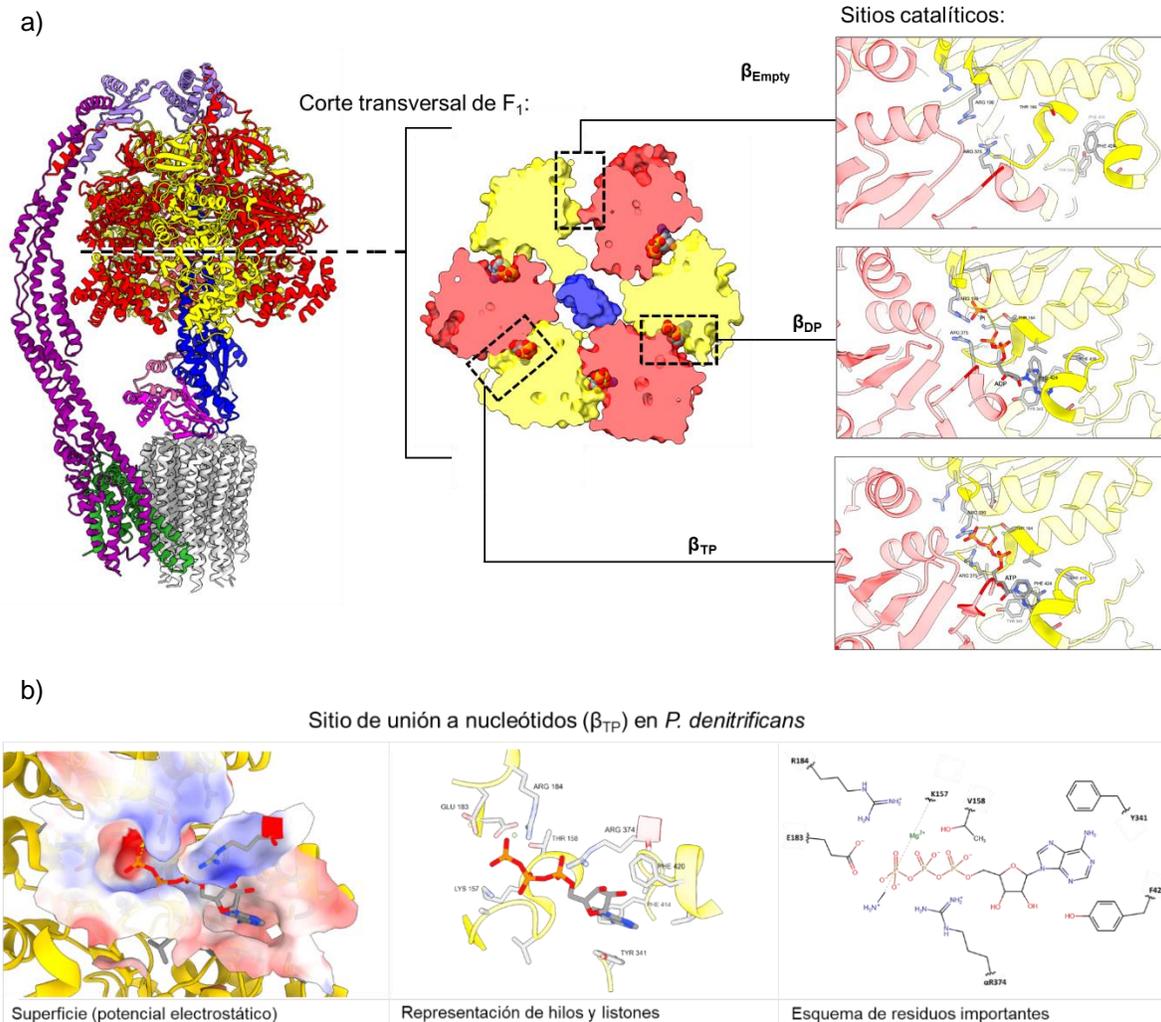
Se observan las subunidades  $b$ , las cuales forman el brazo periférico en color morado. (PDB 6N2Y)

En algunos otros organismos como las arqueas extremófilas existen dos o incluso tres brazos periféricos para brindar mayor estabilidad a la enzima en condiciones de temperaturas o presiones extremas. Las subunidades  $b$  recorren el largo de

toda la enzima, su extremo amino se ubica en la fracción  $F_0$  interactuando con la subunidad  $a$ , para después a la altura de la fracción  $F_1$  acercarse entre sí para formar una hélice súperenrollada (“coiled coil” en inglés, Revington et al., 2002; Sobti et al., 2016) y finalmente el extremo carboxilo interactúa con diferentes regiones de la subunidad  $\delta$  y en algunos casos con la región de la subunidad  $\alpha$  más próxima.

#### Fracción $F_1$

La fracción  $F_1$  es la parte hidrosoluble de la enzima y está conectada a la fracción  $F_0$  en 2 regiones, la primera es por el brazo periférico donde, como se mencionó previamente, las subunidades  $b$  interactúan con las subunidades  $\delta$  y  $\alpha$ . La otra interacción con  $F_0$  ocurre mediante las subunidades  $\epsilon$  y  $\gamma$ , las cuales están conectadas a  $F_0$  mediante la interacción con el anillo de subunidades  $c$ . La parte más superior de esta fracción es la subunidad  $\delta$  la cual es una proteína de 20 kDa en *P. denitrificans* y confiere estabilidad a la parte inmóvil de la enzima (estator) funcionando como una conexión entre las subunidades  $b$  y el hexámero de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , como se ilustra en el esquema de la figura 4. Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se encuentran justo por debajo de  $\delta$ , y son subunidades con una alta similitud entre sí, pero tienen ciertas diferencias importantes para el mecanismo catalítico. A grandes rasgos, estas subunidades se componen de una porción amino terminal con un motivo de hojas  $\beta$  plegadas formando un barril  $\beta$  en la parte superior de la subunidad, para continuar con un dominio central formado por alfa-hélices y hojas beta plegadas intercaladas, en el cual se encuentra el sitio de unión a nucleótidos y una región carboxilo terminal formado por seis (en el caso de  $\beta$ ) o siete (en el caso de  $\alpha$ ) alfa-hélices (Nicholls & Ferguson, 2013, p. 200). Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  forman un hexámero en donde se intercalan entre sí una subunidad  $\alpha$  con una subunidad  $\beta$  ( $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ ); Coloquialmente, a manera de ejemplificar la organización de estas subunidades se suele aludir a su similitud con los gajos de una naranja (Figura 9).



**Fig. 9** Sitios catalíticos en la ATP sintasa

a) ATPasa de levadura (PDBs 7TJX 7TJW) A la derecha se muestra una figura de la ATPasa seguida de una ilustración en un corte transversal a la altura de los sitios catalíticos, a la izquierda se detalla cada sitio por separado, cada uno en una conformación diferente. Una ampliación de la figura se encuentra en el anexo III.

b) Se muestran 3 representaciones diferentes del sitio catalítico  $\beta_{TP}$  en *P. denitrificans*. Derecha: representación de superficie con tonos azules para potencial electrostático positivo y rojos para negativo. Centro: representación de hilos y listones. Izquierda: esquema de algunos residuos importantes para la catálisis. PDB 5DN6. (Las imágenes de ambos incisos se generaron con ChimeraX)

A la derecha se provee un código QR y un enlace a un video suplementario con los sitios catalíticos en *P. denitrificans*.



[Enlace al video suplementario](#)

En total, la fracción  $F_1$  contiene seis sitios de unión a nucleótidos, los cuales se encuentran en la intercara de la región central de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Casi la totalidad de cada sitio está formado por residuos de una sola subunidad, ya sea  $\alpha$  o  $\beta$ , sin embargo, para la catálisis también participa un residuo de arginina de la subunidad contigua. Solo tres de los seis sitios de unión a nucleótidos son sitios catalíticos; los tres sitios restantes pueden unir nucleótidos, pero estos permanecen sin reaccionar. Los sitios catalíticos corresponden a los formados mayoritariamente por residuos de la subunidad  $\beta$ , con la participación de la arginina de la subunidad  $\alpha$  contigua (R374 en el caso de *P. denitrificans*) en la intercara de las subunidades, como se detalla en la figura 9.

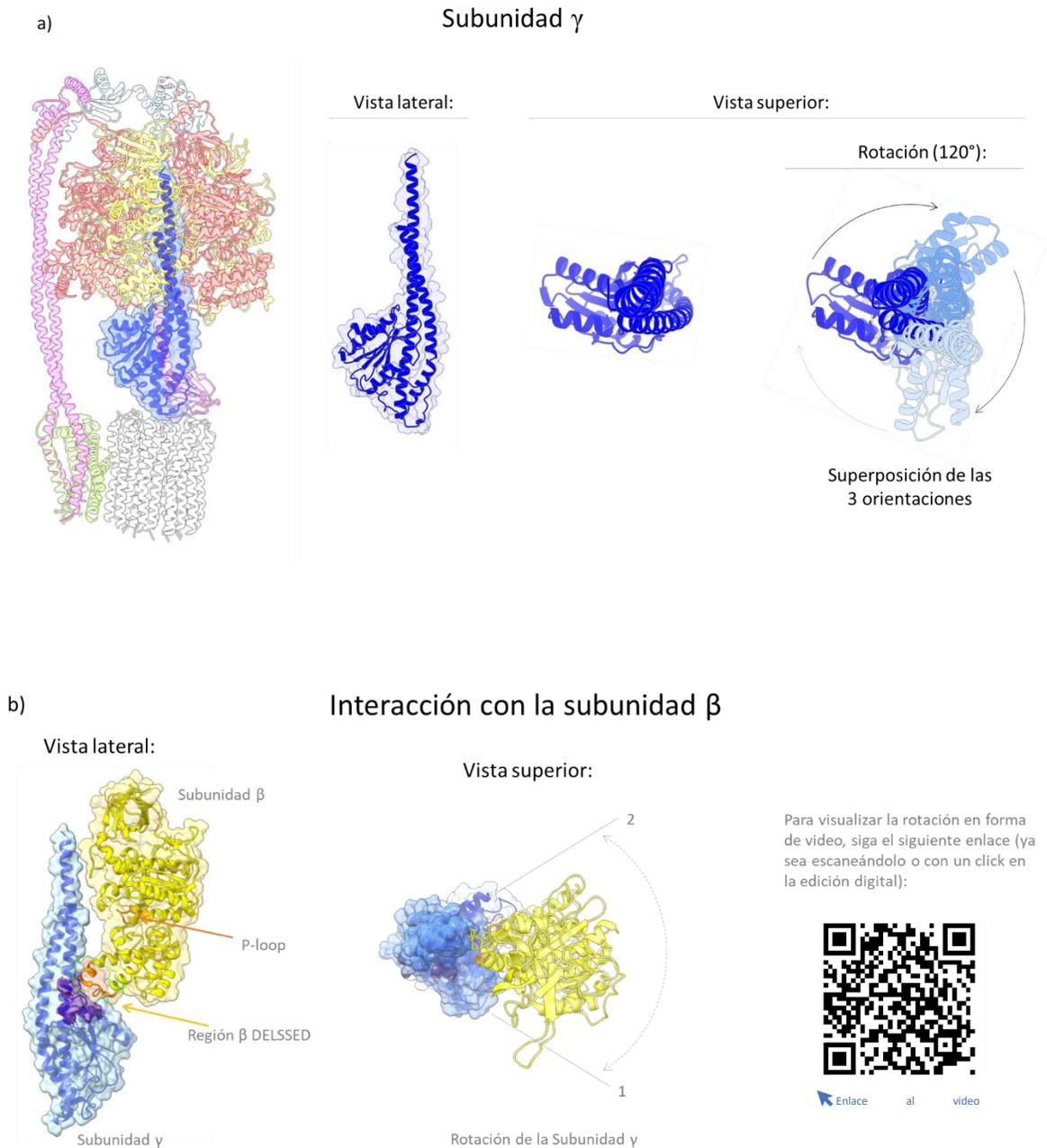
Desde una perspectiva estructural, el sitio catalítico está formado por un motivo Walker A, el cual es una secuencia conservada de los residuos GXXXXGK(T/S) (Nicholls & Ferguson, 2013, p. 202), ubicado en un asa P (“P-loop” o asa de unión a fosfato del inglés: “phosphate binding loop”), que en la ATPasa de *P. denitrificans* comprende los residuos 151 a 158 de la subunidad  $\beta$  (GGAGVGKT). Esta región interactúa con los fosfatos de los nucleótidos. Además de esta región, un residuo de ácido glutámico (E183) y una arginina (R184), también en la subunidad  $\beta$ , interactúan con el fosfato terminal del ATP. La base nitrogenada de los nucleótidos ocupa un sitio relativamente hidrofóbico formado por los residuos de aminoácidos 414-421, Y341, y V159, entre estos residuos de aminoácidos se encuentran dos fenilalaninas, una tirosina, y tres valinas, entre otros residuos, los cuales forman un espacio adecuado para la interacción con el anillo de adenina. Por último, como se mencionó anteriormente, participa un residuo de arginina de la subunidad  $\alpha$ , en este caso la R374, que se orienta hacia la intercara de  $\alpha$  y  $\beta$ . Los detalles del sitio se pueden apreciar de una forma más visual en la figura 9.

En el centro del hexámero formado por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se inserta la subunidad  $\gamma$ . Esta subunidad se encuentra en la parte central de la enzima, recorriendo prácticamente todo el centro del hexámero  $\alpha$ - $\beta$  hasta llegar a hacer contacto con el anillo de subunidades  $c$  en la fracción  $F_0$ . A su vez, en la porción más cercana a  $F_0$  interactúa con la subunidad  $\epsilon$ . Los extremos amino y carboxilo

de la subunidad  $\gamma$  se estructuran formando dos alfa-hélices que interactúan entre sí y se introducen en el centro del hexámero  $\alpha$ - $\beta$ , como se puede apreciar en la figura 10. Cabe destacar que este par de alfa-hélices no es completamente simétrico, por lo cual el contacto con diferentes subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  es diferente dependiendo de su posición con respecto a  $\gamma$ . Mientras tanto, el resto de la subunidad  $\gamma$  forma un dominio globular de alfa-hélices y hojas  $\beta$  plegadas, y esta región es quien está en contacto con  $\epsilon$  y el anillo de subunidades  $c$ .

Por último, la subunidad  $\epsilon$  se encuentra en la parte inferior de la fracción  $F_1$ , adyacente a la parte globular de la subunidad  $\gamma$  (se sugiere revisar tanto la figura 4 como la figura 15).

Esta subunidad consta de un dominio globular formado por hojas  $\beta$  plegadas y dos alfa-hélices en la porción carboxilo terminal. El dominio globular interactúa con la subunidad  $\gamma$  y con el anillo de subunidades  $c$  en la fracción  $F_0$  de la enzima, como se mencionó anteriormente. Las alfa-hélices en el extremo carboxilo terminal de la subunidad  $\epsilon$  pueden tomar una conformación compacta o extendida, siendo esto una forma de regulación de la enzima que se detalla en secciones posteriores. En algunos organismos las dos alfa-hélices forman un sitio de unión a ATP que favorece el estado compacto de la subunidad  $\epsilon$  al unir ATP, pero este sitio no está presente en el caso de *P. denitrificans* (Mendoza-Hoffmann et al., 2022; Mendoza-Hoffmann, et al., 2018a). Se ha observado que la subunidad  $\epsilon$  brinda estabilidad tanto a la fracción  $F_1$  aislada como al complejo  $F_0F_1$  (Zarco-Zavala et al., 2014).



**Fig. 10 Estructura de la Subunidad  $\gamma$  e interacciones con la subunidad  $\beta$**

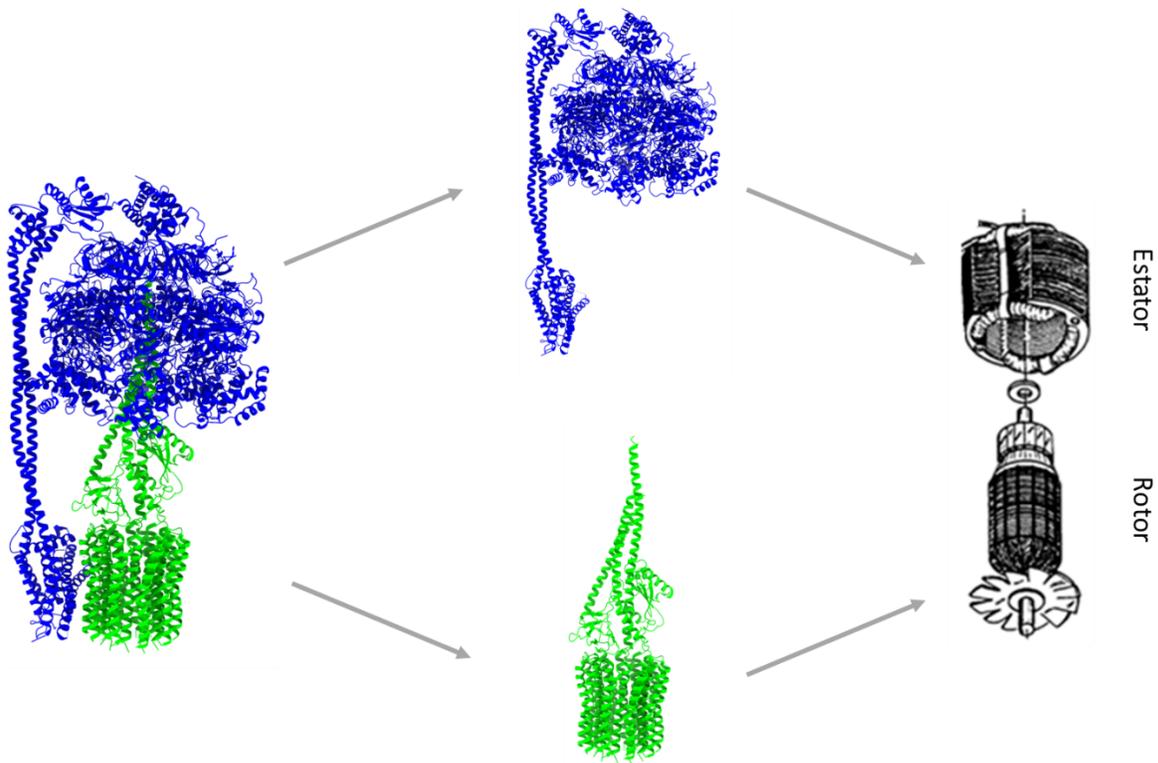
a) Se observa la ATPasa completa de *Bacillus PS3* destacando la posición de la subunidad  $\gamma$  en color azul. A la derecha muestra únicamente dicha subunidad desde una perspectiva lateral y superior. La última imagen a la derecha muestra la sobreposición de las 3 diferentes orientaciones de esta subunidad al girar sobre sí misma.

b) Se ilustra la interacción entre  $\gamma$  y  $\beta$ . En la imagen izquierda se aprecia la región del DELSEED en la cual está involucrada en el contacto con  $\gamma$ . En la imagen central se observa una vista superior con 2 orientaciones de  $\gamma$ . Por último, se ofrece un enlace para observar un video suplementario de la rotación de esta subunidad. (PDB 6N2Y, 6N2Z, 6N30, imágenes creadas con ChimeraX)

## Mecanismo catalítico

La estructura de la ATP sintasa forma, a escalas moleculares, un nanomotor que es capaz de girar sobre sí mismo. Como cualquier motor consta de dos partes, una móvil a la cual se le denomina rotor y otra inmóvil conocida como estator. En este caso el rotor de la enzima está formado por la parte central: el anillo de subunidades  $c$ , la subunidad  $\epsilon$  y la subunidad  $\gamma$ . El estator lo componen el resto de las subunidades ( $a$ ,  $b_2$ ,  $\delta$ ,  $\alpha_3$  y  $\beta_3$ ). Es importante considerar que tanto el rotor y el estator están formados con regiones de ambas fracciones,  $F_0$  y  $F_1$ , como se puede observar en la figura 11. El mecanismo catalítico está directamente relacionado con el movimiento del rotor con respecto al estator, desde una perspectiva de  $F_0$  a  $F_1$  el giro en el sentido de las manecillas del reloj cataliza la síntesis de ATP y el giro en contra de las manecillas del reloj cataliza la hidrólisis de ATP.

El giro del rotor en el sentido de la síntesis de ATP es impulsado por el gradiente electroquímico formado gracias a la cadena de transporte de electrones, en la respiración. Una vez que se acumula una mayor concentración de protones en un lado de la membrana, un protón accede por medio de un hemicanal, al anillo de subunidades  $c$ , donde como se describió previamente, se protona un residuo con características ácidas y el anillo gira hasta llegar al siguiente hemicanal donde consecuentemente el residuo se desprotona y se transloca un protón.



**Fig. 11** Estructura del nanomotor en la ATP sintasa de *Bacillus PS3*. En color azul se ilustra la región correspondiente al estator de la enzima y en color verde la parte correspondiente al rotor de la enzima. A la derecha se observan las partes por separado análogas a un motor eléctrico macroscópico. (PDB 6N2Y). A la derecha se provee un código QR y un enlace para ver el movimiento rotacional de la enzima. (Modificado de Mendoza Hoffmann, 2018).



[Enlace al video suplementario](#)

Las subunidades  $\epsilon$  y  $\gamma$  están conectadas al anillo de subunidades  $c$  formando parte del rotor de la enzima (parte central), por lo tanto, el giro del anillo mueve conjuntamente todas estas subunidades de la parte central ( $c$ ,  $\epsilon$ , y  $\gamma$ ). A su vez la subunidad  $\gamma$  penetra en el centro de la enzima contactando al hexámero de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de forma asimétrica, y su movimiento induce cambios conformacionales en regiones de  $\alpha$  y  $\beta$ . El contacto entre  $\beta$  y  $\gamma$  se lleva a cabo en la región de  $\beta$  conocida como DELSEED, (denominado así por las iniciales de su secuencia consenso). En esta región el movimiento de  $\gamma$  acopla o impulsa el movimiento de  $\beta$ , con lo cual se transfiere la energía mecánica del rotor al estator

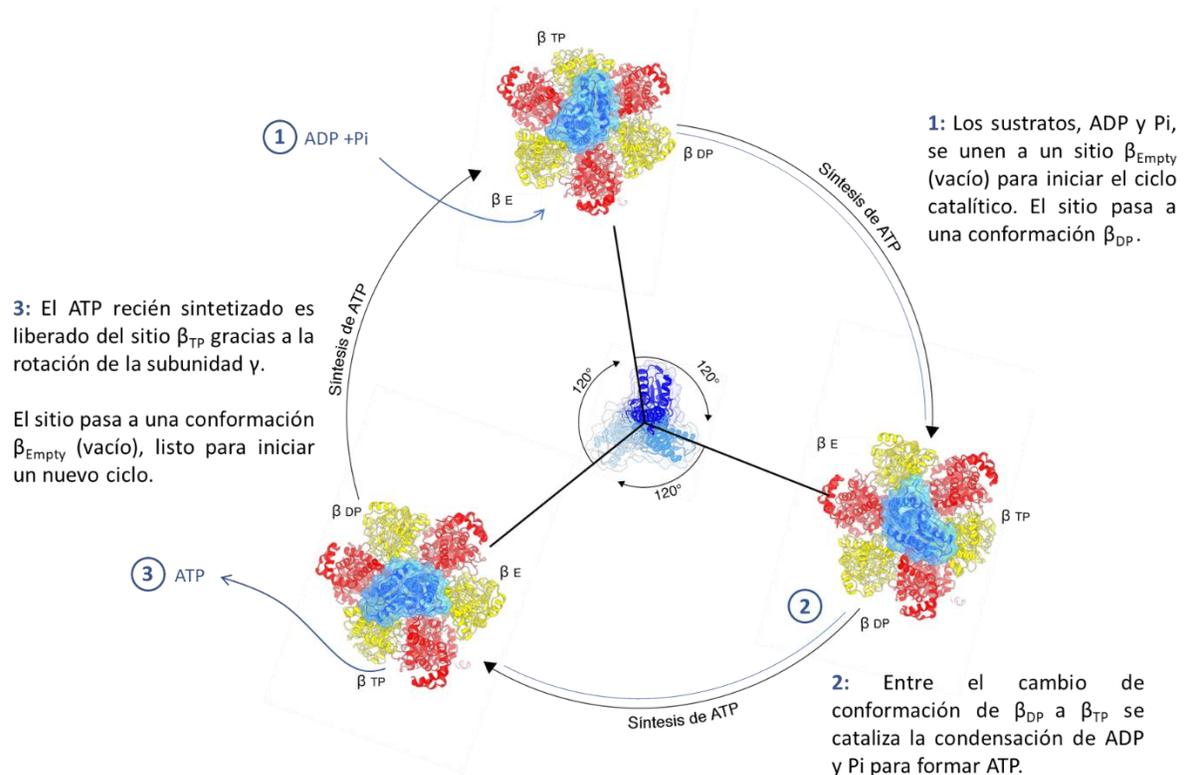
(desde la subunidad  $\gamma$  a la subunidad  $\beta$ , o viceversa en el sentido de la hidrólisis de ATP). El movimiento del DELSEED produce cambios conformacionales subsecuentes en varias regiones de  $\alpha$  y  $\beta$  y entre estos se encuentra el movimiento de los sitios de unión a nucleótidos, lo cual permite completar el ciclo catalítico.

El ciclo catalítico de la reacción de síntesis de ATP consta de forma simplificada de tres pasos, cada uno con diferentes conformaciones del sitio de unión a nucleótidos. La primera conformación sería aquella en la cual el sitio catalítico se encuentra vacío, a la espera de la llegada de los sustratos, y a la subunidad  $\beta$  en esta conformación se le denomina  $\beta_E$  ("Empty" del inglés vacía). La siguiente conformación corresponde al estado en el cual los sustratos, inicialmente el ADP y posteriormente  $P_i$  y  $Mg^{2+}$ , se unen al sitio catalítico; a esta conformación se le conoce como  $\beta_{DP}$ . La última conformación del sitio catalítico se conoce como  $\beta_{TP}$ , y en esta el sitio está ocupado por el ATP, el producto de la reacción.

En la dirección de la síntesis de ATP, el ciclo catalítico recorre las conformaciones de  $\beta$  en el siguiente orden:  $\beta_E - \beta_{DP} - \beta_{TP}$  para posteriormente regresar a la conformación e iniciar un nuevo ciclo. En la dirección inversa, es decir en la reacción de hidrólisis de ATP, el ciclo se lleva a cabo de manera inversa:  $\beta_E - \beta_{TP} - \beta_{DP}$ . Lo anterior se ilustra en la figura 12. Estos cambios conformacionales como se mencionó previamente están impulsados por el movimiento de  $\gamma$ , impulsado a su vez por el flujo de  $H^+$  (en sentido de la síntesis) y por la unión y posterior hidrólisis de ATP (en el sentido de la hidrólisis). Este mecanismo corresponde al Mecanismo de Cambio de Unión Rotacional propuesto por Paul D. Boyer, el cual le mereció el premio Nobel de Química, al ser descubierto por medio de reacciones de intercambio isotópico y cinética enzimática aun sin conocer la estructura de la enzima a detalle (Boyer, 1997).

El estado de transición en la reacción de síntesis de ATP ocurre entre la transición de  $\beta_{DP}$  a  $\beta_{TP}$ , en ese estado se logra una interacción tan buena entre la enzima y el estado de transición que se ha reportado (Nicholls & Ferguson, 2013, pp. 204–206) que, dentro del sitio, el  $P_i$  puede unirse y separarse en varias ocasiones del

ADP, reflejando un  $\Delta G$  muy cercano a 0, únicamente tomando en cuenta la reacción dentro del sitio catalítico. Una vez sintetizado el ATP, para pasar de la conformación  $\beta_{TP}$  a  $\beta_E$ , es necesario otro cambio conformacional también impulsado por el movimiento de  $\gamma$ . En el sentido de la síntesis, este es el paso más endergónico de ciclo y es necesario para lograr liberar el ATP recién formado (Boyer, 1997).



**Fig. 12 Mecanismo catalítico de la ATP sintasa**

Diagrama del mecanismo catalítico de la ATP sintasa, también llamado de cambio de unión o catálisis alternada. En el centro de la imagen se muestra las 3 orientaciones de la subunidad  $\gamma$  y sobrepuestas. Los pasos 1-3 resumen el ciclo en sentido de la síntesis de ATP para un solo sitio. Por enzima existen 3 sitios catalíticos y las conformaciones de cada uno están desfasados con respecto a los demás. Un esquema detallado se ilustra en el anexo IV.

Los cambios conformacionales están impulsados por los movimientos de  $\gamma$  impulsado a su vez por el flujo de  $H^+$  (en sentido de la síntesis) y por la unión y posterior hidrólisis de ATP (en el sentido de la hidrólisis). (PDBs 6N2Y, 6N2Z, 6N30).

Ya que la ATP sintasa tiene tres sitios catalíticos por enzima, los pasos del ciclo catalítico descrito antes se repiten para cada uno. Sin embargo, en cualquier

momento, dado que todos los sitios catalíticos de la enzima se encuentran siempre en conformaciones distintas, es decir los sitios se van alternando entre sí, o en palabras coloquiales, están desfasados. Mientras que un sitio está en conformación  $\beta_E$  el siguiente esta como  $\beta_{DP}$ , y el ultimo como  $\beta_{TP}$ . A este mecanismo se le conoce como mecanismo de sitios alternantes o mecanismo de cambio de unión (Boyer, 1997; Nicholls & Ferguson, 2013, pp. 204–206).

El papel de la rotación de la parte central de la enzima en la catálisis se ha podido comprobar con diferentes técnicas que van desde análisis por entrecruzamiento, hasta experimentos con molécula única donde se acopla a la enzima a filamentos fluorescentes o perlas de oro (Noji et al., 1997; Zarco-Zavala et al., 2020) e incluso utilizando técnicas como FRET (Sielaff et al., 2022).

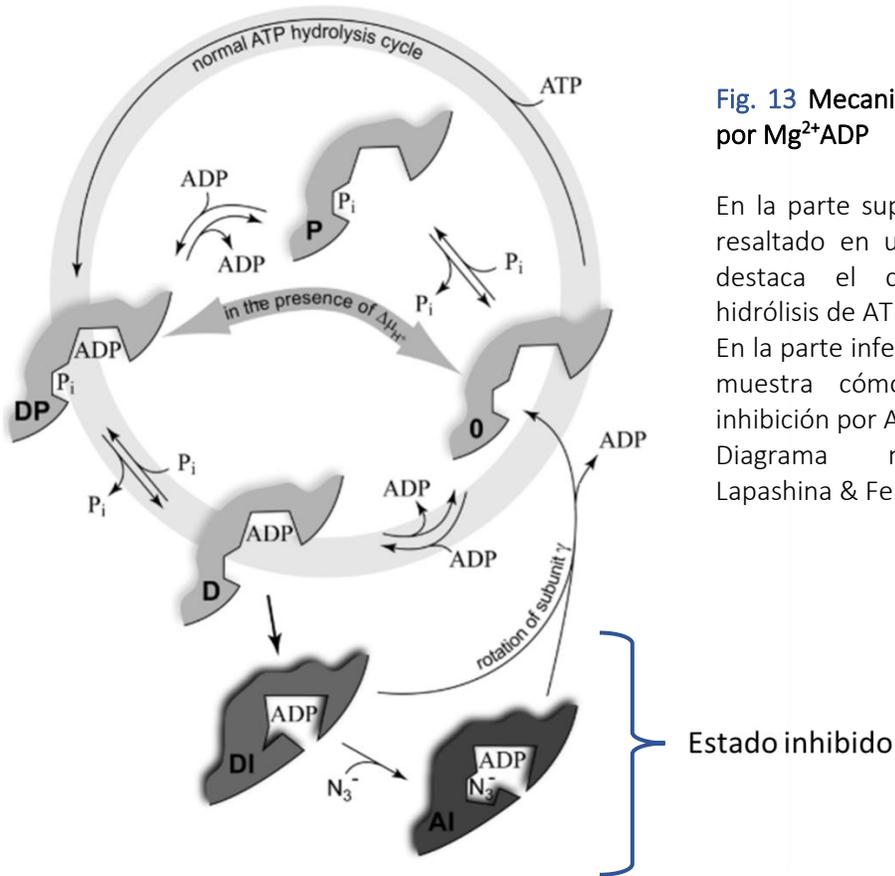
## Regulación de la ATP sintasa

En los organismos que realizan fosforilación oxidativa, la gran mayoría de la producción de ATP la realiza la ATP sintasa, gracias al gradiente electroquímico generado por la cadena de transporte de electrones. Sin embargo, existen condiciones fisiológicas como la hipoxia en mitocondrias, o la ausencia de cualquier aceptor final de electrones en cualquier otro organismo, en las cuales no es posible mantener el gradiente de protones intermembranal y, en estos casos, la ATP sintasa terminaría por catalizar la reacción enzimática en el sentido de la hidrólisis de ATP, funcionando como ATPasa. Aunque algunos organismos se pueden beneficiar temporalmente de esta actividad de ATPasa (para mantener el potencial de membrana a expensas de ATP), de no regularse la actividad hidrolítica la enzima acabarían por depletarse las reservas de ATP de la célula llevándola a la muerte, por lo tanto, es vital regular la función de hidrólisis de ATP, lo cual se realiza gracias a diferentes mecanismos detallados a continuación.

### I. Regulación por producto/sustrato

El  $Mg^{2+}ADP$  además de ser un sustrato (en el sentido de la síntesis de ATP) o un producto (en el sentido de la hidrólisis de ATP), es un inhibidor no competitivo de la actividad de ATPasa de la enzima. Esta forma de regulación es la más común y se ha descrito en enzimas mitocondriales (Fitin et al., 1979; Minkov et al., 1979) de cloroplastos (Dunham & Selman, 1981; Feldman & Boyer, 1985) y de bacterias (Yoshida & Allison, 1983), siendo uno de los mecanismos más conservados y probablemente una característica en común de todas las ATP sintasas (Schäfer & Penefsky, 2008, p. 286). La inhibición por  $Mg^{2+}ADP$  ocurre cuando esta molécula se une a un sitio catalítico con alta afinidad por ADP sin una molécula de  $P_i$ , lo cual puede ser el resultado de la previa hidrólisis de ATP seguida de la liberación del  $P_i$  o bien puede ser resultado de la unión de ADP al sitio favorecida por una alta concentración de dicha molécula en el medio. Una vez que el ADP se encuentra en dicho sitio, la enzima puede entrar en un estado inhibido en el cual su actividad se inhibe parcialmente. Para salir del estado inhibido es necesario

que el movimiento de  $\gamma$  cambie la conformación del sitio donde se unió el  $Mg^{2+}ADP$  para que este pueda liberarse y entonces la enzima continúe con el ciclo catalítico normal. Esto se ejemplifica en la figura 13. Existen algunos factores que modifican la inhibición por  $Mg^{2+}ADP$ , entre los cuales se encuentra la concentración de  $P_i$ , la unión de nucleótidos a sitios no catalíticos en la  $F_1$ , y la fuerza protón motriz. En el caso del  $P_i$ , este puede ayudar a prevenir o aliviar la inhibición por  $Mg^{2+}ADP$  (Feniouk et al., 2007). La unión de nucleótidos a sitios no catalíticos de la enzima facilita la salida del  $ADP$  de sitio catalítico, lo cual también alivia la inhibición por  $Mg^{2+}ADP$ . Por último, se ha comprobado que la fuerza protón motriz estimula la actividad de hidrólisis de  $ATP$ , probablemente facilitando la salida de la enzima del estado inhibido por  $Mg^{2+}ADP$  (Lapashina & Feniouk, 2018; Pacheco-Moisés et al., 2000), aunque la activación de la actividad de  $ATP$  también podría ser el resultado de permitir la remoción de las proteínas inhibitorias de su sitio de acción, las cuales se detallan en las siguientes secciones.



**Fig. 13** Mecanismo de inhibición por  $Mg^{2+}ADP$

En la parte superior de la figura resaltado en un círculo gris, se destaca el ciclo normal de hidrólisis de ATP.

En la parte inferior de la figura se muestra cómo se genera la inhibición por ADP.

Diagrama modificado de Lapashina & Feniouk 2018.

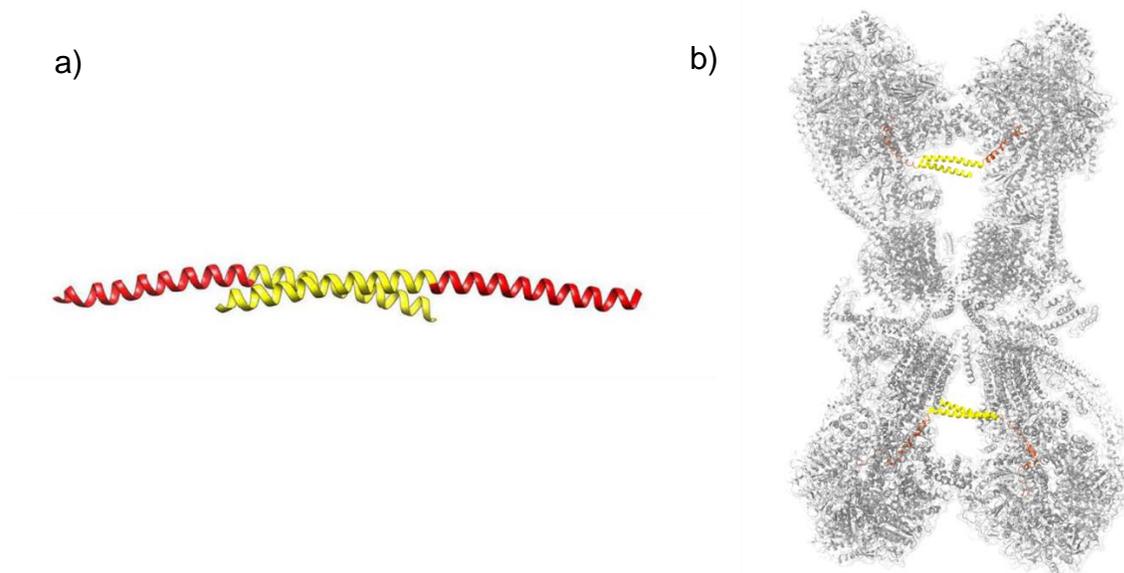
## II. Regulación por una proteína inhibidora

### a) Subunidad $IF_1$

La regulación de la ATP sintasa presente en mitocondrias está mediada por una subunidad supernumeraria de la enzima que se denomina Factor Inhibidor 1 ( $IF_1$ ), ver figura 14 (Pullman & Monroy, 1963). Esta subunidad es una proteína pequeña de 84 aminoácidos con un peso aproximado de 10 kDa, y una gran cantidad de residuos básicos (Frangione et al., 1981). Su extremo amino (residuos 1-46) es intrínsecamente desordenado en solución, pero que adquiere un plegamiento de alfa-hélice al interactuar con  $F_1$  (Boreikaite et al., 2019). La subunidad  $IF_1$  evita la hidrólisis de ATP insertando su extremo amino en la intercara de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  en la fracción  $F_1$  de la enzima. Al insertarse en el sitio de inhibición surge un bloqueo mecánico de la rotación y por lo tanto se detiene la catálisis,

impidiendo tanto la hidrólisis como la síntesis de ATP. Dicha inhibición sigue una cinética de tipo no competitiva. La región en la cual se inserta  $IF_1$  en la ATPasa es conocida como INGECORE (siglas del inglés que corresponden a región central de inhibición general), y es también el sitio de unión de las otras proteínas reguladoras de la enzima que se describen en las secciones siguientes (Mendoza-Hoffmann et al., 2018; Shirakihara et al., 2015). Varios trabajos han explorado la región mínima necesaria para la inhibición de la ATPasa mitocondrial por la  $IF_1$ , encontrando que los residuos 14-47 (Van Raaij et al., 1996) o 42-58 (Papa, 1996; Zanotti et al., 2004) son responsables de la inhibición respectivamente (Mendoza-Hoffmann et al., 2022).

La inhibición de la hidrólisis de ATP por  $IF_1$  está relacionada con las condiciones de pH en la matriz mitocondrial. Las condiciones ácidas son una consecuencia de una disminución del potencial de membrana y por lo tanto es en estas condiciones cuando es necesario inhibir a la ATPasa para evitar la hidrólisis de ATP. Por debajo de un pH de 7.5,  $IF_1$  forma dímeros, los cuales son la forma activa de la subunidad y se unen a la ATPasa inhibiéndola. Se ha demostrado que el dominio carboxilo



**Fig. 14** Estructura de  $IF_1$  de *S. scrofa*

a) Estructura de  $IF_1$  en un dímero. b) Posición de  $IF_1$  (color amarillo y rojo) en la formación de dímeros y tetrámeros de la ATPasa de cerdo (color gris). (Modificado de la tesis de Mendoza Hoffmann, 2018 y PDB 6J5K)

terminal de IF<sub>1</sub> no es esencial para la inhibición (Van Raaij et al., 1996), pero es esta región de la proteína la cual permite la dimerización de la IF<sub>1</sub> tanto en su estado soluble sin asociación a F<sub>1</sub> como en el estado asociado a F<sub>1</sub>. Lo anterior permite estabilizar los dímeros de la ATPasa (García et al., 2006; Minauro-Sanmiguel et al., 2005), los cuales a su vez permiten generar la curvatura de la membrana en las crestas mitocondriales (Blum et al., 2019; Davies et al., 2011; Paumard et al., 2002). En cambio, a valores elevados de pH se favorece la formación de tetrámeros de IF<sub>1</sub>, en los cuales el extremo amino se encuentra ocluido, y por lo tanto las subunidades IF<sub>1</sub> se encuentran en un estado inactivo.

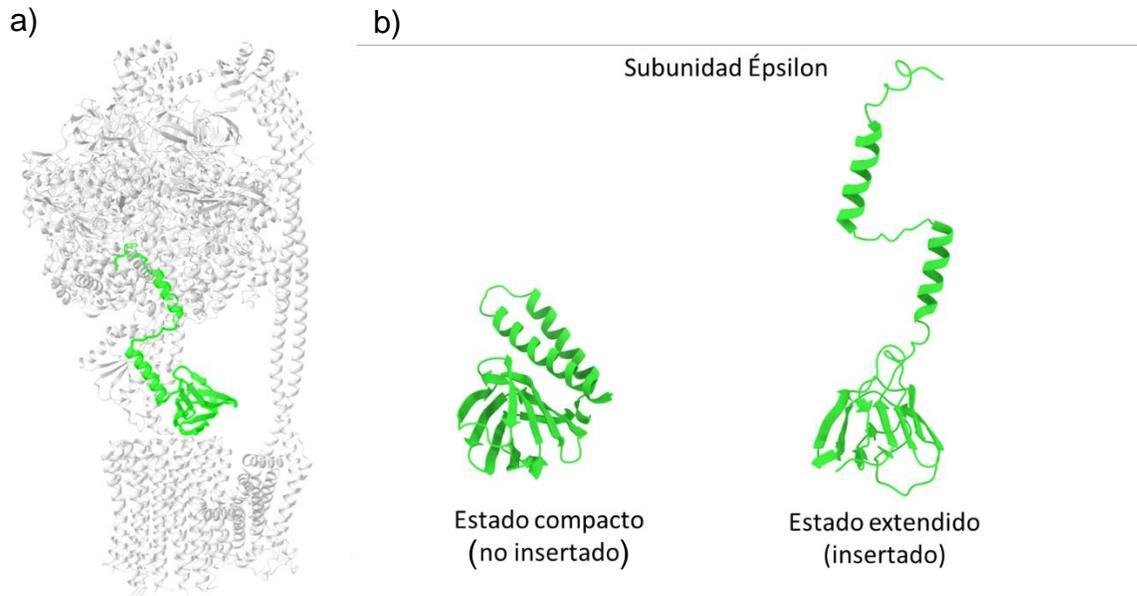
Además, se ha observado que la fosforilación de un residuo de serina (S39) evita la unión de IF<sub>1</sub> con la ATPasa, y por lo tanto para que IF<sub>1</sub> ejerza su función inhibitoria es necesario que se encuentre desfosforilada (García-Bermúdez et al., 2015). Por último, resulta interesante el hecho de que la expresión de la subunidad IF<sub>1</sub> presenta gran variación en diferentes tejidos y es sobre expresada en carcinomas animales (Bravo et al., 2004) y humanos (Sánchez-Aragó et al., 2013), lo cual refleja su relevancia fisiológica como regulador de la ATPasa.

### *b) Subunidad $\epsilon$*

En la mayoría de las bacterias la actividad hidrolítica de la ATPasa está regulada por la subunidad  $\epsilon$  (Sternweis & Smith, 1980). Como se mencionó previamente, esta subunidad tiene un papel dual para la enzima, la porción globular afianza la unión entre las fracciones F<sub>O</sub> y F<sub>1</sub> del rotor y las dos alfa-hélices del extremo carboxilo terminal participan en la regulación enzimática.

Gracias a diferentes estructuras de la enzima (obtenidas por cristalografía de rayos X y crio-microscopía electrónica), se ha observado que las alfa hélices del extremo carboxilo de la subunidad  $\epsilon$  pueden adoptar dos estados a los cuales se les conoce como conformación extendida y conformación compacta, como se aprecia en la figura 15 (Cingolani & Duncan, 2011). Al adoptar la conformación extendida la subunidad  $\epsilon$  impide que la enzima hidrolice ATP, mientras que en el estado compacto la enzima sí es capaz de hacerlo. Sin embargo, aunque el

estado extendido impide la catálisis en el sentido de la hidrólisis, se ha comprobado que este mismo estado sí permite que se catalice la reacción en el sentido de la síntesis de ATP (Tsunoda et al., 2001). Es decir que la subunidad  $\epsilon$  actúa como un regulador unidireccional de la ATPasa. Esta característica peculiar en la forma de la regulación se explica al profundizar en el mecanismo de  $\epsilon$ . Para lograr la inhibición, las dos alfa-hélices se separan entre sí y la hélice más distal se inserta en la intercara de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  en  $F_1$  en la misma región en donde se inserta  $IF_1$ . La hélice más distal forma una especie de trinquete que interactúa con  $F_1$  en esta región central de inhibición general, y permite que  $\gamma$ , el rotor, gire en el sentido de la síntesis. Sin embargo, en el momento que el rotor es impulsado en el sentido contrario, la alfa hélice de  $\epsilon$  impide su movimiento, deteniendo el giro solo en el sentido de la hidrólisis, funcionando tal como el mecanismo de una ñeeta-trinquete o coloquialmente una matraca (Tsunoda et al., 2001). La conversión entre los dos estados de la subunidad  $\epsilon$  se ha relacionado directamente en algunas bacterias como *Bacillus PS3* con la concentración de ATP intracelular, ya que el sitio de unión de ATP en la subunidad  $\epsilon$  mantiene a la subunidad en el estado compacto (Yagi et al., 2007). Cuando la concentración de ATP disminuye, las dos alfa hélices de  $\epsilon$  no se mantienen juntas y se pueden extender para adoptar la conformación extendida e inhibitoria. Este mecanismo funciona como un sensor de ATP, permitiéndole a la célula evitar la hidrólisis cuando la concentración de ATP es baja, es decir, cuando máspreciado es el ATP. Esta propiedad de la subunidad  $\epsilon$ , se ha aprovechado para el diseño de biosensores de ATP *in vivo*, colocando dos fluoróforos en ambos extremos de la subunidad que permiten realizar una transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) (Imamura et al., 2009; Yoshida et al., 2016).



**Fig. 15** Estructura de la subunidad  $\epsilon$

a) Estructura de la ATP sintasa de *E. coli*, enfatizando a la subunidad  $\epsilon$  en un estado insertado (color verde). b) Estados compacto (PDB 5T40) y extendido de la subunidad  $\epsilon$  (PDB 1AQT).

Es importante considerar que la afinidad de la subunidad  $\epsilon$  al ATP varía entre especies, como un reflejo tal vez de las diferencias sutiles en la forma que se responde a las condiciones energéticas de la célula, la forma en la que crece (tipo de metabolismo) y al peso de la función hidrolítica/sintética de la ATPasa. Un ejemplo notorio es el de *E. coli*, en donde la subunidad  $\epsilon$  tiene una afinidad relativamente baja por ATP comparada con *Bacillus sp.* En *E. coli* también se ha comprobado la presencia de los estados extendido y compacto, y su relación con la actividad inhibitoria de  $\epsilon$  (Cingolani & Duncan, 2011; Sobti et al., 2019), pero ya que la afinidad de  $\epsilon$  por ATP es relativamente baja, evidentemente el cambio entre conformaciones extendida y compacta ocurre con diferencias sutiles con respecto a bacterias como *Bacillus sp.* El cambio de conformación en este caso puede estar promovido además de por la unión/disociación de ATP, por la fuerza protón motriz que impulsa el giro de la enzima. Además, en *E. coli* se han observado estados intermedios entre la conformación extendida y compacta (Liu et al., 2020; Sobti et al., 2016). El sitio de unión a ATP de la subunidad  $\epsilon$  está presente, aun con diferencias en su afinidad, en la mayoría de las bacterias, sin embargo, tanto en mitocondrias como en  $\alpha$ -proteobacterias (como *P. denitrificans*) esta región se

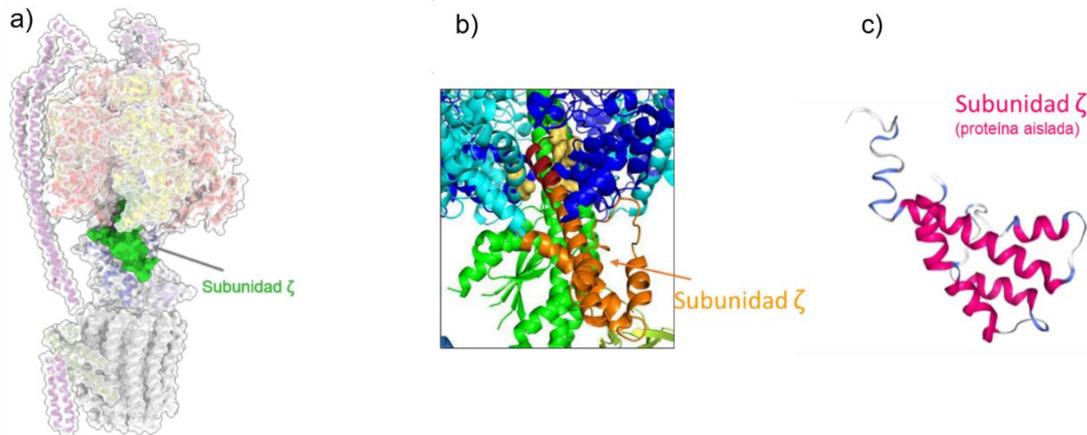
perdió, y la subunidad  $\epsilon$  carece por completo de una función reguladora. Como ya se ha descrito en mitocondrias, la regulación está dado por otra proteína diferente ( $IF_1$ ) y en el caso de  $\alpha$ -proteobacterias la regulación la lleva a cabo la subunidad  $\zeta$  como se describe en la sección subsecuente.

### c) Subunidad $\zeta$

En las bacterias pertenecientes al grupo de las  $\alpha$ -proteobacterias, la regulación de la ATPasa no recae sobre la subunidad  $\epsilon$ , en cambio se lleva a cabo por la subunidad  $\zeta$ . Esta subunidad se encontró por primera vez en *P. denitrificans*, (De la Rosa Morales, 2005). Desde entonces se ha demostrado su papel como inhibidor de la ATPasa en bacterias como *Rhodobacter sphaeroides*, y *Jannaschia* sp. (Brito Sánchez, 2021; Zarco Zavala, 2014). Además se ha detectado la expresión de la proteína en varias  $\alpha$ -proteobacterias como lo son: *Rhodobacter capsulatus*, *Rhizobium etli*, *Sinorhizobium meliloti*, *Methylobacterium nodulans*, y *Rhodospirillum salinarum*, entre otras (Mendoza Hoffmann, 2018). La presencia del gen que codifica dicha proteína se ha observado en un sinnúmero de  $\alpha$ -proteobacterias (Herrera Romo, 2022), sin encontrar la presencia del gen en un número significativo de bacterias de otros grupos taxonómicos.

La subunidad  $\zeta$  es una proteína relativamente pequeña, la cual consta de 104 aminoácidos (en *P. denitrificans*) y tiene un peso de 11.7 kDa. Su estructura se ha determinado utilizando resonancia magnética nuclear (Zarco-Zavala et al., 2013b; Serrano et al., 2014) y cristalografía de rayos X (Morales-Rios et al., 2015), y los modelos obtenidos se muestran en la figura 16. Gracias a los modelos de la estructura de la subunidad  $\zeta$  se puede observar que la proteína adquiere una estructura terciaria formada por 4 alfa-hélices y un domino desordenado (cuando se encuentra en solución), que comprende los primeros 18 residuos del extremo amino terminal. Para llevar a cabo la inhibición, esta región intrínsecamente desordenada entra en contacto con la intercara de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  en la región conocida como región central de inhibición general (García-Trejo et al.,

2016; Mendoza-Hoffmann et al., 2018). En el estado inhibitorio el extremo amino de  $\zeta$  pasa de ser una región desordenada a adquirir una conformación de alfa-hélice como se puede apreciar en el modelo del centro de la figura 16 (Mendoza-Hoffmann, et al., 2018a).



**Fig. 16** Estructura de la subunidad  $\zeta$  de *P. denitrificans*

a) Se muestra la estructura de la subunidad  $\zeta$  resaltada en color verde a partir del modelo obtenido por cristalografía de rayos X. b) Se muestra la subunidad en su sitio de acción en la fracción  $F_1$ , aquí la subunidad  $\zeta$  aparece de color naranja con los primeros 14 aminoácidos de color marrón. c) Se muestra en rosa la estructura de esta subunidad resuelta por RMN, las alfa-hélices en color rosa, en azul los giros  $\beta$ , y en blanco las regiones sin estructura secundaria determinada. El extremo amino terminal se encuentra en la parte superior de la proteína, en su forma desordenada. (Mendoza-Hoffmann et al., 2018, PDB 2LLO y PDB 5DN6).

El modelo para describir el mecanismo de la inhibición por  $\zeta$  más reciente hasta el momento de iniciar el presente proyecto de tesis, proponía que la subunidad  $\zeta$  empleaba sus primeros 14 residuos del extremo amino (desconociendo de forma concreta cuántos y cuáles eran realmente necesarios) para impedir la rotación de la enzima en el sentido de la hidrólisis, pero permitir la rotación en el sentido de la síntesis de ATP, de forma análoga a lo que ocurre con las subunidades  $\epsilon$  y en menor medida  $IF_1$ , es decir actuando como un trinquete que bloquea la rotación de la enzima inhibiendo así solo la función de ATPasa, pero permitiendo a la célula mantener activa la función de síntesis de ATP.

Esto permite a la célula detener la hidrólisis en condiciones que no serían favorables para la obtención de ATP y optimizar las condiciones bioenergéticas de la célula al no hidrolizar ATP prácticamente en ningún momento. Estas características dan como resultado una ATP sintasa prácticamente unidireccional como se ha reportado para la enzima de *P. denitrificans* (Pérez & Ferguson, 1990; Pacheco-Moisés et al., 2000; Zharova & Vinogradov, 2003). En condiciones de crecimiento en las cuales no hay abundancia de nutrientes y/o cuando la bacteria se ve forzada a mantener su metabolismo con base en la fosforilación oxidativa (respiración), la función fisiológica de la subunidad  $\zeta$  adquiere una relevancia esencial para permitir el crecimiento de las bacterias como se demostró en el trabajo del Dr. Mendoza Hoffmann (Mendoza-Hoffmann et al., 2018)

### III. Otros mecanismos de regulación

Además de los mecanismos de regulación mencionados anteriormente, existen otros mecanismos diversos para regular la actividad de ATPasa de la enzima. En la enzima de cloroplastos la regulación se realiza por medio de una región particular en la subunidad  $\gamma$  la cual presenta dos residuos de cisteína que solo se encuentran en las ATP sintasas de cloroplastos. Esta región permite a dicha subunidad formar un puente disulfuro, lo cual forma un asa o loop en esa región de la subunidad  $\gamma$  que obstruye el giro del rotor de la enzima, impidiendo así la hidrólisis de ATP. La formación del puente disulfuro, está favorecida por un ambiente oxidante el cual prevalece en condiciones de oscuridad y desaparece cuando el cloroplasto está expuesto a la luz, a su vez el ambiente redox es regulado por las proteínas ferredoxina y tiorredoxina. Este sistema de regulación le permite a los cloroplastos sintetizar ATP cuando están expuestos a la luz, pero impide que el ATP se hidrolice en condiciones de oscuridad cuando el gradiente de protones se abate durante la noche (Hahn et al., 2018; Mills & Mitchell, 1982; Yang et al., 2020).

En la enzima de *Mycobacterium smegmatis* se ha propuesto que la inhibición de la actividad de ATPasa puede estar relacionada con una región especial de la subunidad  $\gamma$  que forma un asa (Hotra et al., 2016). Además, se ha observado que en esta enzima la subunidad  $\alpha$  presenta una extensión que entra en contacto con el rotor de la enzima ( $\gamma$ ) impidiendo la rotación únicamente en el sentido de la hidrólisis de ATP (Guo et al., 2020)

La forma de regulación más recientemente descubierta involucra a una nueva subunidad denominada subunidad  $\theta$ , la cual está presente en cianobacterias (Song et al., 2022). Esta pequeña subunidad se expresa únicamente en condiciones de oscuridad, y se ha propuesto que en su mecanismo de inhibición esta proteína interactúa con las subunidades  $a$  y  $c$  de la fracción  $F_0$  de la enzima; lo cual constituye un mecanismo fundamentalmente distinto al de otras proteínas inhibitoras. La inhibición de la ATPasa impide que la enzima hidrolice el ATP en condiciones de oscuridad, conservando el ATP cuando más valioso es (Burnap, 2022).

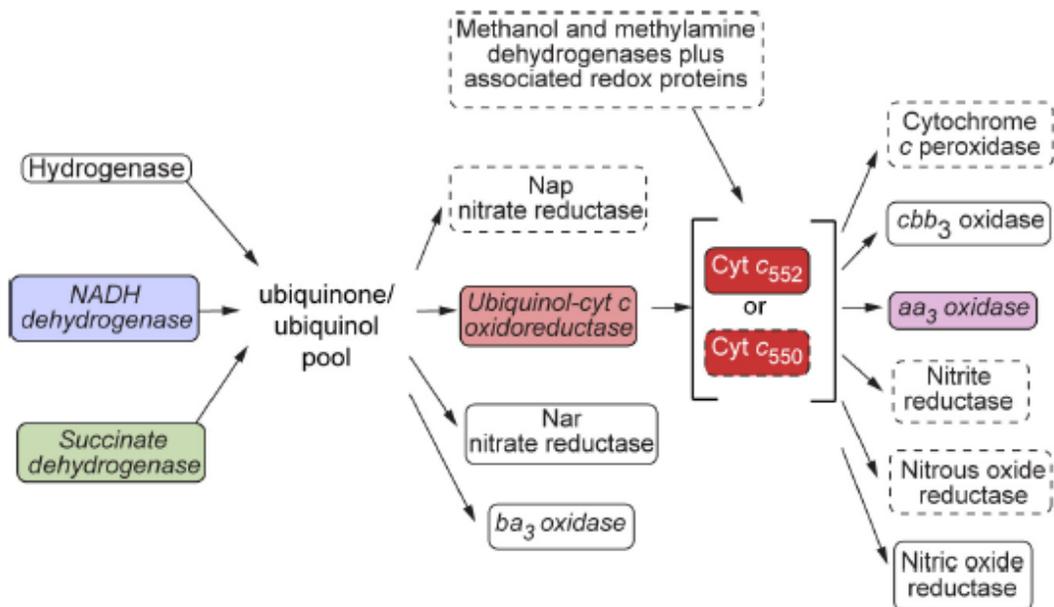
## *P. denitrificans* y su ATP sintasa como modelos de estudio

*P. denitrificans* es una bacteria Gram negativa, con una morfología de cocos o cocobacilos cortos, inmóvil y que no presenta formación de esporas. Suele encontrarse en la tierra, lodos, agua y drenaje (Garrity et al., 2005, p. 197). *P. denitrificans* es una bacteria metabólicamente diversa, se desarrolla en condiciones aerobias, aunque puede crecer en condiciones de anaerobiosis empleando metanol, metilamina, tiosulfato o H<sub>2</sub> como donadores de electrones o fuente de energía (Madigan et al., 2014), y usando diferentes compuestos de nitrógeno tales como NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, NO y N<sub>2</sub>O como aceptores finales de electrones. La reducción de estos compuestos puede llevar al nitrógeno desde sus estados más oxidados, hasta N<sub>2</sub>, en el proceso conocido como desnitrificación. Además, es capaz de crecer con CO<sub>2</sub> (Ye et al., 2020) o succinato como fuente de carbono. *P. denitrificans* se aisló por primera vez en 1910 por Martinus Beijerinck, quien lo denominó en ese entonces como *Micrococcus denitrificans* (Beijerinck & Minkman, 1910), y no fue hasta 1969 que se creó el género *Paracoccus* con *P. denitrificans* como especie tipo (Davis et al., 1969). Su clasificación taxonómica actual es la siguiente: Dominio: Bacteria, Filo: Proteobacteria, Clase: Alphaproteobacteria, Orden: Rhodobacterales, Familia: Rhodobacteraceae, Género: *Paracoccus*, Especie: *denitrificans*.

El genoma de *P. denitrificans* se compone de 2 cromosomas circulares y un mega plásmido, los cuales contienen alrededor de 5000 genes en total (*KEGG GENOME: Paracoccus denitrificans*, 2022). El contenido de G y C es alto, alrededor del 67% (*Paracoccus denitrificans (ID 1658) - Genome - NCBI*, 2022), lo cual puede traer ciertas complicaciones cuando se realizan algunas técnicas de biología molecular con estos genes.

Esta bacteria es ampliamente usada como un organismo modelo, ya sea para estudiar el proceso de desnitrificación (Carlson & Ingraham, 1983; Gaimster et al., 2018) y/o en el campo de la bioenergética para el estudio de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, su cadena respiratoria se ilustra en la figura 17 (Ferguson, 2018; Nicholls & Ferguson, 2002).

El frecuente uso de *P. denitrificans* en la bioenergética se debe a que esta bacteria al ser parte de la clase Alphaproteobacteria, tiene una cercanía filogenética con el protoendosimbionte que dio origen a la mitocondria según la teoría de la endosimbiosis (Sagan, 1967) (aunque actualmente se piensa que las bacterias más cercanas son las rickettsiales), y por lo tanto comparte ciertas características bioenergéticas con la mitocondria a tal punto de ser llamada en el pasado como una mitocondria de vida libre.



**Fig. 17** Cadena respiratoria en *P. denitrificans*

Se ilustra todos los caminos posibles del transporte de electrones en *P. denitrificans*. En color se muestra el camino de los complejos respiratorios canónicos. (modificado de Ferguson et. al. 2013)

Algunas de las características que comparte *P. denitrificans* con las mitocondrias son las siguientes: la composición de su membrana es similar a la de las mitocondrias, su cadena respiratoria cuenta con los cuatro complejos respiratorios y estos tienen una semejanza con su contraparte mitocondrial, la sensibilidad por algunos inhibidores de la fosforilación oxidativa se conserva, y por último las membranas invertidas de *P. denitrificans* exhiben un control respiratorio, lo cual se refiere a la propiedad de aumentar la velocidad respiratoria como función de la adición de ADP (Zarco Zavala, 2014).

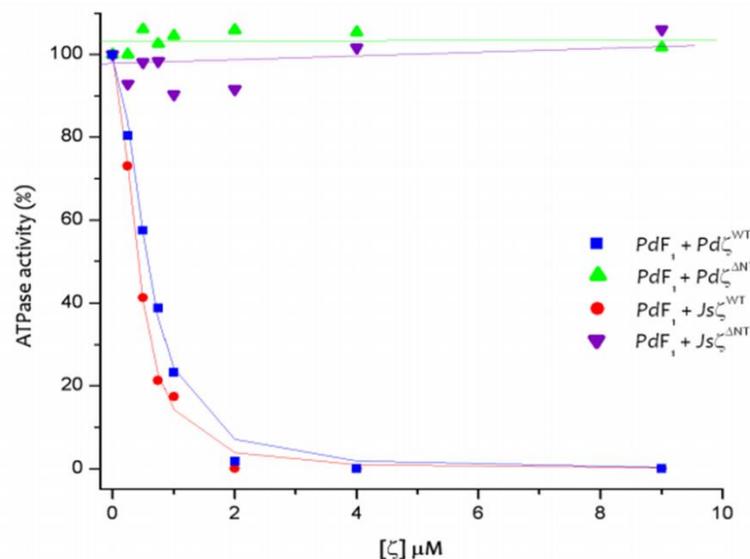
La ATP sintasa de *P. denitrificans* resulta de un interés particular, ya que su actividad de síntesis de ATP es mucho mayor a su actividad de hidrólisis de ATP, por lo cual la enzima actúa prácticamente como un catalizador unidireccional de la reacción. Se ha reportado que la actividad de ATPasa corresponde únicamente al 0.8-5.0% de la actividad de síntesis (Pacheco-Moisés et al., 2000; Pérez & Ferguson, 1990; Zharova & Vinogradov, 2003). El mecanismo por el cual la enzima mantiene dicha relación entre sus actividades de síntesis e hidrólisis se comprendió a mayor profundidad al observar que esta enzima contenía una subunidad extra, la cual era responsable de controlar su actividad hidrolítica (Morales-Ríos et al., 2009; De la Rosa Morales, 2005). A esta subunidad se le denominó subunidad  $\zeta$ , y corresponde a la proteína inhibidora descrita de forma breve en una sección previa. Desde su descubrimiento, se ha logrado describir su estructura (Morales-Rios et al., 2015; Serrano et al., 2014; Zarco-Zavala et al., 2013a), sus características como inhibidor (García-Trejo et al., 2016; Zarco-Zavala et al., 2014), y su papel fisiológico (Mendoza-Hoffmann et al., 2018), avances que han permitido proponer un mecanismo de acción y un conocimiento más profundo de su función.

# Antecedentes directos y planteamiento del problema

El antecedente más directo en el cual se analizó la región inhibitoria (el extremo amino) de la subunidad  $\zeta$ , corresponde al proyecto de doctorado de la Dra. Mariel Zarco Zavala (Zarco Zavala, 2014), aunando a otros artículos referentes a la estructura de la ATP sintasa de *P. denitrificans* que reforzaron el modelo propuesto. En dicho proyecto de doctorado se describen las características de la subunidad  $\zeta$  como proteína inhibitoria, lo cual permitió conocer las diferentes subunidades en la fracción  $F_1$  con las cuales interactúa  $\zeta$  ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\epsilon$ ), esto gracias a experimentos de entrecruzamiento. Además, se realizaron análisis de proteólisis limitada donde se observó que la actividad de ATPasa se incrementaba al mismo tiempo que la subunidad  $\zeta$  (y otras) se proteolisaban y uno de los cortes eliminaba el extremo amino (García-Trejo et al., 2016); Lo anterior, en conjunto con el hecho de que la secuencia del extremo amino es altamente conservada y de que la estructura resuelta por resonancia magnética nuclear mostró un amino terminal muy flexible (Serrano et al., 2014; Zarco-Zavala et al., 2013a), sugieren que la función inhibitoria residía en esta porción del subunidad  $\zeta$ . Para comprobar dicha hipótesis se obtuvo una subunidad  $\zeta$  con una ablación de los primeros 14 aminoácidos, denominada  $Pd\zeta^{\Delta NT}$ . Para esto se empleó mutagénesis por PCR con desoxioligonucleótidos adecuados para lograr la mutación deseada en el gen de la  $\zeta$ . Los resultados de los ensayos de actividad de ATPasa revelaron que la subunidad  $\zeta$  sin los primeros 14 aminoácidos es incapaz de inhibir la actividad de ATPasa de la fracción  $F_1$  de la ATPasa de *P. denitrificans*. Esto implica que los primeros 14 aminoácidos son los responsables de llevar a cabo la inhibición de la hidrólisis de ATP, ver figura 18. Cabe destacar que para tener la certeza de que dicha pérdida de la función no se debió a un plegamiento anómalo, se realizaron experimentos de competencia con la subunidad  $\zeta$  silvestre y se comprobó su capacidad para interactuar con la  $PdF_1$  mediante un ensayo de reconstitución y posterior filtración en gel. Ambos resultados indican que la  $\zeta$  mutante era capaz de

interactuar con PdF<sub>1</sub> y de competir con la ζ silvestre (en el caso del ensayo de competencia). Además, convenientemente la estructura de la subunidad ζ de otra α-proteobacteria se había resuelto por RMN únicamente con los aminoácidos 21 en adelante (los primeros aminoácidos se removieron para facilitar su determinación estructural) (Serrano et al., 2014). En esta estructura de ζ trunca, se comprueba un plegamiento prácticamente idéntico con la estructura de la ζ silvestre de *P. denitrificans*, por lo cual se evidencia que la remoción de los primeros 20 aminoácidos no altera el plegamiento de la región globular de ζ, lo cual es también relevante para el presente proyecto.

Los estudios estructurales de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPasa de *P. denitrificans* incluyendo a la subunidad ζ (por medio de modelado molecular (García-Trejo et al., 2016) y gracias a un modelo a partir de difracción de rayos x (Morales-Rios et al., 2015)) reforzaron de manera indiscutible la relevancia de los primeros 14 aminoácidos de ζ para ejercer su actividad inhibitoria. En estas estructuras se puede apreciar cómo el extremo amino terminal de la subunidad ζ entra en contacto con las subunidades α, β, y γ en F<sub>1</sub>, como se muestra en la figura 16, en donde los primeros 14 aminoácidos de ζ están representados en color rojo.



**Fig. 18** Ensayos de inhibición con la ζΔNT

Se observan los ensayos de inhibición realizados por la Dra. Zarco Zavala empleando una subunidad ζ sin los primeros 14 aminoácidos. Se observa la pérdida de la función al remover esa región en el amino terminal. (Zarco Zavala, 2014).

Gracias a los experimentos mencionados anteriormente se conocía que la función de  $\zeta$  como inhibidor de la hidrólisis de ATP recae sobre los primeros 14 aminoácidos, y gracias a las estructuras de  $\zeta$  en su sitio inhibitorio se pueden inferir ciertos contactos que la subunidad  $\zeta$  mantiene con las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ . Sin embargo, las interacciones esenciales entre los residuos de  $\zeta$  y  $F_1$  no se conocían, es decir, no se sabía con certeza que residuos del extremo amino eran imprescindibles para la función de  $\zeta$ . Por lo tanto, la pregunta principal que este proyecto pretende resolver es: ¿Cuál es la región mínima necesaria en el extremo amino terminal de la subunidad  $\zeta$  para que esta sea capaz de inhibir la actividad de la ATPasa? De forma que el objetivo de este proyecto fue analizar de forma más concreta esta región mínima del amino utilizando deleciones secuenciales en dicha región. Es preciso mencionar que con el fin de analizar de forma detallada las interacciones de  $\zeta$  en  $F_1$ , además del presente proyecto se llevaron a cabo proyectos complementarios, en los cuales se pretende realizar mutaciones sitio específicas en ciertos residuos del extremo amino terminal de  $\zeta$  de forma que el análisis de dichas mutaciones puntuales y el análisis de las deleciones secuenciales se complementen simultáneamente. Dichos proyectos complementarios se están llevando a cabo por Joselyn Luna y Oliver Sotelo estudiantes de maestría del mismo grupo de trabajo.

¿Cuál es la secuencia mínima inhibitoria en el extremo N-terminal de la subunidad  $\zeta$ ?

Deleciones secuenciales  
(4 aa por deleción)

Gilberto Garduño

Mutagénesis dirigida a  
residuos específicos

Joselyn Luna/Oliver Sotelo

# Objetivos

## Objetivo General

Determinar experimentalmente la longitud mínima de residuos del extremo amino terminal de la subunidad  $\zeta$  con los cuales dicha subunidad mantiene su capacidad de inhibir a la ATPasa de *P. denitrificans*.

## Objetivos particulares

- Realizar tres mutaciones al gen de la subunidad  $\zeta$  removiendo, desde el extremo amino terminal, 4, 8 y 12 aminoácidos respectivamente. ( $\zeta$  T2\_D5del,  $\zeta$  T2\_R9del y  $\zeta$  T2\_A13del respectivamente)
- Clonar estas mutantes en los plásmidos pJET (mantenimiento) y PT7-7 (sobre expresión)
- Purificar las proteínas recombinantes
- Obtener partículas sub-bacterianas (PSBs) de *P. denitrificans* (cepa Pd $\Delta\zeta$ )
- Realizar ensayos de reconstitución homóloga con las proteínas mutantes sobre PSBs  $\Delta\zeta$  para evaluar la capacidad inhibitoria de cada mutante.

# Materiales y Métodos

## Extracción de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se obtuvo mediante lisis alcalina. Para este protocolo se parte de un cultivo saturado de células crecidas en medio LB (1% de peptona, 1% extracto de levadura, 0.5% de NaCl en H<sub>2</sub>O destilada). 1.5mL de medio de cultivo se transfirieron a un tubo tipo Eppendorf y se centrifugó a 14,000rpm (16,873× g) por 1min. La pastilla se resuspendió en 200µl de solución I (glucosa 50mM, EDTA 10mM pH=8, Trizma-base 25mM) y se agregaron 3µl de RNAasa al 0.4µg/µl. Posteriormente se agregaron 200µl de solución II (NaOH 0.2N, SDS 1% en agua) y se mezcló agitando suavemente, se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Al terminar se adicionaron 200µl de solución III (60mL de acetato de potasio 5M + 40mL de ácido acético glacial), se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 15min, posteriormente, se centrifugó a 14,000rpm (16,873× g) por 15min y el sobrenadante se transfirió a un tubo tipo Eppendorf nuevo. Al sobrenadante limpio se le agregó 1mL de etanol absoluto y se mezcló agitando con la mano, se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó a 14,000rpm (16,873× g) por 10min. La pastilla se lavó con etanol al 70% y se volvió a centrifugar a la misma velocidad por 5min. La pastilla resultante se secó a temperatura ambiente por 5 min y se disolvió en 50µl de agua destilada estéril.

## Diseño de desoxioligonucleótidos para la amplificación del gen de la subunidad ζ mutante

Para el diseño de los desoxioligonucleótidos específicos para realizar mutagénesis dirigida, se partió de la secuencia del gen de la subunidad ζ de *P. denitrificans* depositada en la base de datos del NCBI como gene locus\_tag="Pden\_2862". A partir de esta secuencia se diseñaron tres desoxioligonucleótidos específicos que, al amplificar la secuencia del gen, generaran una delección de 12, 24 y 36 nucleótidos respectivamente. Cada una de estas mutaciones corresponden a

remover aproximadamente un giro de alfa hélice en el extremo amino de la subunidad ζ. Al diseñar los desoxioligonucleótidos se incluyeron secuencias para el reconocimiento de las enzimas de restricción BamHI y NdeI. En el laboratorio ya se contaba con el desoxioligonucleótido anti-sentido adecuado así que se cuidó que las temperaturas de alineamiento (T<sub>m</sub>) de los desoxioligonucleótidos fueran similares, además de procurar un contenido de G y C cercano al 50%.

#### ζ T2\_D5del, mutante con -12pb

	Secuencia	Pares de bases	T <sub>m</sub>	G y C
Desoxioligonucleótido Forward	3'CAT ATG GAC CGC GAG CGC GCG CAT GAG 5'	27	75°C	67%
Desoxioligonucleótido Reverse	3'GGA TCC TCA GAT CTC GCT GAT GAT CTG TTC G 5'	31	69	52%

#### ζT2\_R9del, mutante con -24pb

	Secuencia	Pares de bases	de T <sub>m</sub>	G y C
Desoxioligonucleótido Forward	3' CAT ATG GCG CAT GAG GC 5'	17	54°C	58.8%
Desoxioligonucleótido Reverse	3' GGT ACC GAG CTC TCA GAT CTC GCT GAT GAT CTG TTC GCG CGC 5'	42	78.2°C	59.5%

#### ζT2\_A13del, mutante con -36pb

	Secuencia	Pares de bases	T <sub>m</sub>	G y C
Desoxioligonucleótido Forward	3' CAT ATG AAA TTC GCC CAT GAT GCG GAA CTG 5'	30	68°C	47%

Desoxioligonucleótido 3'GGA TCC TCA GAT CTC GCT GAT 31 69°C 52%  
Reverse GAT CTG TTC G 5'

## Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de las secuencias mutantes de la subunidad  $\zeta$  se llevó a cabo por medio de PCR utilizando el ADN del plásmido de sobreexpresión de  $\zeta$  (pT7-7 +  $\zeta$  P. den w.t.) como ADN molde. Se emplearon las siguientes condiciones de reacción: 5 min de desnaturalización inicial a 95 °C, seguido de 35 ciclos con un tiempo de 20s de desnaturalización a 95 °C, 30s de hibridación (a 68°C en el caso de las mutantes  $\zeta$ T2\_D5del y a 57 °C para la mutante  $\zeta$ T2\_R9del) y 30s de extensión a 68°C. Por último, se llevó a cabo una extensión final de 30s a 68 °C. Se utilizaron las enzimas: polimerasa de alta fidelidad Vent (New England BioLabs, Estados Unidos) para la mutante  $\zeta$  T2\_D5del y PFU ADN polimerasa para la mutante  $\zeta$ T2\_R9del (BioBasic, Canadá). El producto de PCR se visualizó por una electroforesis a 85V durante 90min sobre un gel de agarosa al 1% disuelto en TBE y teñido con bromuro de etidio. Posteriormente, los productos de amplificación se extrajeron del gel utilizando el kit comercial QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN). En el caso de la mutante  $\zeta$ T2\_R9del la reacción de PCR produjo secuencias inespecíficas por lo cual se realizó un PCR al ADN extraído de la banda purificada del gel y se volvió a purificar una segunda vez de la misma manera.

## Transformación por choque térmico

Se utilizaron 200 $\mu$ l de células competentes y se agregaron 20 $\mu$ l de mezcla de ligación (o aproximadamente 200ng de ADN plasmídico). Las células se incubaron en hielo por 30 min, posteriormente a 42°C por 2min, y otra vez en hielo por 2 min. Posteriormente se agregó 1 mL de medio LB y se incubaron a 37°C por 1 hora, al término de la cual se plaquearon en cajas Petri con medio LB semi sólido (medio LB + 15g/L de agar bacteriológico) con el respectivo antibiótico para cada cepa, y

se incubaron a 37°C durante una noche. Por último, se seleccionaron colonias y se crecieron en medio líquido y en caja Petri.

## Clonación de las subunidades $\zeta$ mutantes de *P. denitrificans*

Los productos de PCR se subclonaron al vector pJET/Blunt 1.2, de acuerdo con el protocolo que provee el kit comercial CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). La mezcla de ligación se transformó mediante choque térmico en células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ . Posteriormente, se picaron colonias, se crecieron en 2mL de medio LB + Ampicilina (100 $\mu$ g/mL) y se incubaron a 37 °C por 24h.

Para comprobar que las colonias contaran con el plásmido y el inserto, se extrajo ADN plasmídico y se realizó análisis de restricción con las enzimas NdeI, BamHI, BglII y HindIII. El producto de la digestión se observó en un gel de agarosa al 1% disuelto en TBE y teñido con bromuro de etidio y se confirmó que las clonas poseían el inserto correcto.

Las colonias con el inserto correcto se crecieron en medio LB con ampicilina durante toda la noche y al día siguiente se extrajo ADN plasmídico por el método de lisis alcalina. El ADN plasmídico se incubó con las enzimas de restricción adecuadas y se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La banda correspondiente al inserto se purificó del gel utilizando el kit comercial QIAquick® Gel Extraction Kit (50) (QIAGEN). Dicha banda se ligó al vector de sobre expresión pT7-7 el cual fue previamente digerido con las mismas enzimas de restricción y purificado del gel de forma similar. Para la ligación al vector de sobre expresión se utilizó el protocolo que recomienda el proveedor de la ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific). La mezcla de ligación se transformó mediante choque térmico a células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ . Posteriormente, se picaron colonias, se crecieron en 2mL de medio LB + Ampicilina (100 $\mu$ g/mL) y se incubaron a 37 °C por 24h.

Para confirmar la ligación al vector pT7-7 se realizó un análisis de restricción de forma similar al efectuado para confirmar la ligación al vector pJET1.2.

El ADN plasmídico en donde el análisis de restricción señalaba un inserto correcto se envió a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, de la UNAM. Para la secuenciación, se aprovechó que tanto el plásmido pJET1.2 como el pT7-7 cuentan con una secuencia del promotor T7 antes del sitio de clonación múltiple y por lo tanto para secuenciar se indicó que se utilizara el desoxioligonucleótido genérico para esta secuencia.

## Pruebas de inducción con IPTG

En el caso donde la secuencia de ADN fue exactamente la deseada para las mutaciones requeridas, el ADN plasmídico se transformó mediante choque térmico a diferentes cepas de *E. coli* como: BL21 DE3 pLysS codón plus, OrigamiB pLysS, BL21 DE3 pLysS, BL21 codon plus (RIL), con el fin de conocer que cepa producía la mejor sobre expresión de proteína. Se picaron colonias y se crecieron en 2mL de medio LB + respectivo antibiótico de cada cepa y plásmido, al llegar a una densidad óptica adecuada (0.72D.O. a 600nm) se adicionó IPTG a una concentración final de 0.5mM y se permitió que sobre expresaran la proteína deseada durante 3h o durante toda la noche. Posterior a ese tiempo, 1mL de células se centrifugaron y el pellet se resuspendió en 100µl de H<sub>2</sub>O destilada. Una alícuota de 7.5µl de células resuspendidas se calentaron a 95 °C durante 10min en presencia de ditioneitol (DTT) y β-mercaptoetanol. Estas muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12 y 4% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) el cual se corrió a 120V durante 1:30h. El resultado se visualizó tiñendo con azul de Coomassie caliente durante 5min y destiñendo con solución desteñidora caliente las veces necesarias.

## Cuantificación de proteína por el método de Lowry-TCA

Para cuantificar proteína se utilizó el protocolo de Lowry (Lowry et al., 1951) previa precipitación con ácido tricloroacético. Para esto se parte de una solución de

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en agua (disolución A), la cual se mezcla con una solución de  $\text{CuSO}_4$  al 1%, Tartrato de Na y K al 2% en NaOH a 0.1N (disolución B). Estas soluciones se mezclan en proporción 50 A : 1 B (volumen : volumen). Se debe preparar además la solución de del reactivo de Folin, que consiste en 50% agua y 50% del reactivo de Folin & Ciocalteu's fenol (Sigma Aldrich Co.). Una vez listas las soluciones se realiza una curva patrón por triplicado empleando concentraciones crecientes de albúmina con un volumen total de 1mL. Las muestras se preparan también por triplicado y se llevan al mismo volumen final de 1mL. A todos los tubos se les agrega 100  $\mu\text{l}$  del detergente Desoxicolato al 15%, se mezcla e incuba por 10min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se añaden 100 $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético al 72%, se mezcla y se incuba en baño de hielo durante 10min. Posteriormente, se centrifugan los tubos a 14,000rpm (16,873x g) durante 15min y se elimina el sobrenadante. El precipitado se resuspende en 97.5 $\mu\text{l}$  de agua con 2.5  $\mu\text{l}$  de NaOH 2N. Posteriormente, se añaden a cada tubo 100 $\mu\text{l}$  de la disolución A:B (50:1), se mezcla y se incuba a temperatura ambiente por 10min, para después añadir 100  $\mu\text{l}$  de la solución de Folin con agua para volver a mezclar e incubar ahora durante 30 min a temperatura ambiente. Las muestras se leyeron a 600nm en un espectrofotómetro UV/Vis WPA Lightwave II (Biochrom). Por último, se construye una curva estándar con albumina sérica bovina, y las absorbancias de las muestras se interpolan para deducir su concentración.

## Cuantificación de proteína con ácido bicinonínico

Algunas muestras se cuantificaron utilizando ácido bicinonínico mediante el protocolo del fabricante (Sigma-Aldrich). La mezcla de reacción se preparó con ácido bicinonínico: sulfato de cobre pentahidratado 4% 50:1. Se realizó una curva con albumina sérica bovina desde 0 hasta 250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , y se prepararon diluciones de las muestras a cuantificar. En tubos tipo Eppendorf con 20 $\mu\text{l}$  de las muestras de la curva y muestras a cuantificar se agregaron 400 $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción, se agitó brevemente y se incubó a 60 °C por 30min. Posteriormente, se dejaron enfriar y se leyó la absorbancia de las muestras a 562 nm con un espectrofotómetro UV/Vis

WPA Lightwave II (Biochrom). Con las absorbancias y las cantidades de albúmina se construyó una curva en donde se interpolaron las muestras problemas para conocer su concentración de proteína.

## Purificación de la subunidad $\zeta$ silvestre (recombinante) de *P. denitrificans*

En el laboratorio se contaba con la construcción de la subunidad  $\zeta$  de *P. denitrificans* previamente clonada en el plásmido de sobre expresión pT7-7 (Tabor & Richardson, 1985). Además, se contaba con células de *E. coli* BL21 (DE3) pLys S codon plus transformadas con dicho plásmido. Estas células se crecieron en 6L de medio LB + Amp (100 $\mu$ g/mL) y se indujo la expresión del gen de interés con 0.5mM de IPTG toda la noche. Posteriormente se colectaron mediante centrifugación a 6000rpm (6441x g). Las células se resuspendieron en amortiguador Bz\* (20 mM de fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH 7, 1mM de EDTA y 1mM de PMSF) y se lisaron mediante sonicación (12 veces de 30 s intercaladas con 1min de intervalo de descanso). El ADN se removió añadiendo una pizca de DNasa y MgCl<sub>2</sub> 10 mM y se centrifugó 15min a 12,000rpm (17211x g) para eliminar la fracción membranal. El sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio al 50% (314 mg/mL de muestra) y se centrifugó a 12,000rpm (17211x g) durante 15min a 4 °C. Al sobrenadante se añadió sulfato de amonio para llegar a 80 % (210mg/mL de muestra), y se repitió el proceso de centrifugación. El precipitado se recolectó y resuspendió en un volumen mínimo de amortiguador Bz. Se realizó una diálisis con una membrana de poro de 3kDa para eliminar el sulfato de amonio de la muestra con un cambio de amortiguador. Una vez desalada la muestra, se utilizó una columna de intercambio iónico de sefarosa dietilaminoetil (DEAE) (Pharmacia Biotech) de la cual se eluyó la proteína utilizando un gradiente discontinuo de fosfato monobásico de potasio (100 a 500mM). Las fracciones se

---

\* En este proyecto se emplea el nombre Bz para dicho amortiguador con el fin de evitar confusiones con el amortiguador B empleado en la obtención de PSBs

visualizaron en un gel SDS-PAGE al 12 y 4% teñido con azul de Coomassie a partir de este gel seleccionaron distintas fracciones que contenían la proteína de interés y se concentran mediante filtros Amicon de poro de 3kDa. Posteriormente se empleó una columna de exclusión molecular Superdex 75 (GE Healthcare). Las fracciones resultantes de la columna Superdex 75, se colectaron y se realizó un gel SDS-PAGE 12 y 4% para analizarlas y seleccionarlas. Las fracciones elegidas se concentraron utilizando filtros Amicon de 30kDa y 3kDa, se visualizó en un SDS-PAGE 12 y 4% y por último se realizó la cuantificación de proteína por el método de Lowry-TCA.

## Purificación de la subunidad $\zeta$ T2\_D5del (-4aa) de *P. denitrificans*

Se purificaron 2 lotes diferentes de proteína, en ambos se utilizaron células *E. coli* OrigamiB pLysS transformadas mediante choque térmico con el plásmido pT7-7 +  $\zeta$ T2D5del (plásmido de sobre expresión con la  $\zeta$  mutante). Estas células se crecieron en medio LB + Amp, KAN, y CAM, 4L en total, y se indujo la expresión de los genes de interés con 0.5mM de IPTG toda la noche. Además, se agregó Rifampicina (0.25 $\mu$ g/mL) después de 2h de agregar el IPTG. Las células se colectaron el día siguiente mediante centrifugación a 6000rpm (6441x g) y se resuspendieron en amortiguador Bz (20mM de fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (pH 7), 1mM de EDTA y 1mM de PMSF) y se lisaron mediante sonicación (12 veces de 30 seg intercaladas con 1min de intervalo de descanso). El ADN se removió añadiendo una pizca de DNAsa y MgCl<sub>2</sub> 10mM y se centrifugó 15min a 12,000rpm (17211x g) para eliminar la fracción membranal. El sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio al 50% (314 mg/mL de muestra) y se centrifugó a 12,000rpm (17211x g) durante 15min a 4 °C. Al sobrenadante se añadió sulfato de amonio para llegar a 80% (210mg/mL de muestra), y se repitió el proceso de centrifugación. El precipitado se recolectó y resuspendió en amortiguador Bz. Se realizó una diálisis con una membrana de poro de 3.5 kDa para eliminar el sulfato de amonio de la muestra. Una vez desalada la muestra, se

cargó en una columna de intercambio iónico de sefarosa dietilaminoetil (DEAE) (Pharmacia Biotech) de la cual se eluyó la proteína utilizando un gradiente discontinuo de fosfato monobásico de potasio (100 a 500mM). Las fracciones se visualizaron en un gel SDS-PAGE al 12 y 4% teñido con azul de Coomassie y se seleccionaron distintas fracciones que contenían la proteína de interés. Las fracciones se concentraron mediante filtros Amicon de poro de 3kDa. El primer lote de proteína se pasó una segunda vez por una columna nueva de DEAE (posiblemente la primera columna estaba fracturada o demasiado vieja) y las fracciones seleccionadas se concentraron y guardaron. El segundo lote siguió el protocolo normal y después de la columna de intercambio iónico se empleó una columna de exclusión molecular Superdex 75 (GE Healthcare). Las fracciones resultantes de la columna Superdex 75 se colectaron y se realizó un gel SDS-PAGE al 12 y 4% para analizarlas y seleccionarlas. Las fracciones elegidas se concentraron utilizando filtros Amicon de 30kDa y 3 kDa, se cuantificó la proteína por Lowry-TCA y ácido bicinconínico y se visualizó en un gel SDS-PAGE.

## Purificación de la subunidad $\zeta$ T2\_R9del (-8aa) de *P. denitrificans*

El primer lote de proteína se obtuvo utilizando células *E. coli* BL21 (DE3) pLysS codón plus y el segundo lote con células *E. coli* OrigamiB pLysS. Dichas células se transformaron mediante choque térmico con el plásmido pT7-7 +  $\zeta$ T2\_R9del (plásmido de sobre expresión con la  $\zeta$  mutante). Estas células se crecieron en medio LB + Amp (*E. coli* BL21 DE3 pLysS codón plus, 5L en total) y LB + Amp, KAN, y CAM (OrigamiB pLysS 8L en total) y se indujo la expresión de los genes correspondientes con 0.5mM de IPTG toda la noche. Además, se agregó Rifampicina (0.25 $\mu$ g/mL) después de 2h de agregar el IPTG. El día siguiente las células se colectaron mediante centrifugación a 6000rpm (6441x g) y se resuspendieron en amortiguador Bz (20mM de fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (pH 7), 1mM de EDTA y 1mM de PMSF) y se lisaron mediante sonicación (12 veces de 30 seg intercaladas con 1min de intervalo de descanso).

El ADN se removió añadiendo una pizca de DNAsa y  $MgCl_2$  10 mM y se centrifugó 15 min a 12,000rpm (17211x g) para eliminar la fracción membranal. El sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio al 50% (314mg/mL de muestra) y se centrifugó a 12,000rpm (17211x g) durante 15mins a 4 °C. Al sobrenadante se añadió sulfato de amonio para llegar a 80% (210 mg/mL de muestra), y se repitió el proceso de centrifugación. El precipitado se recolectó y resuspendió en amortiguador Bz. Se realizó una diálisis con una membrana de poro de 3kDa para eliminar el sulfato de amonio de la muestra. Una vez desalada la muestra, se utilizó una columna de intercambio iónico de DEAE sefarosa (Pharmacia Biotech) y se eluyó la proteína utilizando un gradiente discontinuo de fosfato monobásico de potasio (100 a 500 mM). Las fracciones se visualizaron y seleccionaron en un gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. Las fracciones se concentran mediante amicones de poro de 3kDa. Posteriormente se empleó una columna de exclusión molecular Superdex 75 (GE Healthcare) y las fracciones resultantes de la columna Superdex 75 se colectaron y se realizó un gel SDS-PAGE al 12 y 4% para analizarlas y seleccionarlas. Para el primer lote de proteína se utilizó además una columna de afinidad “Blue sepharose CL-6B” y se eluyó con 5mM de ADP. Para el segundo lote de proteína solo se emplearon las columnas de intercambio iónico y exclusión molecular. Las fracciones elegidas se concentraron utilizando amicones de 30kDa y 3kDa, se cuantificó la proteína por Lowry-TCA y ácido bicinonínico y se visualizó en un gel SDS-PAGE al 12 y 4%.

## Electroforesis en geles de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se siguió el protocolo de Schagger y VonJagow (Schägger, 2006) para preparar los geles y llevar a cabo la electroforesis. Los geles se corrieron a voltaje de 120V hasta 160V dependiendo de cada gel, y se prepararon al 12% (gel separador) y 4% (gel concentrador) con vidrios separadores de 0.75mm y 1mm según fuera el caso.

## Inmunorréplica tipo Western blot

Para realizar los experimentos de inmunorréplica tipo westerns blot, previamente se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes como se describe en el párrafo anterior, pero con marcadores de peso molecular “Precision Plus Protein WesternC Blotting Standards ®” (Bio-Rad) y/o “Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standards ®” (Bio-Rad). Posteriormente, el gel se incubó en amortiguador Towbin (25mM de Tris, 192mM de glicina, metanol al 20%, con pH=8.3) durante 30min. Mientras tanto se cortó una membrana de PVDF con poros de 0.22 $\mu$ M inobilon P-SQ (Milipore) con las dimensiones similares al gel SDS-PAGE. La membrana de PVDF se incubó en metanol grado HPLC durante 15 min y posteriormente en amortiguador Towbin 30min. Al terminar las incubaciones del gel y la membrana de PVDF, se realizó una transferencia Semi-Seca utilizando el equipo “Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell” (Bio-Rad), se siguieron las instrucciones del fabricante y se aplicaron 12V durante 15-19min. La membrana de PVDF con las proteínas ya unidas se incubó en agitación suave a 4°C toda una noche en una solución al 5% de leche en polvo Svelty (Nestlé, Vevey, Suecia) en amortiguador TPBS (136mM de NaCl, 2.68mM de KCl, 10mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, y 0.1% Tween20) con el fin de inactivar la membrana. Al día siguiente la membrana se enjuagó con amortiguador TPBS 3 veces y se incubó con el anticuerpo primario (suero inmune anti- $\zeta$ , obtenido previamente por colegas del laboratorio del Dr. José de Jesús García Trejo, o con anticuerpo anti-subunidad  $\beta$  de la ATP sintasa) durante 2h a 4 °C en agitación suave. El anticuerpo primario se utilizó en una proporción 1:60,000 anticuerpo:solución, y se aplicó en una solución de leche en polvo Svelty al 2.5% en amortiguador TPBS. Al mismo tiempo se agregó 1 $\mu$ l de Streptactina conjugada con HRP (peroxidasa de rábano) (Bio-Rad) por cada 100mL de solución. Posterior a las 2h de incubación con el anticuerpo primario, la membrana se enjuagó 3 veces con TPBS y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 2h a 4°C con agitación suave, para el caso de  $\zeta$  se utilizó un anticuerpo secundario “anti-conejo” y para el caso de  $\beta$  “anti-raton”. Posteriormente la membrana se

enjuagó con PBS (amortiguador TPBS sin Tween20) 3 veces. La membrana enjuagada se reveló con los reactivos de revelado “Inmobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)”, se dejó reposar 3min y se retiró el excedente de líquido y se capturaron imágenes a diferentes tiempos de exposición utilizando el equipo MICROCHEMI (DNR Bio-Imaging Systems).

## Obtención de partículas sub-bacterianas (PSBs)

La mayor parte de los experimentos con PSBs se llevaron a cabo con PSBs carentes de subunidad  $\zeta$ , para esto se empleó una cepa de *P. denitrificans* a la cual se le eliminó con técnicas de biología molecular el gen que codifica para dicha subunidad (Mendoza-Hoffmann et al., 2018), estas partículas se denominan en este trabajo como PSBs  $\Delta\zeta$ . Para la obtención de PSBs, se crecieron 10L de la cepa de *P. denitrificans*  $\Delta\zeta$ , en medio succinato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  75mM,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  11.5 mM,  $\text{MgCl}_2$  1.25mM, ácido cítrico 1mM, ácido succínico 10g/L, a esto se agrega 1mL/L de un stock de sales que consiste en:  $\text{CaCl}_2$  100mM,  $\text{FeCl}_2$  90mM,  $\text{MnCl}_2$  50mM,  $\text{ZnCl}_2$  25mM,  $\text{CoCl}_2$  10mM,  $\text{CuCl}_2$  5mM,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  5mM,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  10 mM en HCl diluido 1:1 pH final del medio= 6.2). Se utilizó kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y rifampicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubaron a 37 °C, por 2 días, con agitación de 180rpm. Después de 2 días, cuando se alcanzó una densidad óptica de 1.5 (medida a 600nm), las células se colectaron a 6000rpm (6441x g) durante 15min. Posteriormente las células sedimentadas se lavaron con amortiguador A ( $\text{NaCl}$  50mM, Tris-HCl 10mM pH=7.5) y se volvieron a centrifugar con el método anterior. La pastilla de células se guardó a -70°C, por una noche. Posteriormente se resuspendió en aproximadamente 800mL de amortiguador B (sacarosa 0.5M, Tris-HCl 10mM) y se añadió EDTA (5mM concentración final), y lisozima 330 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para remover la pared celular y obtener esferoplastos. Se incubó con agitación suave a 37°C por 3 h. Posteriormente se centrifugó a 10,000rpm (17888x g) por 20min y la pastilla de esferoplastos se resuspendió en 45mL de amortiguador C (pH=7.5, Tris-acetato 0.1M, ATP 10Mm) y se añadieron 405mL de amortiguador D (benzamidina 5mM y PMSF 1mM) por lo cual se tiene una solución hipotónica (0.01M de Tris-acetato) que provoca un choque osmótico y

rompe la membrana celular. Se incubó 20 min con agitación hasta homogeneizar y se añadió DNAasa (la punta de una espátula) y  $MgSO_4$  0.6mM y se incubó a 30 °C hasta que se perdió la viscosidad. Posteriormente se centrifugó a 12,000rpm (17211x g) por 1h y el sedimento de membranas se resuspendió en 45mL de amortiguador A+ (glicerol 10%, sacarosa 50mM, Tris-HCl 20mM, EDTA 1mM, ATP 2mM, PMSF 1mM, benzamidina 5mM y 4 tabletas de Complete (coctel de inhibidores de proteasas)/litro). Para continuar con la obtención de PSBs las membranas se sonicaron en baño de hielo 10 veces por 10s con 45s de descanso entre cada sonicación y se centrifugaron a 13,000rpm (20199x g) por 20min. El sobrenadante se separó y se guardó y el sedimento se resuspendió en 45 mL de amortiguador A+ y se procedió a sonicar y centrifugar de la misma forma. Los dos sobrenadantes obtenidos se colectaron y se centrifugaron a 45,000rpm (144000x g) por 1h. Por último, el sedimento se resuspendió en aproximadamente 3mL de amortiguador A+ y se guardó a -70°C.

## Actividad de hidrólisis de ATP en medio regenerante

La actividad de hidrólisis de ATP se midió siguiendo el protocolo reportado por Pullman (Pullman et al., 1960). En este método, se emplea la enzima piruvato cinasa que toma el ADP que se forma en la hidrólisis de ATP por la ATP sintasa, y lo emplea para formar piruvato y ATP, por lo que la concentración de ATP permanece constante por un tiempo determinado. A su vez, se emplea la enzima lactato deshidrogenasa para tomar el piruvato y producir lactato, lo cual conlleva la oxidación del NADH, que se puede seguir espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 340nm. Por lo tanto, mientras el sistema se mantenga en estado estacionario la cantidad de ATP hidrolizado es directamente proporcional a la cantidad de NADH que se consume. La mezcla de reacción está formada por: Sacarosa 250mM, Tris-acetato 50mM, Mg-acetato 3mM, K-acetato 30mM, fosfoenolpiruvato 1.5mM, ATP 3mM, NADH ~200µM, piruvato cinasa 4 unidades, lactato deshidrogenasa 4 unidades, pH=8.0. Opcionalmente y según cada experimento, se agregó óxido de laurildimetilamina (LDAO) 0.15%, rotenona 1-2 µg/mL, KCN 5mM, y en algunas mediciones se utilizó sulfito 1.5mM. Las PSBs

(50µg) se pre-incubaron a temperatura ambiente por 30min, con diferentes concentraciones de subunidad ζ silvestre o ζ mutante, en 50µl amortiguador de reconstitución (sacarosa 250mM, Tris 20mM) al cual se agregó 1mM de ATP. Al término de la pre-incubación la reacción se inició al agregar los 50µl de PSBs a 950µl de mezcla de reacción en una celda de plástico desechable. La absorbancia del NADH a 340nm se siguió en el espectrofotómetro UV/Vis 8453 Agilent. El software del equipo calcula la pendiente automáticamente y la velocidad de la reacción se reporta en unidades de absorbancia por min (AU/min). La actividad específica de hidrólisis de ATP en unidades de µmol/min\*mg se calculó de la siguiente manera:

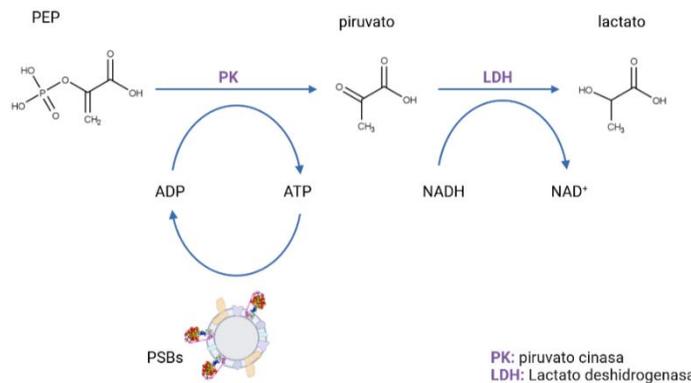
$$Abs = \epsilon l [ ]$$

$$\frac{[ ]}{min} = \frac{Abs}{min} \frac{1}{\epsilon l}$$

$$Actividad\ especifica = \left( \frac{Abs}{min} \frac{1}{\epsilon l} \right) \left( \frac{ml\ reacción}{1} \right) \left( \frac{1}{mg\ Proteina} \right)$$

$$Actividad\ especifica \frac{\mu mol}{min\ mg} = \left( \frac{Abs}{min} \frac{1\mu mol\ cm}{6.22ml} \frac{1}{cm} \right) \left( \frac{1ml}{1} \right) \left( \frac{1}{0.05mg} \right)$$

$$\epsilon = coeficiente\ de\ extincion\ molar\ del\ NADH\ a\ 340\ nm = 6.22\mu mol\ cm\ ml^{-1}$$

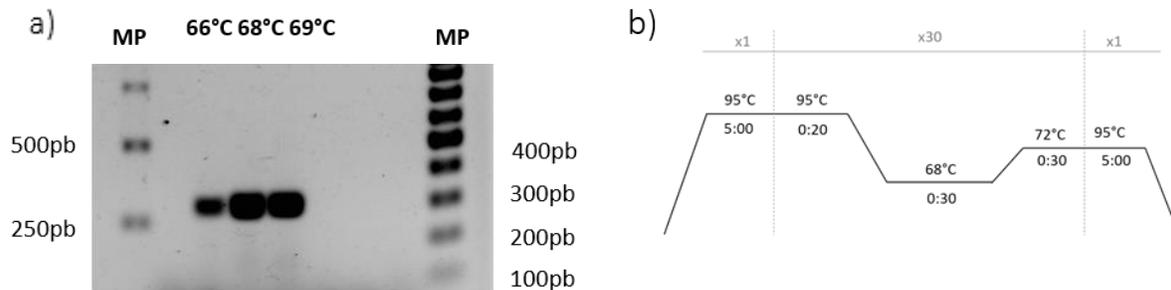


# Resultados

## La mutagénesis de la subunidad $\zeta$ se consiguió mediante PCR

Para llevar a cabo las mutaciones deseadas se llevaron a cabo varias reacciones de PCR con los desoxioligonucleótidos adecuados para eliminar ya sea 12 o 24 pares de bases después del codón de inicio del gen de la subunidad  $\zeta$ . Se probaron diversas temperaturas de alineamiento para encontrar las condiciones ideales de amplificación de cada mutante y los resultados se visualizaron en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio (ver figuras 19 y 20). En el caso de la mutación  $\zeta$ T2\_D5del (-4aa) la temperatura óptima para la amplificación fue de 68°C.

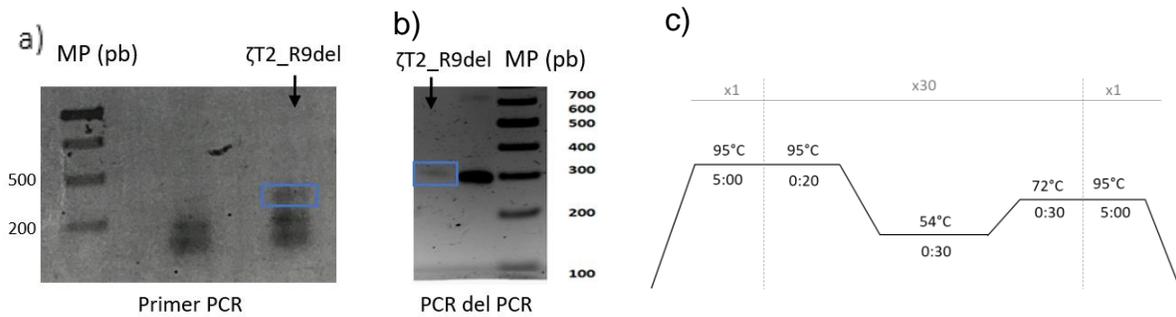
### PCR $\zeta$ T2\_D5del (-4aa)



**Fig. 19** Amplificación exitosa del gen de la subunidad  $\zeta$ T2\_D5del (-4aa)

a) Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, en donde se observan los productos de amplificación de la mutante ZT2\_D5del a diferentes temperaturas, se seleccionó la amplificación a 68°C. b) Condiciones del termociclador para realizar el PCR.

## PCR $\zeta$ T2\_R9del (-8aa)



**Fig. 20** Amplificación exitosa del gen de la subunidad  $\zeta$ T2\_R9del (-8aa)

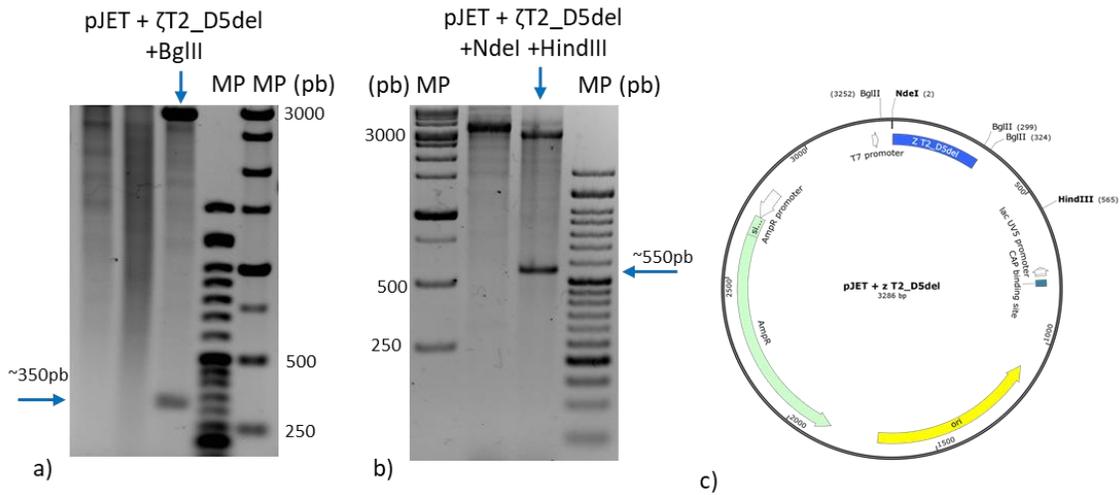
a) y b) Geles de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, en donde se observan los productos de amplificación de la mutante ZT2\_R9del. Los rectángulos azules indican el fragmento de interés, en b) se muestra el producto de amplificación ya purificado que fue el resultado de una segunda PCR utilizando como molde el fragmento recortado del gel anterior.  
c) Condiciones del termociclador para realizar las PCRs.

Gracias a los resultados obtenidos a partir de las primeras 2 mutantes ( $\zeta$ T2\_D5del (-4aa) y  $\zeta$ T2\_R9del (-8aa)) no fue necesario realizar la tercera mutante planificada ( $\zeta$ T2\_A13del (-12aa)) por lo cual no se llevó a cabo PCR, ni la subsiguiente clonación y purificación de dicha mutante. Esto se ahonda en la sección de discusión.

## Clonación a pJET1.2/Blunt (plásmido de mantenimiento) y pT7-7 (plásmido de sobre expresión)

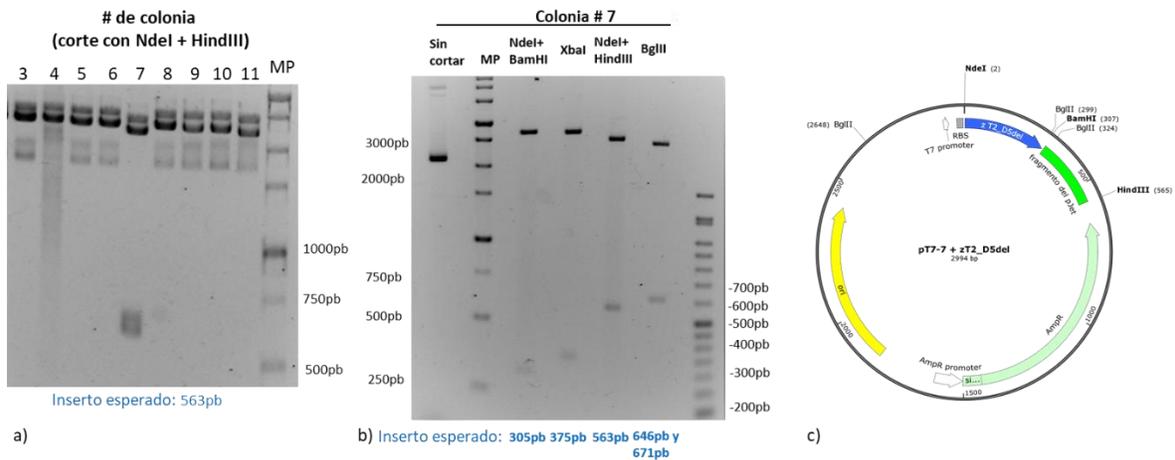
Los productos de amplificación se purificaron a partir de un gel de agarosa y se ligaron primero al vector de mantenimiento pJET1.2/Blunt y posteriormente al vector de sobre expresión pT7-7. El ADN plasmídico de las colonias transformantes se analizó utilizando enzimas de restricción para verificar la presencia del inserto y plásmido. El pJET es un plásmido de mantenimiento que nos permitió conservar las construcciones de la  $\zeta$  mutante para futuros proyectos. Para subclonar desde pJET1.2/Blunt a pT7-7, el pJET + inserto se digirió con las enzimas de restricción NdeI y HindIII, a su vez el pT7-7 vacío se digirió con las mismas enzimas. Posteriormente se ligaron el inserto y el pT7-7 para lograr tener un plásmido de sobreexpresión con el gen de  $\zeta$  mutante. (Ver figuras 21-24)

## Clonación de $\zeta$ T2\_D5del (-4aa) a pJET y pT7-7



**Fig. 21** Clonación de  $\zeta$ T2\_D5del (-4aa) a pJET

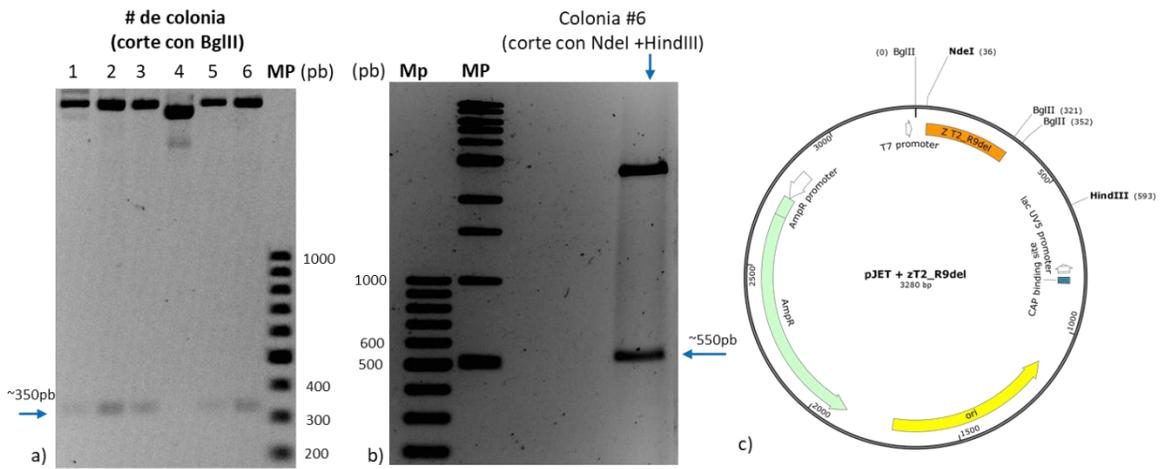
a) y b) Geles de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, en donde se observa el resultado de la digestión del ADN plasmídico de una de las colonias transformantes con diferentes enzimas de restricción. Las flechas azules señalan el inserto esperado, en a) se cortó con BglIII y se esperaba un inserto de aproximadamente 350pb y en b) se cortó NdeI y HindIII y se esperaba un inserto de 550pb. c) Mapa del plásmido pJET +  $\zeta$ T2\_D5del.



**Fig. 22** Clonación de  $\zeta$ T2\_D5del (-4aa) a pT7-7

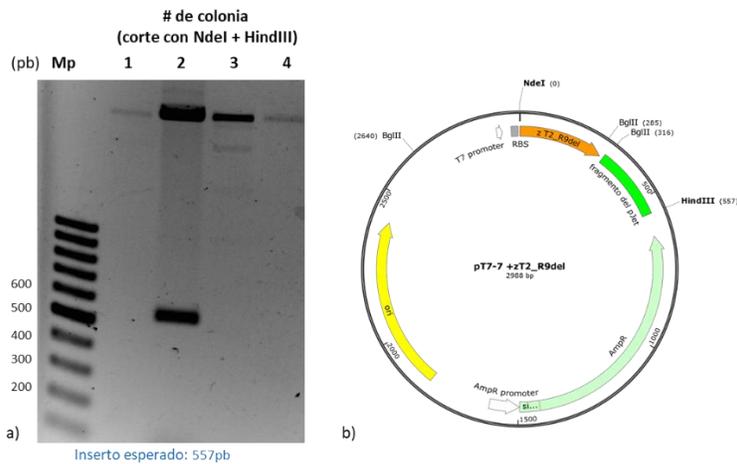
a) Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, en donde se observa el resultado de la digestión del ADN plasmídico de diferentes colonias transformantes con NdeI y HindIII. Solo en la colonia 7 se observó inserto. b) Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio donde se aprecia el resultado del análisis de restricción de la colonia 7 con diversas enzimas de restricción. Todos los fragmentos corresponden a lo esperado c) Mapa del plásmido pT7-7 +  $\zeta$ T2\_D5del.

## Clonación de $\zeta$ T2\_R9del (-8aa) a pJET y pT7-7



**Fig. 23.** Clonación de  $\zeta$ T2\_R9del (-8aa) a pJET

a) y b) Geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. En a) se observa el resultado de la digestión del ADN plasmídico de diferentes colonias transformantes con BglIII, todas las colonias excepto la 4 muestran el inserto esperado (~350pb). b) ADN plasmídico de la colonia #6 cortado con NdeI y HindIII, se observa un fragmento del tamaño esperado (~550pb). c) Mapa del plásmido pJET +  $\zeta$ T2\_R9del.



**Fig. 24** Clonación de  $\zeta$ T2\_R9del (-8aa) a pT7-7

a) Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, en donde se observa el resultado de la digestión del ADN plasmídico de diferentes colonias transformantes con NdeI y HindIII. Solo en la colonia 2 se observó un fragmento del tamaño esperado. b) Mapa del plásmido pT7-7 +  $\zeta$ T2\_R9del.

## La presencia de las mutaciones deseadas se confirmó por secuenciación

Con el fin de asegurar que las construcciones de la subunidad ζ mutantes fueran idénticas en secuencia a lo que se esperaba, el ADN plasmídico se envió a secuenciar a la unidad de biología molecular en el Instituto de Fisiología Celular, en Ciudad Universitaria. Para las muestras enviadas se utilizó secuenciación capilar y se empleó el desoxioligonucleótido genérico para el promotor T7, el cual se encuentra río abajo del inserto en ambos plásmidos. Ambas secuencias resultaron ser correctas en el 100% de su identidad con respecto a lo planeado. (Figuras 25 y 26).

### I. Secuenciación de ζT2\_D5del (-4aa)

Secuencia recibida, en color azul la sección que corresponde al gen de ζT2\_D5del

```

NNNNNNNCGGAtGGCTCGAGTTTTTTCAGCAAGATCATATGGACCGCGAGCGCGCATGAGGCGAAATTCGCCCATGATGC
GGAActGAACTTCAAGGCCGAGGCGCGGCGCAATCGCCTGCTGGGCGAATGGGCGGCCGGCCTGCTGGGCAAGACGGGCGA
CGATGCCCGCGCCTATGCGCTGACCGTGGTCACCTCGGATTTTCGACGAGCCGGGCGACGAGGACGTGTTCCGCAAGCTGGC
GGCCGACCTGGAAGGCAAGGCCGACGAGGAAACCATCCGCGCAAGATGGTTCGAGCTGCGGCCACCGCGCGCAACAGAT
CATCAGCGAGATCTGAGGATCCATCTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGAAAATCGATGTTCTTCT
TTTTATCTCTCAAGATTTTCAGGCTGTATATTAACCTTATATTAAGAACTATGCTAACACCTCATCAGGAACCGTTGTA
GGTGGCGTGGGTTTTCTTGGCAATCGACTCTCATGAAAACCTACGAGCTAAATATTTCAATATGTTCCCTCTTGACCAACTTTA
TTCTGCATTTTTTTTTGAACGAGGTTTAGAGCAAGCTTCAGGAAACTGAGACAGGAATTTTATTAATAAATTTAAATTTTGAA
GAAAGTTCAGGGTTAATAGCATCCATTTTTTGTCTTTCAGAGTTCCCTCAGCATTCTTAACAAAAGACGTCTCTTTTGACATG
TTTAAAGTTTAAACCTCCTGTGTGAAATTTATATCCGCTCATAATTTCCACACATTATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA
AGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCAATTGCTTTCAGTCGGGAAACCT
GTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTGCATTTGGGCGCTCTCCGCTTCTCCG
TCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGCTGNNNCNGCGGNNTCANNNACTTCAAAGGCGGTAANAACGNNNNN
    
```

### Alineamiento de la secuencia recibida contra la secuencia

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
555 bits(300)	2e-153	300/300(100%)	0/300(0%)	Plus/Plus
Query 4	GACCGCGAGCGCGCATGAGGCGAAATTCGCCCATGATGCGGAACTGAACTTCAAGGCC	63		
Sbjct 29151	GACCGCGAGCGCGCATGAGGCGAAATTCGCCCATGATGCGGAACTGAACTTCAAGGCC	29210		
Query 64	GAGGCGCGGCGCAATCGCCTGCTGGGCGAATGGGCGGCCGGCCTGCTGGGCAAGACGGGC	123		
Sbjct 29211	GAGGCGCGGCGCAATCGCCTGCTGGGCGAATGGGCGGCCGGCCTGCTGGGCAAGACGGGC	29270		
Query 124	GACGATGCCCGCGCCTATGCGCTGACCGTGGTCACCTCGGATTTTCGACGAGCCGGGCGAC	183		
Sbjct 29271	GACGATGCCCGCGCCTATGCGCTGACCGTGGTCACCTCGGATTTTCGACGAGCCGGGCGAC	29330		
Query 184	GAGGACGTGTTCCGCAAGCTGGCGCGGACCTGGAAGGCAAGGCCGACGAGGAAACCATC	243		
Sbjct 29331	GAGGACGTGTTCCGCAAGCTGGCGCGGACCTGGAAGGCAAGGCCGACGAGGAAACCATC	29390		
Query 244	CGCGCCAAGATGGTCGAGCTGCGCGCACCGCGCGCAACAGATCATCAGCGAGATCTGA	303		
Sbjct 29391	CGCGCCAAGATGGTCGAGCTGCGCGCACCGCGCGCAACAGATCATCAGCGAGATCTGA	29450		

Fig. 25 La secuencia de ADN de la subunidad ζT2\_D5del es correcta. Comparación de la secuencia recibida contra la secuencia teórica. Se utilizó la herramienta BLAST del NCBI, todas las bases coinciden con lo esperado.



## II. Secuenciación de ζT2\_R9del (-8AA)

Secuencia recibida, en color azul la sección que corresponde al gen de ζT2\_R9del

```

NNNNNANNNTcNgNAtNNTTTTGTTTACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCGCATGAGGCGAAATTCGCC
ATGATGCGGAACTGAACTTCAAGGCCGAGGCGCGGCGCAATCGCCTGCTGGGCGAATGGGCGGCCGGCCTGCT
GGGCAAGACGGGCGACGATGCCCGCGCCTATGCGCTGACCGTGGTCACCTCGGATTTTCGACGAGCCGGGCGAC
GAGGACGTGTTCCGCAAGCTGGCGGCCGACCTGGAAGGCAAGGCCGACGAGGAAACCATCCGCGCCAAGATGG
TCGAGCTGCGCGCCACCGCGCGCAACAGATCATCAGCGAGATCTGAGAGCTCGGTACCATCTTTCTAGAAGA
TCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAATAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGGCTGTA
TATTAAACTTATATTAAGAACTATGCTAACACCTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTGG
CAATCGACTCTCATGAAAACCTACGAGCTAAATATTCAATATGTTCTCTTGACCAACTTTATTCTGCATTTTT
TTTGAACGAGGTTTAGAGCAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTAAATCAATCTAAAGTATA
TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTC
GTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAG
TGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGG
GCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCagCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAG
AGTAAGTAGTTCCGCGAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCAATTGCTACAGGCATCGNNNGTCACGCCTC
GTCGTTTTGGNAATGGGCTTCNTTCAGCENN
  
```

Alineamiento de la secuencia recibida contra la secuencia esperada

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
538 bits(291)	6e-158	291/291(100%)	0/291(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGCGCATGAGGCGAAATTCGCCCATGATGCGGAACTGAACTTCAAGGCCGAGGCGCGG	60		
Sbjct 1	ATGGCGCATGAGGCGAAATTCGCCCATGATGCGGAACTGAACTTCAAGGCCGAGGCGCGG	60		
Query 61	CGCAATCGCCTGCTGGGCGAATGGGCGGCCGCTGCTGGGCAAGACGGGCGACGATGCC	120		
Sbjct 61	CGCAATCGCCTGCTGGGCGAATGGGCGGCCGCTGCTGGGCAAGACGGGCGACGATGCC	120		
Query 121	CGCGCCTATGCGCTGACCGTGGTCACCTCGGATTTTCGACGAGCCGGGCGACGAGGACGTG	180		
Sbjct 121	CGCGCCTATGCGCTGACCGTGGTCACCTCGGATTTTCGACGAGCCGGGCGACGAGGACGTG	180		
Query 181	TTCCGCAAGCTGGCGGCCGACCTGGAAGGCAAGGCCGACGAGGAAACCATCCGCGCCAAG	240		
Sbjct 181	TTCCGCAAGCTGGCGGCCGACCTGGAAGGCAAGGCCGACGAGGAAACCATCCGCGCCAAG	240		
Query 241	ATGGTCGAGCTGCGCGCCACCGCGCGCAACAGATCATCAGCGAGATCTGA	291		
Sbjct 241	ATGGTCGAGCTGCGCGCCACCGCGCGCAACAGATCATCAGCGAGATCTGA	291		

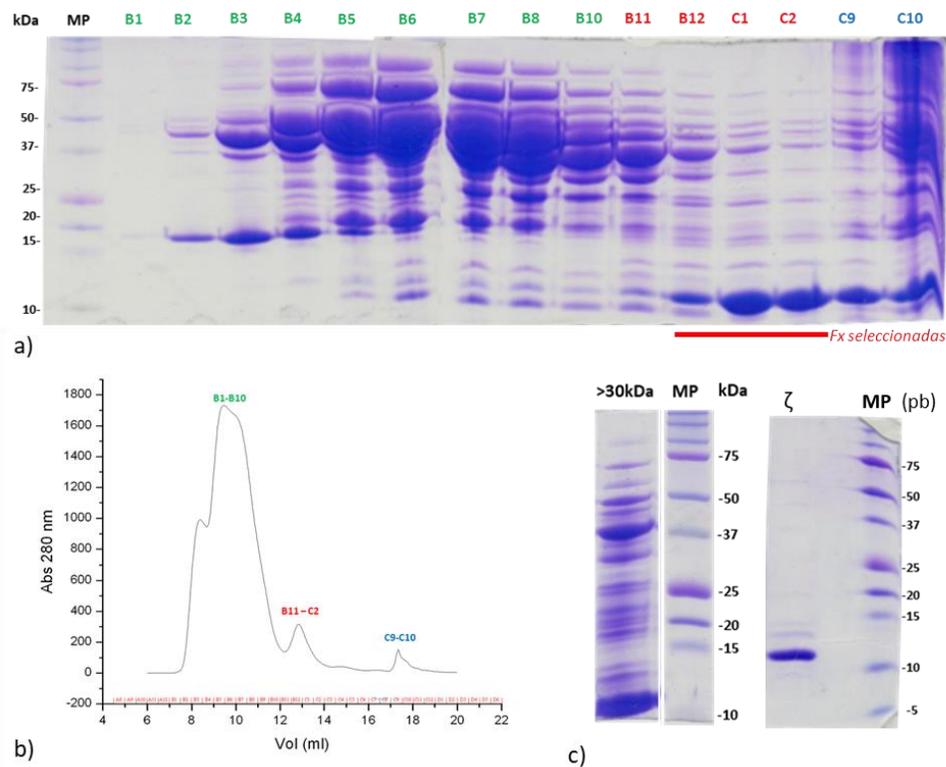
Fig. 26 La secuencia de ADN de la subunidad ζT2\_R9del es correcta. Comparación de la secuencia recibida contra la secuencia teórica. Se utilizó la herramienta BLAST todas las bases coinciden con lo esperado.



# Purificación de la subunidad $\zeta$ silvestre y mutantes

## Subunidad $\zeta$ silvestre de *P. denitrificans*

Para purificar esta proteína se empleó el plásmido pT7-7 +  $\zeta$  silvestre construido previamente en el laboratorio del Dr. García Trejo, el cual se transformó en células *E. coli* BL21 DE3 pLysS codon plus. La proteína se sobre expresó y purificó como se detalla en la sección de Materiales y Métodos (columna de intercambio iónico, seguida de exclusión molecular y filtros Amicon), como se aprecia en la figura 27. Al finalizar el proceso de purificación se realizó una cuantificación por el método de Lowry-TCA y se estimó la concentración de la proteína pura en 1.92 $\mu$ g/ $\mu$ l.

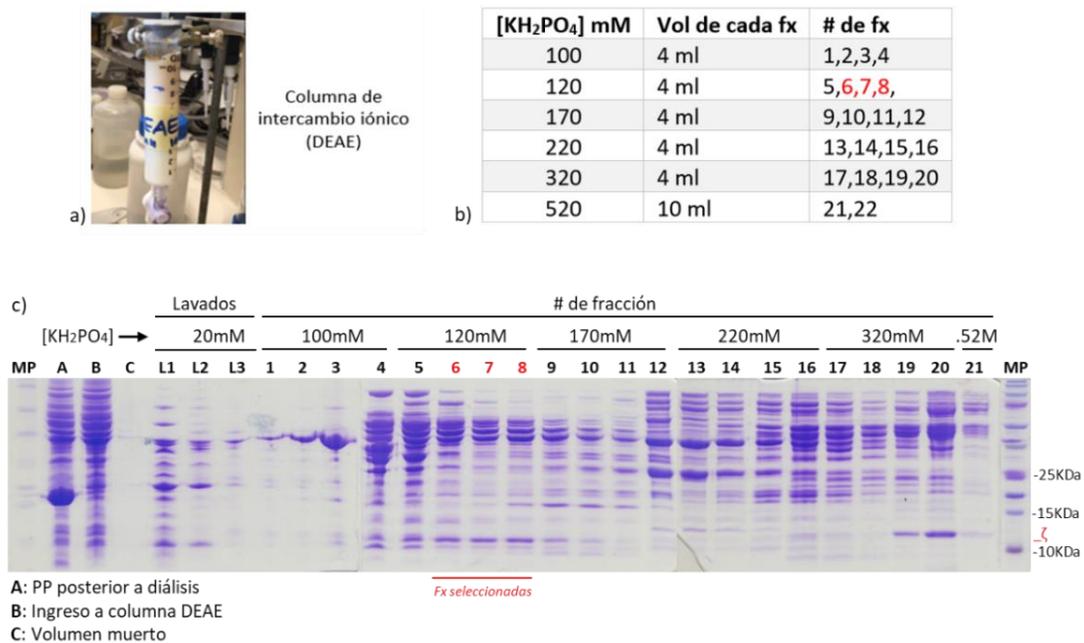


**Fig. 27** Purificación de la subunidad  $\zeta$  silvestre de *P. denitrificans*

a) Fracciones obtenidas después de la segunda columna, Superdex75 (exclusión molecular). La barra roja en la parte inferior indica las fracciones seleccionadas. b) Cromatograma de las fracciones de la columna de exclusión molecular, en la parte superior de cada señal se indica el número de fracción que corresponde al gel en el inciso a). c) parte final de la purificación, posterior a la Superdex75 se emplearon filtros Amicon para terminar de limpiar la proteína. Se muestra lo retenido arriba de 30kDa y la subunidad  $\zeta$  limpia (que corresponde a el filtrado del Amicon de 30kDa y posteriormente lo retenido en el filtro de 10kDa).

## Purificación de la subunidad $\zeta$ T2\_D5del (-4aa)

Para la purificación de la subunidad  $\zeta$  T2\_D5del (-4aa) se utilizó el plásmido pT7-7 + $\zeta$ T2\_D5del, previamente descrito, y se transformó en células *E. coli* BL21 DE3 pLysS codon plus (primer lote) y OrigamiB pLysS (segundo lote). Se purificaron dos lotes diferentes de proteína, el primer lote del 19 de septiembre del 2021 y el segundo lote el 15 de noviembre del 2021. En el primer lote purificado las fracciones obtenidas de la columna de intercambio iónico no tuvieron una buena separación por lo que se decidió seleccionar ciertas fracciones y emplear otra columna recién empacada con resina DEAE nueva. Posterior a este paso se obtuvieron fracciones relativamente limpias y se decidió omitir la columna de exclusión molecular. Para el segundo lote de purificación se siguió el protocolo estándar, es decir precipitación con sulfato de amonio, seguido de una columna de intercambio iónico (DEAE), columna de exclusión molecular (Superdex 75) y por último filtros Amicon de 30KDa y 10KDa, figuras 28 y 29.

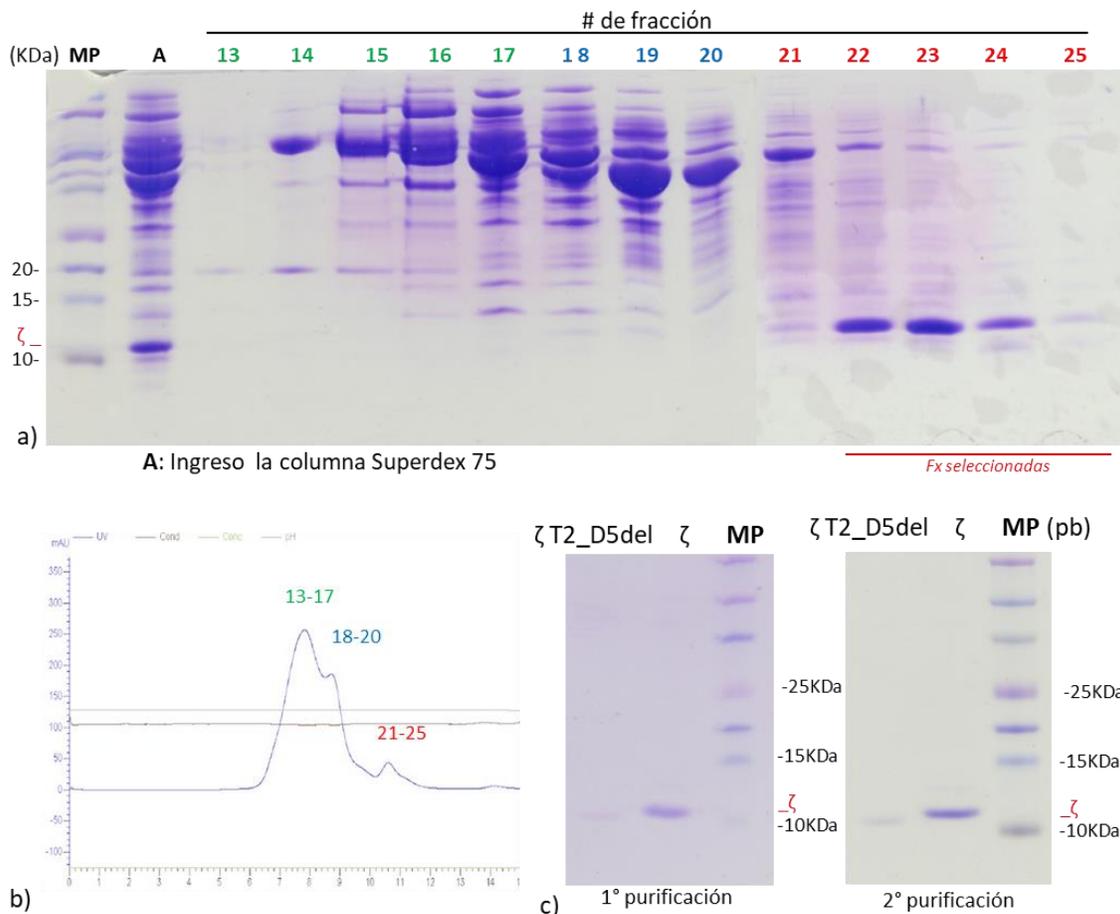


**Fig. 28** Perfil de elución resultante de la columna DEAE

a) Columna de intercambio iónico utilizada en el laboratorio. b) Tabla en donde se muestra los incrementos en la concentración de sal para eluir la proteína de la columna, las fracciones seleccionadas están en color rojo. Geles SDS-PAGE con las fracciones eluidas de la columna, en

color rojo se enfatizan las fracciones seleccionadas. La subunidad  $\zeta$  T2-D5del tiene un peso de 11.2KDa. Se unieron 4 geles para la figura.

Se muestra el proceso detallado de purificación para el caso del segundo lote de proteína, y en la figura 29 se aprecia el resultado final con la subunidad  $\zeta$  pura en ambos lotes de purificación. Posterior a la diálisis se observó un precipitado que se removió con centrifugación y se analizó en los geles SDS-PAGE (figura 29, inciso c, muestra A) este precipitado se formó con una proteína de aproximadamente 20KDa y no afectó el proceso de purificación de la subunidad  $\zeta$  T2\_D5del.



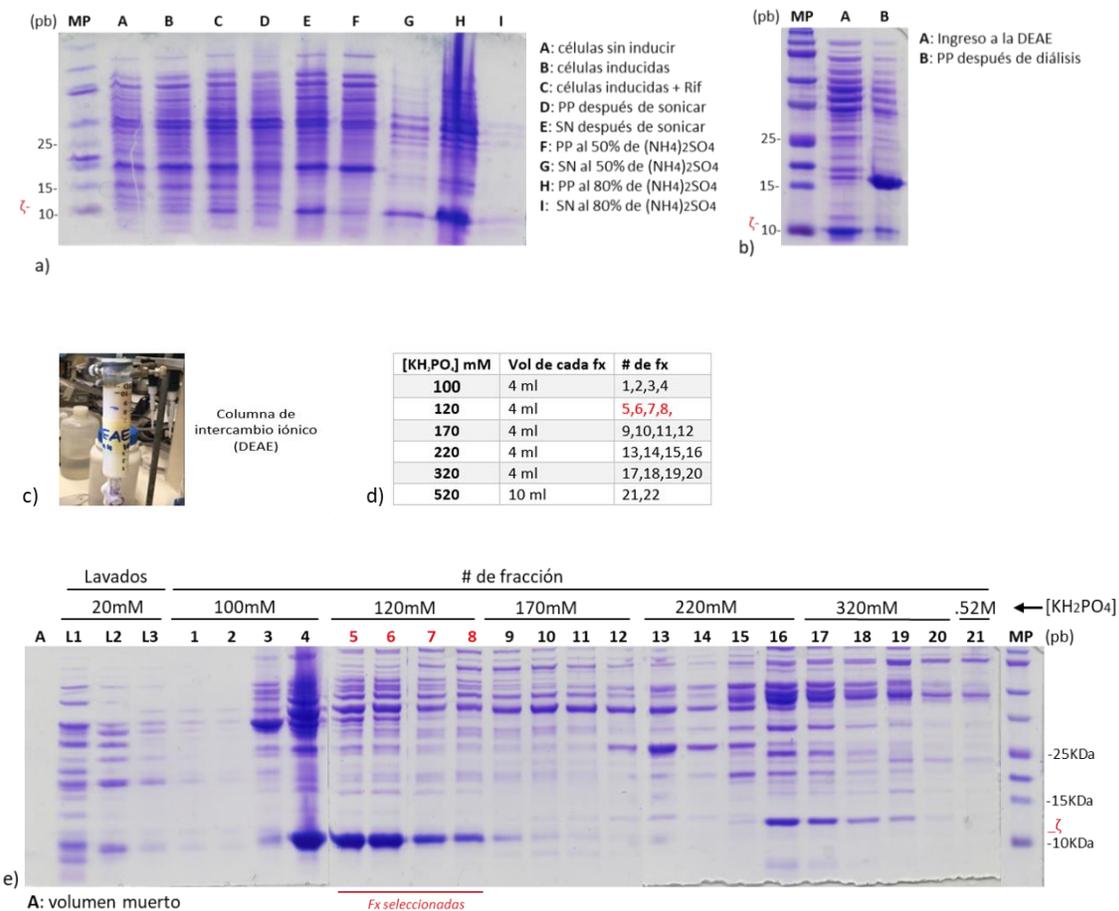
**Fig. 29 Perfil de elución resultante de la columna Superdex 75**

Las fracciones seleccionadas de la columna DEAE se unieron y concentraron y se aplicaron a la columna de exclusión molecular Superdex 75. a) geles SDS-PAGE con diferentes fracciones de obtenidas de la Superdex 75, el color del número de fracción indica el pico en el cromatograma en que se obtuvo dicha fracción. La subunidad  $\zeta$ T2\_D5 eluyó en las fracciones 21-25 (color rojo). b) Cromatograma de la Superdex 75 se obtuvieron 3 picos principales. c) Resultado final de la

purificación, posterior a la Superdex 75 se emplearon filtros Amicon de 30KDa y 10KDa para concentrar y limpiar la proteína y el resultado se muestra en los geles SDS-PAGE. Se muestra el resultado del primer y segundo lote de purificación.

## Purificación de la subunidad $\zeta$ T2\_R9del (-8aa)

Para purificar esta subunidad se empleó el plásmido pT7-7 + $\zeta$ T2\_R9del, previamente descrito. Al igual que en la purificación de la subunidad  $\zeta$ T2\_D5del, se purificaron dos lotes diferentes de proteína, el primero se realizó el 19 de septiembre del 2019 y el segundo lote el día 01 de diciembre del 2020. El plásmido se transformó mediante choque térmico a células competentes *E. coli* BL21 DE3 pLysS codon plus (primer lote) y OrigamiB pLysS (segundo lote). Ver figura 30.

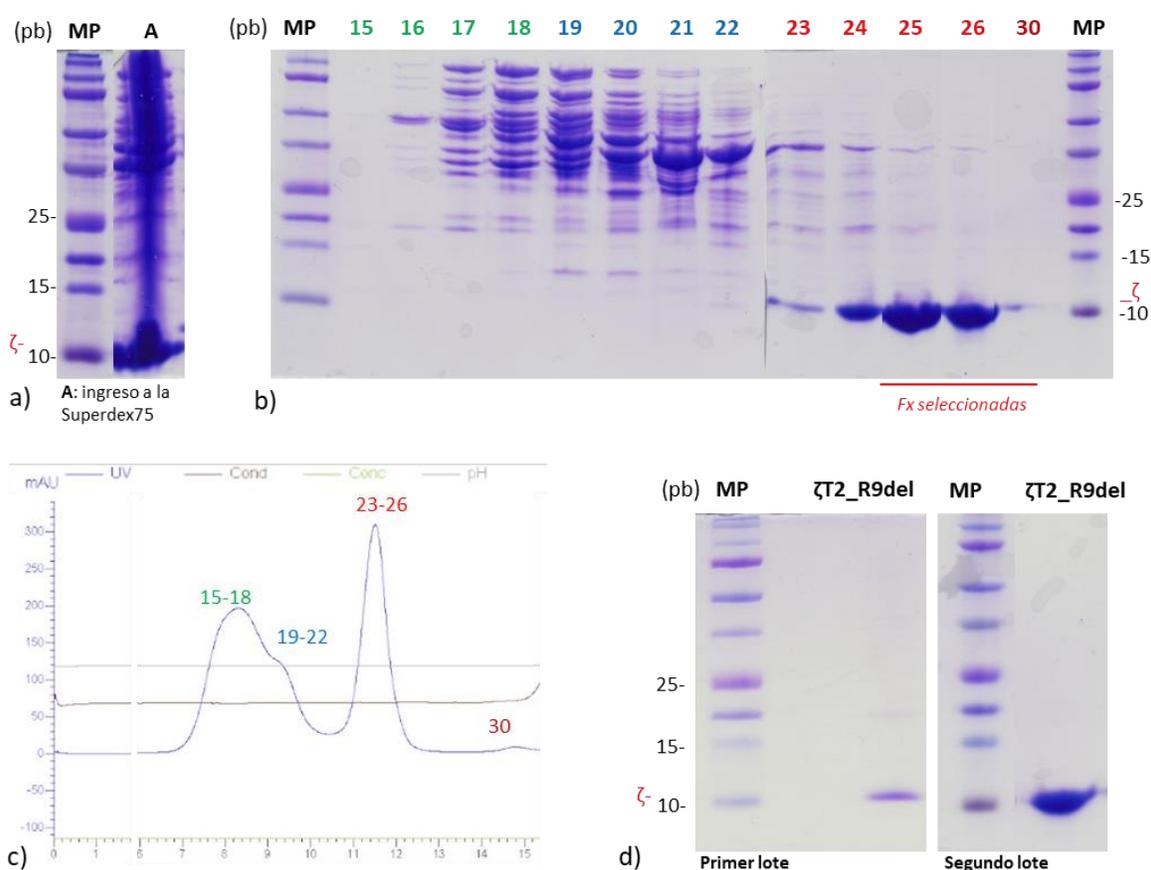


**Fig. 30** Proceso de purificación de  $\zeta$ T2\_R9del

a) y b) Geles SDS-PAGE con diferentes partes del proceso de purificación. c) Columna de intercambio iónico utilizada en el laboratorio. d) Tabla en donde se muestra los incrementos en la

concentración de sal para eluir la proteína de la columna, las fracciones seleccionadas están en color rojo. e) Geles SDS-PAGE con las fracciones eluidas de la columna DEAE, en color rojo se enfatizan las fracciones seleccionadas. La subunidad  $\zeta$ T2-R9del tiene un peso de 10.65KDa.

Se siguió el protocolo estándar de purificación (precipitación con sulfato de amonio, seguido de una columna de intercambio iónico (DEAE), columna de exclusión molecular (Superdex 75) y por último filtros Amicon de 30kDa y 10kDa (Figura 31), la única diferencia fue que para el primer lote fue necesario un último paso que consistió en una columna de afinidad (Blue sepharose CL-6B).



**Fig. 31** Resultado de la columna Superdex 75

a), b) y d) Geles SDS-PAGE con el proceso de purificación. En a) se muestra el ingreso a la columna de exclusión molecular. En b) se observan diferentes fracciones obtenidas al eluir la proteína. c) Cromatograma de la elución. En cada señal se indican las fracciones correspondientes en color a al inciso b. d) Resultado final de la purificación de  $\zeta$ T2\_R9del (-8aa). Se muestran los resultados de ambos lotes de purificación, la subunidad  $\zeta$ T2\_R9del tiene un peso de 10.65KDa.

En este caso también apareció un precipitado posterior a la diálisis, tratándose de una proteína que no era de interés. Se empleó el mismo protocolo descrito en la figura 28 inciso b. Se muestra el proceso detallado del segundo lote de purificación, y el resultado final con las subunidades  $\zeta$ T2\_R9del puras (primer y segundo lotes).

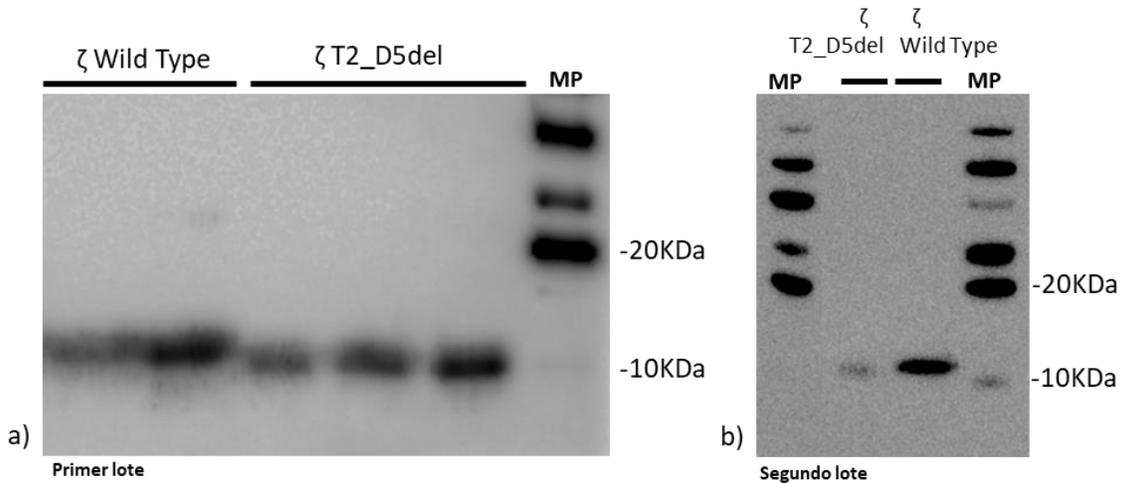
## Las partículas sub-bacterianas (PSBs) obtenidas presentan una actividad de $0.53\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$

A partir de 10L de células de la cepa *P. denitrificans*  $\Delta\zeta$  se prepararon PSBs siguiendo el protocolo que se describe en la sección de Materiales y Métodos. Las alícuotas se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  y se cuantificó la cantidad de proteína en las PSBs dando un total de  $72\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Además, se evaluó la actividad de hidrólisis de ATP en las PSBs dando una actividad “especifica” de  $0.53\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ .

## La presencia o ausencia de la subunidad $\zeta$ en PSBs silvestres y PSBs $\Delta\zeta$ se confirma mediante ensayos de inmunorréplica tipo Western blot

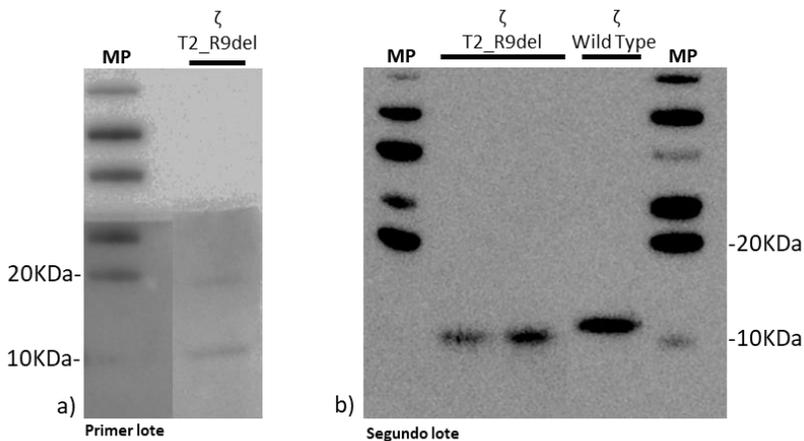
Para confirmar la identidad de las proteínas purificadas, además de revisar la ausencia de  $\zeta$  (en PSBs  $\Delta\zeta$ ) y presencia de  $\zeta$  (en PSBs silvestre previamente obtenidas en el laboratorio) se empleó la técnica de Western Blot.

Los resultados de las inmunorréplicas tipo Western blot (Figura 32 y 33) permiten asegurar que las proteínas purificadas ( $\zeta$ ,  $\zeta$ T2\_D5del y  $\zeta$ T2\_R9del) son en efecto la subunidad  $\zeta$ . Las subunidades mutantes muestran un peso molecular ligeramente menor comparado con la subunidad  $\zeta$  silvestre, lo cual coincide perfectamente con lo esperado. Además, se confirmó la ausencia de subunidad  $\zeta$  en las PSBs  $\Delta\zeta$  y la presencia de  $\zeta$  en las PSBs silvestres que en este caso se emplearon como control positivo (Figura 34). En las PSBs se empleó también un anticuerpo contra la subunidad  $\beta$  de la ATP sintasa para confirmar que efectivamente las PSBs tuvieran presencia del complejo V.



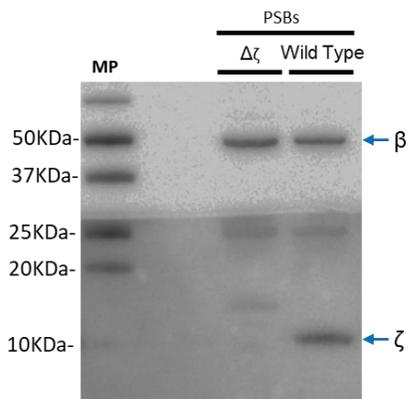
**Fig. 32** Identificación de la subunidad  $\zeta$  T2\_D5del (-4aa) por ensayos de inmunorréplica tipo Western Blot

a) Se observa la detección de la subunidad  $\zeta$  silvestre (primeros dos carriles) y la detección de la subunidad  $\zeta$ T2\_D5del purificada en el primer lote (siguientes tres carriles). b) Se observa la detección de la subunidad  $\zeta$ T2\_D5del purificada en el segundo lote (segundo carril) y la detección de la subunidad  $\zeta$  silvestre (tercer carril). La subunidad  $\zeta$ T2\_D5del tiene un peso de 11.2KDa.



**Fig. 33** Identificación de la subunidad  $\zeta$  T2\_R9del (-8aa) por ensayos de inmunorréplica tipo Western Blot

a) Se observa la detección de la subunidad  $\zeta$ T2\_R9del purificada en el primer lote. b) Se observa la detección de la subunidad  $\zeta$ T2\_D5del purificada en el segundo lote (segundo y tercer carril) y la detección de la subunidad  $\zeta$  silvestre (cuarto carril). La subunidad  $\zeta$ T2\_R9del tiene un peso de 10.65KDa.



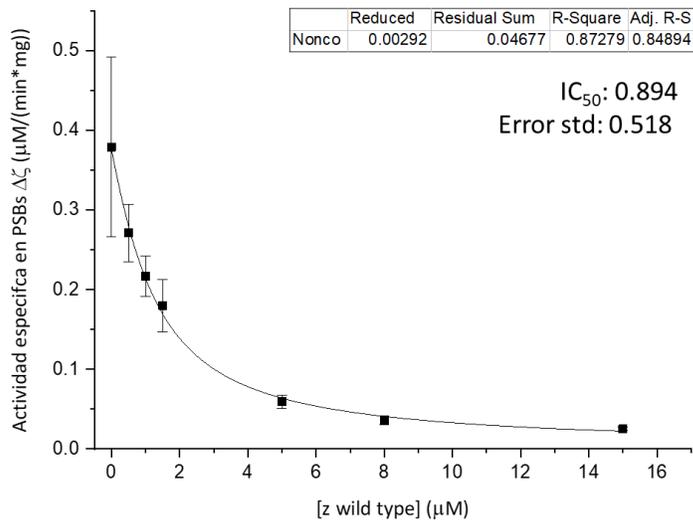
**Fig. 34 La subunidad  $\zeta$  silvestre está ausente en PSBs  $\Delta\zeta$**

Se muestra la detección de la subunidad  $\beta$  y la subunidad  $\zeta$  en partículas sub bacterianas silvestre y partículas sub bacterianas  $\Delta\zeta$ . El tercer carril corresponde a las PSBs  $\Delta\zeta$  en donde se observa subunidad  $\beta$ , pero no subunidad  $\zeta$ . El cuarto carril corresponde a PSBs silvestre donde se observan tanto  $\beta$ , como  $\zeta$ . La subunidad  $\beta$  tiene un peso de 50.34kDa y la subunidad  $\zeta$  tiene un peso de 11.7KDa.

## La subunidad $\zeta$ inhibe la actividad de hidrólisis de ATP en PSBs $\Delta\zeta$ con una $IC_{50}$ de 0.89 $\mu\text{M}$

Los ensayos de actividad de hidrólisis de ATP se realizaron con un método acoplado a las enzimas lactato deshidrogenasa y piruvato cinasa, como se describe con más detalle en la sección de Materiales y Métodos. La actividad se midió en partículas sub-bacterianas carentes de subunidad  $\zeta$  (PSBs  $\Delta\zeta$ ) y de la subunidad  $\zeta$  silvestre y subunidad  $\zeta$  mutantes se pre-incubaron con las PSBs 30min antes de iniciar la reacción, esto en presencia de una concentración relativamente baja de MgATP (1mM).

Para conocer la concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) de la subunidad  $\zeta$  silvestre, se realizó una curva de titulación a la cual se agregaron concentraciones crecientes de subunidad  $\zeta$  silvestre, y se registró su actividad de hidrólisis de ATP. Los datos de la curva se ajustaron a un modelo de inhibición no competitiva utilizando el software OriginPro 2019 (Figura 35). La  $IC_{50}$  calculada para la  $\zeta$  en PSBs  $\Delta\zeta$  fue de 0.894  $\mu\text{M}$ .



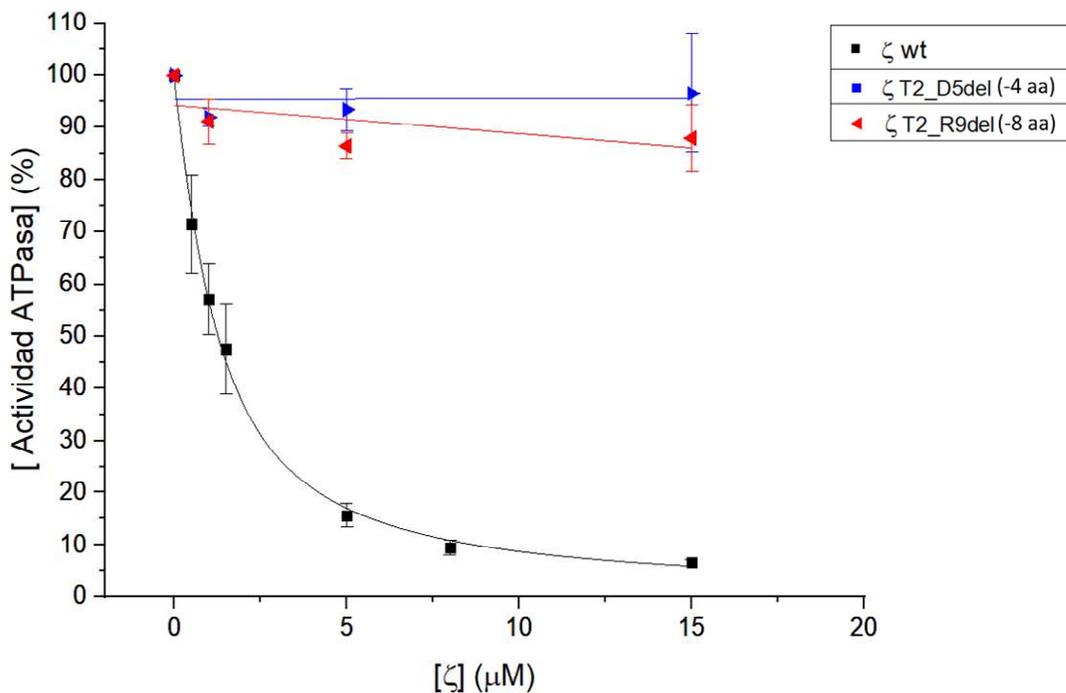
**Fig. 35** La subunidad  $\zeta$  silvestre inhibe la actividad de hidrólisis de ATP en PSBs  $\Delta\zeta$

c) Curva de titulación de la subunidad  $\zeta$  silvestre en PSBs  $\Delta\zeta$ , los puntos representan el promedio de un triplicado. La actividad se midió según se describe en la sección de Materiales y Métodos.

## Las deleciones de los aminoácidos 2-5 y 2-9 en la subunidad $\zeta$ generan una pérdida de la función inhibitoria de dicha subunidad

Posteriormente se realizaron ensayos con las subunidades mutantes  $\zeta T2\_D5del$  (-4aa) y  $\zeta T2\_R9del$  (-8aa), con el fin de conocer si éstas conservaban su capacidad inhibitoria. El resumen de los ensayos se muestra en la figura 36, correspondientes a mediciones realizadas con los segundos lotes de proteína purificados, y en condiciones estándar descritas en la sección de materiales y metodos.

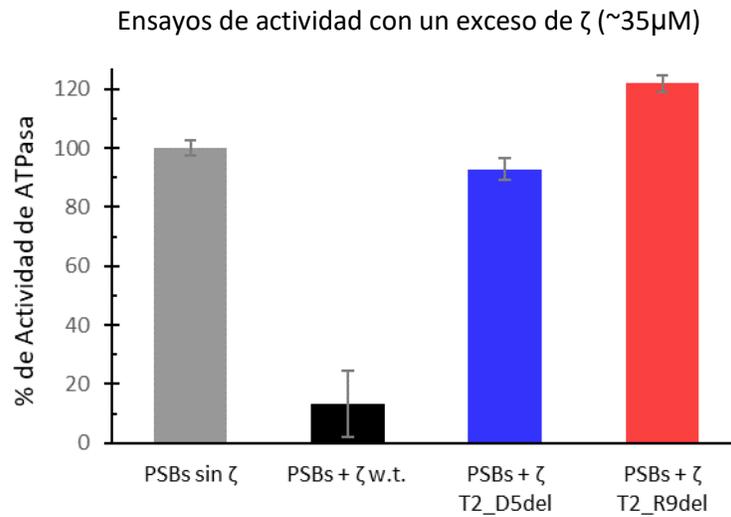
A partir de estos experimentos se puede observar que ambas mutantes, tanto la  $\zeta$  sin los primeros cuatro aminoácidos ( $\zeta T2\_D5del$ ) como la  $\zeta$  sin los primeros ocho aminoácidos ( $\zeta T2\_R9del$ ), carecen de actividad como inhibidor de la ATPasa de *P. denitrificans*. Por lo tanto los primeros cuatro aminoácidos son esenciales para la función de la subunidad  $\zeta$  silvestre.



**Fig. 36** Las deleciones de cuatro ( $\zeta$ T2\_D5del) y ocho ( $\zeta$  T2\_R9del) aminoácidos en el extremo amino de la subunidad  $\zeta$  resultan en una pérdida de su capacidad inhibitoria

En cuadrados negros se observa el porcentaje de inhibición por la subunidad  $\zeta$  silvestre, en triángulos azules el porcentaje de inhibición por la  $\zeta$ T2\_D5del (-4aa), y en triángulos rojos por la  $\zeta$  T2\_R9del (-8aa). Los puntos corresponden a un promedio ponderado de 3 experimentos. Las subunidades  $\zeta$  mutantes no tiene actividad como inhibidor de la ATPasa.

Además, se llevaron a cabo ensayos con concentraciones más elevadas de subunidad  $\zeta$  (tanto silvestre como mutantes), estos experimentos se muestran en la figura 37. En dichos experimentos se emplearon 20 $\mu$ g de  $\zeta$  por celda lo cual equivale a una concentración de 34.28 $\mu$ M ( $\zeta$  silvestre), 35.07 $\mu$ M ( $\zeta$ T2\_D5del) y 37.57 $\mu$ M ( $\zeta$ T2\_R9del), aproximadamente 40 veces la IC<sub>50</sub>. A pesar de esto no se observó inhibición por alguna subunidad  $\zeta$  mutante.

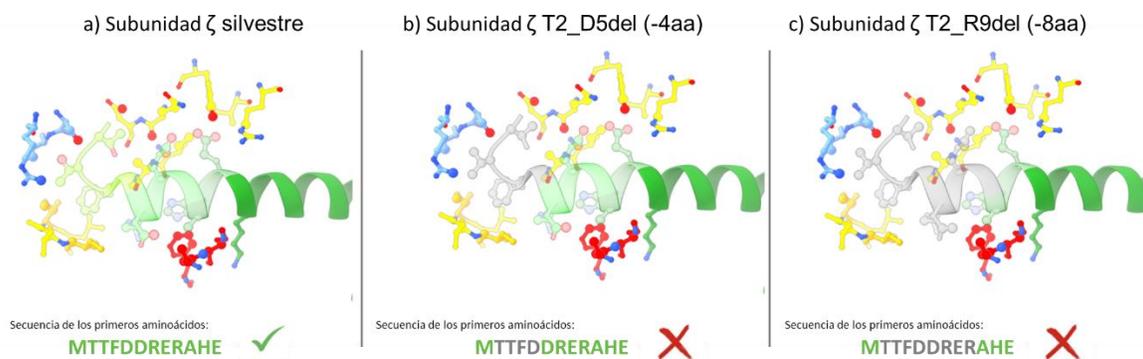


**Fig. 37** La pérdida de la función de las subunidades mutantes se observa aún con altas concentraciones ( $35\mu\text{M}$ ) de subunidades mutantes

Ensayos de actividad de ATPasa donde se empleó un total de  $20\mu\text{g}$  de subunidad  $\zeta$ , tanto silvestre como mutante, en la pre-incubación. Esto corresponde aproximadamente a emplear  $35\mu\text{M}$  de subunidad  $\zeta$  aproximadamente 35 veces el  $\text{IC}_{50}$ . A pesar de esto ninguna de las mutantes inhibió la actividad de ATPasa mientras que la subunidad  $\zeta$  silvestre inhibió dicha actividad casi por completo

# Discusión

De los objetivos planteados inicialmente, los cuales hacían referencia a la construcción de tres mutaciones secuenciales en la subunidad  $\zeta$ , se comenzó con la construcción de la mutante  $\zeta$ T2\_R9del y posterior purificación, la cual consiste en la delección de los aminoácidos 2 al 9 en el extremo amino terminal de  $\zeta$ . De esta forma 8 aminoácidos en la región inicial de  $\zeta$  se eliminaron, lo cual corresponde aproximadamente a eliminar 2 vueltas de  $\alpha$ -hélice en la proteína. El comenzar a realizar las pruebas de actividad con esta subunidad  $\zeta$  mutante nos permitió prescindir de realizar la última mutación planeada, ya que se observó que la subunidad  $\zeta$  sin 8 aminoácidos en su extremo amino,  $\zeta$ T2\_R9del, perdió su función inhibitoria, y por lo tanto se previó que la mutante a la cual se le planeaba eliminar 12 aminoácidos (es decir 4 más que la anterior), también sería una subunidad carente de actividad. Por esta razón, la mutante  $\zeta$ T2\_12del no se clono ni purificó. Un modelo de las mutaciones realizadas se muestra en la figura 38.



**Fig. 38 Estructura de la subunidad  $\zeta$  y las mutaciones realizadas**

Se muestra un esquema de la subunidad  $\zeta$  silvestre en el inciso a) y las dos mutantes realizadas en este proyecto, incisos b) y c). Ambas mutantes evaluadas perdieron la función inhibitoria y la última fue innecesaria. En color verde la subunidad  $\zeta$ , las mutaciones los aminoácidos eliminados en cada mutante se muestran de color gris. En amarillo los residuos de la subunidad  $\beta_{DP}$ , amarillo oscuro  $\beta_{TP}$ , azul  $\gamma$ , y rojo  $\alpha$ . Una ampliación de estos modelos se encuentra en el anexo VI.

Una vez realizadas las mutaciones y su clonación a los plásmidos pJET y pT7-7, estos plásmidos se analizaron mediante un ensayo con enzimas de restricción y con esto se comprobó que el inserto es reconocido por las enzimas de restricción

y que presenta el tamaño adecuado. Sin embargo, con el fin de asegurarse que la construcción fuera exactamente la esperada el ADN plasmídico se envió a secuenciar y los resultados confirmaron que las mutaciones eran las esperadas. El corroborar que todos los pares de bases de la secuencia son correctos es de vital importancia en proyectos como el presente, en el cual la proteína a evaluar contiene mutaciones deliberadas que deben ser absolutamente precisas.

Una vez concluida la sección del proyecto correspondiente a las técnicas de biología molecular, se procedió a purificar las proteínas mutantes,  $\zeta$ T2\_D5del y  $\zeta$ T2\_R9del. Estas purificaciones se realizaron por duplicado (primer lote y segundo lote en cada caso), lo cual nos permite aseverar con mayor solidez las conclusiones obtenidas de los experimentos posteriores. Como es imprescindible realizar controles con la subunidad  $\zeta$  silvestre, también se purificó esta proteína.

Con la finalidad de realizar los ensayos de actividad de ATPasa (ensayos de actividad hidrolítica en donde se reconstituyen las subunidades  $\zeta$  mutantes en este caso particular), se obtuvieron partículas sub-bacterianas (PSBs) a partir de membranas de *P. denitrificans*. En este procedimiento las membranas se rompen y se vuelven a unir, formando muy pequeñas vesículas invertidas selladas las cuales conservan los componentes presentes en las membranas originales, entre estos las proteínas membranales, particularmente para este proyecto son de crucial importancia la presencia de los complejos respiratorios y la ATP sintasa con su estructura membranal nativa. Este sistema aporta varias ventajas experimentales: ya que la orientación de las membranas se encuentra invertida, los sitios catalíticos de la ATP sintasa y otras proteínas membranales se encuentran expuestos al medio, y por lo tanto habilitados para reaccionar sin necesidad de ser transportadas a través de la membrana. Además, permite, en caso de que se requiera, la medición de la síntesis de ATP y/o el potencial de membrana, ya que la síntesis de ATP es una reacción acoplada a la translocación de protones por la ATPsintasa, para medir esta actividad es necesario que la enzima se encuentre dentro de una membrana, como en las PSBs, algo en que en la enzima purificada no es posible realizar. Las PSBs también son aptas para los

ensayos de actividad hidrolítica (es decir el inverso de la síntesis de ATP, llamados también actividad de ATPasa). Por último, las PSBs pueden emplearse en otras mediciones como la de actividad desnitrificante o emplearse simultáneamente con otras metodologías según el interés específico. Para este trabajo se emplearon PSBs de *P. denitrificans* silvestre, y además se obtuvieron PSBs de una cepa de *P. denitrificans* a la cual se le deletó el gen de la subunidad  $\zeta$ , a las cuales se refiere como PSBs  $\Delta\zeta$ . Esta cepa se construyó por un colega del laboratorio (Mendoza-Hoffmann et al., 2018) y su empleo nos permitió llevar a cabo ensayos en sistemas carentes de la subunidad  $\zeta$  silvestre los cuales de otro modo habrían de ser obtenidos removiendo la subunidad de la ATP sintasa. Esto implica que en los ensayos donde se reconstituye subunidad  $\zeta$  ya sea mutante o silvestre al sistema, toda la actividad inhibitoria observada es consecuencia de la subunidad  $\zeta$  añadida, y no existe interferencia por la subunidad  $\zeta$  endógena la cual podría estar presente en la ATP sintasa de las PSBs silvestre.

La identidad de las proteínas purificadas fue confirmada gracias a los experimentos de inmunorréplica tipo Western blot como se muestra en las figuras 32 y 33. Estos experimentos se realizaron con un anticuerpo policlonal con reconocimiento a la subunidad  $\zeta$  silvestre de *P. denitrificans*. A pesar de que el anticuerpo es policlonal, su alta especificidad se ha probado en numerosas ocasiones, y en particular para este proyecto se realizaron pruebas para confirmar que no existiera un reconocimiento inespecífico al menos contra las proteínas de la cepa Origami B pLysS, la cual se usó para la sobre expresión de las mutantes. La confirmación de la identidad por inmunorréplica tipo Western blot proporciona otra confirmación adicional, esta vez a nivel de proteína, que indica que efectivamente las proteínas purificadas corresponden a mutantes de la subunidad  $\zeta$ , o a la  $\zeta$  silvestre. Como podría esperarse en el caso de las subunidades mutantes la señal de la banda observada en el ensayo de inmunorréplica tipo Western blot fue ligeramente menos intensa a comparación de la subunidad  $\zeta$  silvestre, esto posiblemente se debe a que al eliminar ya sea cuatro u ocho aminoácidos en el amino terminal, existen menos epítopes que permitan a los diferentes anticuerpos (ya que se trata de un anticuerpo policlonal) reconocer a la

proteína. Este tipo de experimentos, permitieron, a también confirmar la ausencia y presencia de subunidad  $\zeta$  en las PSBs  $\Delta\zeta$  y PSBs silvestre, donde corresponde. Para estos dos últimos casos se empleó simultáneamente un anticuerpo monoclonal contra la subunidad  $\beta$  de la ATP sintasa, con lo cual se confirmó la presencia de la enzima en ambos tipos de PSBs, figura 34.

Una vez con la certeza respecto de la secuencia e identidad de las proteínas mutantes purificadas, solo resta confirmar que estas subunidades adquieran una estructura correcta que les permita interactuar con la ATP sintasa. Sin embargo, es posible mencionar que existen diversos antecedentes experimentales en el laboratorio que aportan la suficiente confianza para sugerir que en ambas mutantes truncas de la subunidad  $\zeta$ , se conserva una estructura terciaria semejante a la subunidad  $\zeta$  silvestre. Entre estos antecedentes se encuentran los experimentos realizados con la subunidad  $\zeta$  trunca de *P. denitrificans* a la cual se le removieron 14 aminoácidos, y con la subunidad  $\zeta$  trunca de *Jannashia sp* (sin los primeros 20 aminoácidos). Justo como se mencionó en la sección de antecedentes directos, se demostró que estas proteínas truncas podían interactuar con la  $F_1$  de *P. denitrificans* mediante un ensayo de reconstitución y posterior filtración en gel, en donde se observó que la  $\zeta$  trunca ( $\zeta$  de *P. denitrificans* con una delección de 14 aminoácidos en este caso) eluía en conjunto con la  $F_1$  implicando su unión a la enzima. Posteriormente se realizaron ensayos de actividad inhibitoria con las subunidades  $\zeta$  silvestre y  $\zeta$  truncas ( $\zeta$  de *P. denitrificans* con una delección de 14 aminoácidos y  $\zeta$  de *Jannashia sp* con una delección de 20 aminoácidos), observándose que existía una competencia entre las subunidades  $\zeta$  silvestres y  $\zeta$  truncas (Zarco-Zavala, 2014). Esto implica una estructura terciaria de las mutantes truncas semejante a la silvestre para permitir la unión a la enzima y la competencia con la subunidad  $\zeta$  silvestre, aún cuando se eliminan ya sea 14 o 20 aminoácidos en el extremo amino terminal. Sin embargo, la prueba más contundente de un plegamiento correcto se obtuvo gracias a la colaboración con el

Dr. Kurt Wütrich<sup>†</sup> en cuyo laboratorio se resolvió por medio de resonancia magnética nuclear la estructura de la subunidades  $\zeta$  trunca de *Jannashia sp* (además de la estructura de *P. denitrificans* silvestre) (Serrano et al., 2014). En el modelo obtenido se observa un plegamiento idéntico al silvestre en la parte globular de la subunidad  $\zeta$ , la cual está compuesta únicamente de 4  $\alpha$ -hélices. La preservación de la estructura terciaria con las deleciones de la región amino terminal era de esperarse puesto que esta región (primeros 19 aminoácidos en *P. denitrificans*) no adquiere una estructura secundaria específica, sino que conforma una región intrínsecamente desordenada en solución. Previa demostración de un plegamiento correcto en las deleciones de 14 y 20<sup>‡</sup> aminoácidos en esta región, se espera que las deleciones de cuatro y ocho aminoácidos correspondientes al presente proyecto mantengan de la misma forma un correcto plegamiento.

## Efectos de las mutaciones en la actividad de ATPasa

Los ensayos de la actividad de ATPasa se realizaron tal como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Inicialmente se realizó una curva de inhibición sobre las PSB  $\Delta\zeta$  empleando la subunidad  $\zeta$  silvestre. La curva de inhibición se ajustó a un modelo de inhibición no competitiva, que coinciden con los datos obtenidos previamente en el laboratorio. A partir de estos resultados se pudo obtener una concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de 0.89 $\mu$ M. Esta IC<sub>50</sub> se encuentra en el mismo orden de magnitud que la reportada en la tesis del Dr. Edgar Morales Ríos (Morales Ríos, 2011) en donde se reporta una IC<sub>50</sub> de 0.44 $\mu$ M; Sin embargo, es destacable la observación de que la IC<sub>50</sub> del presente trabajo es aproximadamente el doble que la reportada previamente. Esto es congruente con el hecho de que la determinación de la IC<sub>50</sub> en el trabajo del Dr. Morales fue realizada empleando PSBs de la cepa silvestre de *P. denitrificans*, las cuales contienen una población de ATPasa en la cual la subunidad  $\zeta$  endógena está

---

<sup>†</sup> Skaggs Institute for Chemical Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037, USA.

<sup>‡</sup> Deleción de 20 aminoácidos e inserción de 1 glicina para dar en total una proteína con 84 aa. Ver pagina 45 y material suplementario de (Serrano et al., 2014).

unida a la enzima. Esto implica que la cantidad necesaria de subunidad  $\zeta$  para alcanzar el 50% de la inhibición debe ser mayor cuando se emplean PSBs carentes de subunidad  $\zeta$  (PSBs  $\Delta\zeta$ ), a comparación de cuando se emplean PSBs de la cepa silvestre como fue el caso del trabajo del Dr. Morales. Además, concuerda con datos no publicados del trabajo de Carlos Chávez Castañeda, un exalumno del laboratorio del Dr. García Trejo, que indicaron que en las PSBs de la cepa silvestre de *P. denitrificans*, aproximadamente 1 de cada 2 ATPasas trae consigo a la subunidad  $\zeta$  unida, lo cual concuerda con la observación previa en donde se sugiere que la  $IC_{50}$  (PSBs  $\Delta\zeta$ ) de este trabajo es el doble que la  $IC_{50}$  reportada previamente (PSBs silvestres).

Posteriormente se evaluó la capacidad de las subunidades  $\zeta$  mutantes para inhibir la actividad de ATPasa. Cronológicamente, la primera subunidad mutante evaluada fue la subunidad  $\zeta$  T2\_R9del, la cual corresponde a la subunidad  $\zeta$  a la cual se le eliminaron ocho aminoácidos en el extremo amino terminal. Para los ensayos de actividad se realizó una curva a diferentes concentraciones de subunidad  $\zeta$ T2\_D5del tal como se muestra en la figura 36. A partir de dicho experimento se puede deducir que la delección de ocho aminoácidos impide que la subunidad ejerza su papel de inhibidor. Aunque en algunos puntos se observa una ligera disminución de la actividad de ATPasa, en el punto más bajo la disminución solo es de aproximadamente un 15%, mientras que a esa misma concentración la subunidad  $\zeta$  silvestre ejerce una inhibición de aproximadamente 90% de la actividad de ATPasa. Dicha curva de titulación se realizó con una concentración máxima de 15 $\mu$ M de subunidad  $\zeta$  reconstituida (ya sea silvestre o mutante), lo cual es alrededor de 15 veces más que la  $IC_{50}$  de la subunidad  $\zeta$  silvestre. Con estos datos se puede concluir que al menos a esas concentraciones de subunidad  $\zeta$  mutante, la delección impide ejercer su función a la subunidad  $\zeta$  T2\_R9del. A pesar de esto, cabría la posibilidad de que la delección de la subunidad  $\zeta$  solo habría disminuido su afinidad por  $F_1$ , lo cual podría explicar la razón por la cual no se observa inhibición, pero esto implicaría que a concentraciones más elevadas de subunidad  $\zeta$  mutante se podría observar inhibición. Este no es el caso, además de la curva de titulación se realizó una prueba de actividad de ATPasa

reconstituyendo una concentración grande de subunidad  $\zeta$  mutante (además de la subunidad silvestre como control positivo) tal como se muestra en la figura 37. La cantidad de subunidad  $\zeta$  reconstituida en esta prueba fue de 20 $\mu$ g lo cual equivale a una concentración de 37.57 $\mu$ M (y a una concentración de 34.25 $\mu$ M de  $\zeta$  silvestre), lo cual es aproximadamente más de 40 veces la concentración de la IC<sub>50</sub> para la subunidad  $\zeta$  silvestre. En esta prueba no se observó ningún efecto de inhibición por parte de la subunidad  $\zeta$  mutante, tal como se puede observar en la figura 37. Esto evidencia que la cantidad de subunidad  $\zeta$  mutante en el ensayo es más que suficiente para poder concluir que la delección de ocho aminoácidos es responsable de la pérdida de su función.

Los resultados obtenidos con esta subunidad  $\zeta$  mutante dieron pie a descartar la construcción de la mutante  $\zeta$  T2\_A13del, ya que lo más plausible es que esta mutante sin 12 aminoácidos también muestre una pérdida de la función, y al mismo tiempo permitieron enfocarnos en la construcción y evaluación de la actividad de la subunidad mutante  $\zeta$  T2\_D5del, la cual solo tiene cuatro aminoácidos eliminados.

Los ensayos de inhibición para la subunidad mutante  $\zeta$ T2\_D5del, fueron análogos a los descritos para la subunidad mutante  $\zeta$  T2\_R9del, es decir constaron de una curva de titulación con la subunidad  $\zeta$  y además de un ensayo con una concentración grande de subunidad  $\zeta$  ( $\zeta$ T2\_D5del a 35.7 $\mu$ M y  $\zeta$  silvestre a 34.28 $\mu$ M) para descartar su efecto inhibitorio a altas concentraciones. Los resultados de dichos experimentos se muestran en las figuras 36 y 37, y como se puede observar, en ninguno de los casos se observó una inhibición significativa.

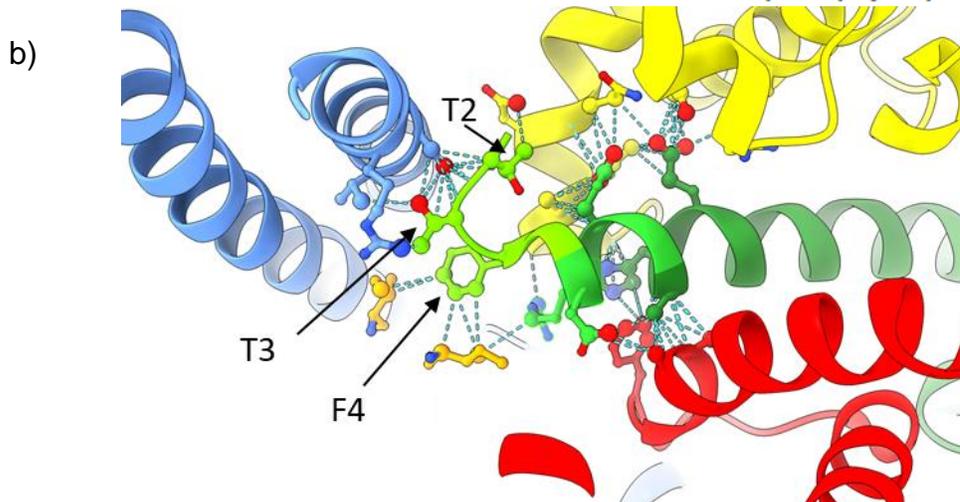
La pérdida de la función en ambas subunidades mutantes implica que los cuatro primeros aminoácidos (posteriores a la metionina 1, la cual está presente en ambas mutantes pues indica el codón de inicio) del extremo amino terminal de la subunidad  $\zeta$ , son esenciales para su función.

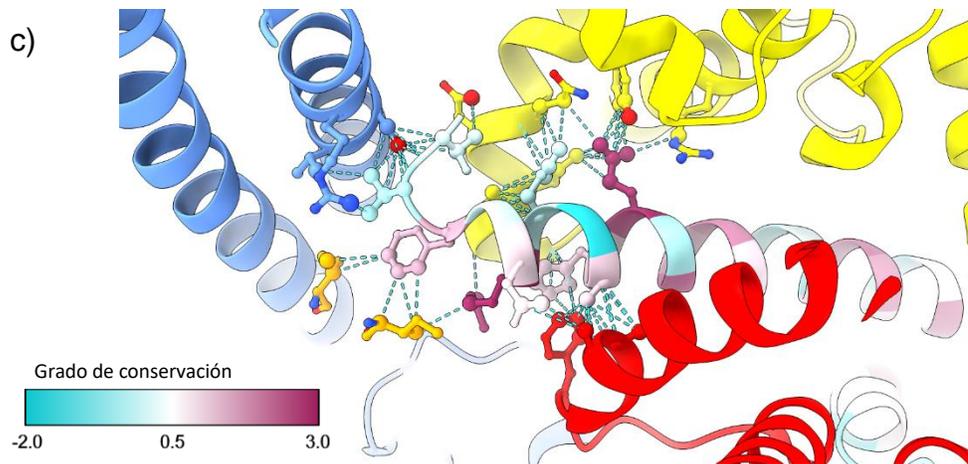
Los contactos de diferentes subunidades de la ATPasa con los residuos de la subunidad  $\zeta$  en su sitio inhibitorio fueron reportados en 2015 cuando se obtuvo el

primer modelo de la ATP sintasa de *P. denitrificans* por cristalografía de rayos X (Morales-Rios et al., 2015). En este trabajo se reportaron específicamente los contactos de  $\zeta$ , con las subunidades  $\alpha_{DP}$ ,  $\beta_{DP}$ , y  $\gamma$  en la fracción  $F_1$ , contiguos al sitio donde interactúa  $\zeta$ . Es relevante mencionar que los contactos se calcularon con el programa CONTACTS a una distancia menor de 4 Å (angstroms), y únicamente se calcularon con las subunidades antes mencionadas, dejando fuera del análisis otras subunidades de la enzima. Los contactos reportados se pueden apreciar en la figura 39. Estos contactos y algunos alineamientos de secuencias de  $\zeta$ , fueron empleados al inicio de este proyecto para planear las mutaciones realizadas.

a) **Table S2. Interactions of the  $\zeta$ -inhibitor protein with the  $\gamma$ -,  $\alpha_{DP}$ -, and  $\beta_{DP}$ -subunits of the F-ATPase from *P. denitrificans***

$\zeta$	$\gamma$	$\alpha_{DP}$	$\beta_{DP}$
T1	S13		D382
T2	R10, S13, V14		
R6		F407	I386
E7			Q381, I384, A385
A9		A403, A404	
H10		F407	I384, A385, G388
E11			Y377, I384, Q381, R404





**Fig. 39** Contactos de  $\zeta$  con  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$

a) Contactos reportados en el artículo de Morales-Ríos 2015 b) Representación gráfica de los primeros 12 residuos de  $\zeta$  con  $F_1$ . La subunidad  $\zeta$  se representa de color verde, mientras que la subunidad  $\gamma$  de color azul y las subunidades  $\beta$  y  $\alpha$  de color amarillo y rojo. Los contactos de los primeros 4 residuos se detallan en la figura 41. c) grado de conservación de los residuos en  $\zeta$ , los residuos más conservados se colorean de guinda mientras que los menos conservados de azul.

A pesar de que se contaba con este reporte previo de los contactos de  $\zeta$  con  $F_1$ , dado que en el laboratorio se sospechaba que no todos los contactos se habían descrito apropiadamente en el reporte previo (Morales-Rios et al., 2015), en el transcurso del proyecto se decidió emplear nuevas herramientas para verificar el cálculo de los contactos de  $\zeta$ . Para esto se empleó inicialmente el software UCSF ChimeraX (Pettersen et al., 2021), con la herramienta de “contacts” para contactos a menos de 4 Å. Los resultados de este cálculo se muestran en la figura 40. Tal como se aprecia en dicha figura existen algunos contactos que no se habían reportado previamente, en particular los concernientes a las interacciones de  $\zeta$  con la subunidad  $\beta_{TP}$ . Esto podría deberse a que en el reporte previo solo se tomó en cuenta para el cálculo las subunidades  $\alpha_{DP}$ ,  $\beta_{DP}$ , y  $\gamma$ , las cuales a primera instancia parecen ser las únicas que forman la intercara donde se une  $\zeta$ , pero este nuevo análisis demostró que la subunidad  $\beta_{TP}$  también contacta a  $\zeta$ . Independientemente de la razón por la cual no se reportaron los contactos entre  $\zeta$  y  $\beta_{TP}$ , se decidió analizar nuevamente los contactos de  $\zeta$  incluyendo todas las subunidades de  $F_1$ , mediante dos softwares adicionales: PLIP (Protein-Ligand Interaction Profiler (Adasme et al., 2021) ) y GetContacts (Fonseca, 2016), esto se realizó con el apoyo del colega del laboratorio el Biól. Mol. Jorge Emiliano Salinas López.

ζ	γ			α <sub>DP</sub>			β <sub>DP</sub>						β <sub>TP</sub>			
	S13	R10	V14	A403	A404	F407	R404	Y377	Q381	D382	I384	A385	I386	G388	I383	I386
T2	✓✓✓									✓✓						
T3	✓✓-	✓✓	✓✓												✓✓	✓✓
F4																
D6				-✓												
R7						✓- -							✓✓✓		-✓-	
E8									✓✓-		✓✓-	✓✓✓	✓✓✓			
A10				✓✓✓	✓✓✓	-✓✓					✓✓-	✓✓✓				
H11						✓✓-					✓✓-	✓✓-		✓✓✓		
E12							✓✓✓	✓✓✓	✓✓✓		✓✓-	✓✓-		✓✓✓		

Interacciones reportadas en:

✓: (Morales-Rios et al., 2015)

✓: Chimera X

✓: PLIP (Protein Ligand Interaction Profiler)

#### Fig. 40 Contactos de ζ con otras subunidades

La existencia de un contacto se ilustra como una “X”, mientras que “-” indica la ausencia de dicho contacto. Contactos reportados en el artículo de Morales-Ríos 2015 en color rojo, a partir de ChimeraX en color negro y a partir de PLIP en color azul. Ciertos contactos se reportan en todos los casos, pero algunos solo se reportan con cierto software específico.

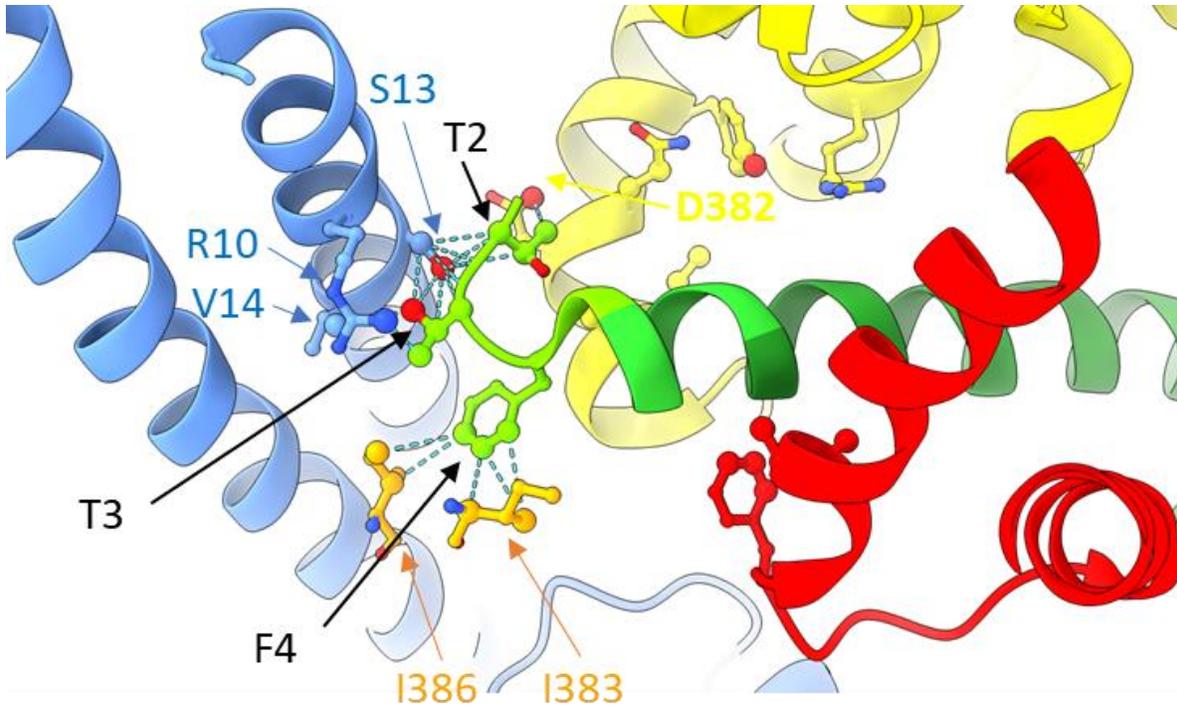
A diferencia de los dos primeros softwares, empleando PLIP y GetContacts se puede profundizar en el tipo de interacción entre los dos residuos, la figura 40 incluye el resultado de los diversos análisis de contactos y/o interacciones entre los primeros 12 aminoácidos de ζ y las otras subunidades de F<sub>1</sub>.

Analizar nuevamente los contactos e interacciones de la subunidad ζ con F<sub>1</sub>, resultó en la observación de varios puntos relevantes. El primero fue la identificación de una imprecisión en el reporte previo, en el cual se señalaba un contacto entre la alanina 9 de ζ (alanina 10 en realidad, pero no se tomó en cuenta la metionina 1) y la alanina 404 de α. La existencia de dicho contacto es imposible, ya que la posición 404 de la subunidad α<sub>DP</sub> corresponde a un residuo de fenilalanina y no alanina, esta imprecisión podría recaer en el hecho de que el anillo aromático de la fenilalanina no se pudo resolver en el modelo de cristalografía de rayos X, por lo que este residuo asemeja incorrectamente una alanina, dicha corrección ya se incluye en la figura 40. El segundo hallazgo novedoso fue la identificación de interacciones entre la fenilalanina 4 de ζ y los residuos de isoleucina 383 y 386 de la subunidad β<sub>TP</sub>, las cuales habían pasado inadvertidas previamente. Estas interacciones recientemente observadas, toman

un papel trascendental en el análisis de los resultados experimentales del presente proyecto ya que no sólo se encuentran en la región que al ser delatada provocó la pérdida de la función de  $\zeta$  (tanto en  $\zeta T2\_D5del$  como  $\zeta T2\_R9del$ ), sino que, además, el contacto reside en una fenilalanina altamente conservada en diferentes alineamientos de subunidades  $\zeta$  de diferentes especies, como se ilustra en la figura 39 (inciso c). Ahondando más en el análisis de la posición de la fenilalanina 4, resulta interesante el hecho de que un aminoácido no polar se encuentre altamente conservado en una región de la proteína que en solución se encuentra expuesta al solvente (formando un dominio intrínsecamente desordenado (desde el residuo 1 hasta el residuo 18), ver figura 15). Todos estos factores apuntan hacia la posibilidad de que el residuo de fenilalanina 4 tenga un papel crítico en la función de la subunidad  $\zeta$  como proteína inhibidora, el cual se explora en las páginas posteriores.

## Implicaciones sobre el mecanismo de inhibición de la subunidad $\zeta$

Partiendo conjuntamente de la evidencia experimental en la cual la delección de los aminoácidos 2-5, provocó la pérdida de la función inhibitoria de la subunidad  $\zeta$ , y del análisis de los contactos e interacciones de estos residuos con la ATPasa (figuras 39-41), es posible plantear un posible mecanismo a nivel estructural que explique de una forma más profunda el mecanismo de inhibición de esta subunidad. En total se proponen 3 diferentes opciones en cuanto al mecanismo de inhibición por  $\zeta$ : Dos opciones principales, las cuales no son mutuamente excluyentes, y una última propuesta que implica un mecanismo conjunto que engloba las dos primeras opciones de forma simultánea.



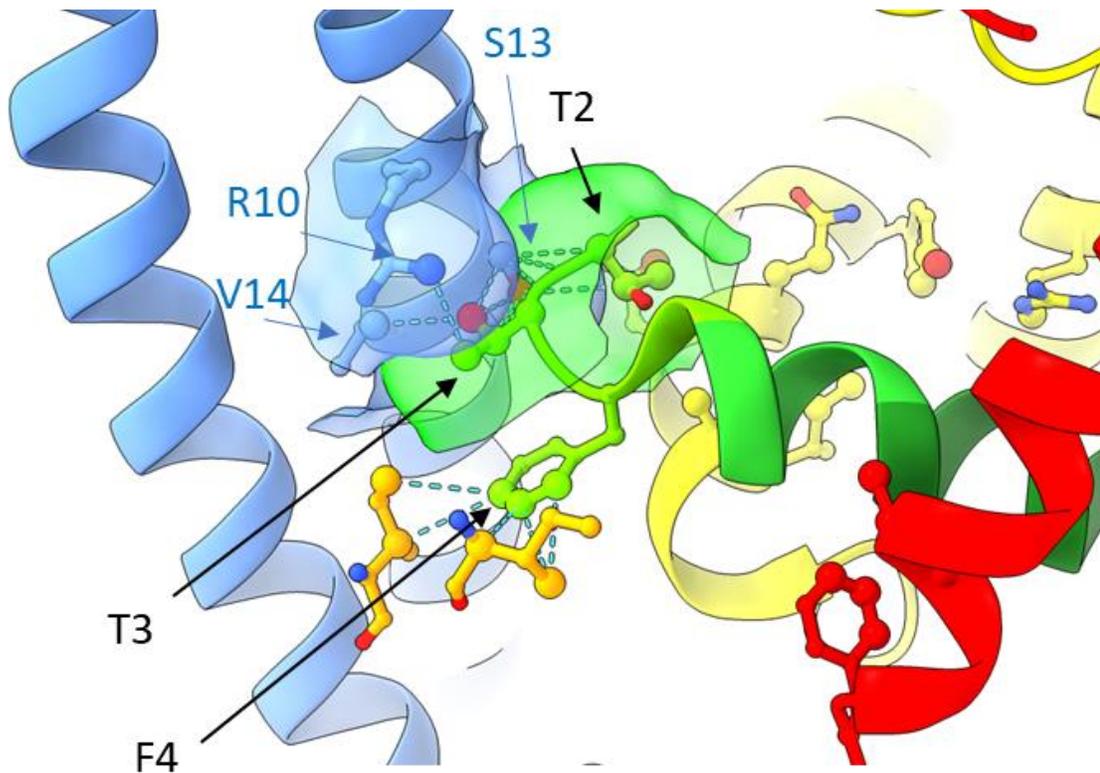
	$\zeta$	$\gamma$	$\alpha_{DP}$	$\beta_{DP}$	$\beta_{TP}$
T2		S13		D382	
T3		R10, S13, V14			
F4					ILE383, ILE386

**Fig. 41** Contactos de los primeros cuatro residuos de la subunidad  $\zeta$

$\zeta$  se representa de color verde, mientras que la subunidad  $\gamma$  de color azul y las subunidades  $\beta$  y  $\alpha$  de color amarillo y rojo. Los residuos naranjas corresponden a  $\beta_{TP}$ . En la parte inferior se resumen estos contactos en forma de tabla.

El primer mecanismo posible consiste en que los primeros residuos en el extremo amino terminal de la subunidad  $\zeta$  contacten con el rotor de la ATPasa, específicamente con la subunidad  $\gamma$ , deteniendo así el giro del rotor de la enzima (Figura 42). Esto traería como consecuencia el bloqueo de la actividad de la enzima lo cual impediría la hidrólisis de ATP, tal como se observa en condiciones experimentales al evaluar la inhibición ejercida por  $\zeta$ . Este mecanismo tiene como base los contactos de los residuos de treonina 2 y 3 de la subunidad  $\zeta$ , con los residuos de serina 13, arginina 10, y valina 14, en la subunidad  $\gamma$  (parte del rotor). Las mutantes de la subunidad  $\zeta$  evaluadas (tanto  $\zeta_{T2\_D5del}$  como  $\zeta_{T2\_R9del}$ ),

pierden estos contactos entre  $\zeta$  y  $\gamma$ , a su vez perdiendo la función inhibitoria. Por lo tanto, según esta posibilidad, la subunidad  $\zeta$  ejercería su función únicamente al bloquear el giro de la subunidad  $\gamma$  (parte del rotor), lo cual impide la actividad hidrolítica de la ATPasa.



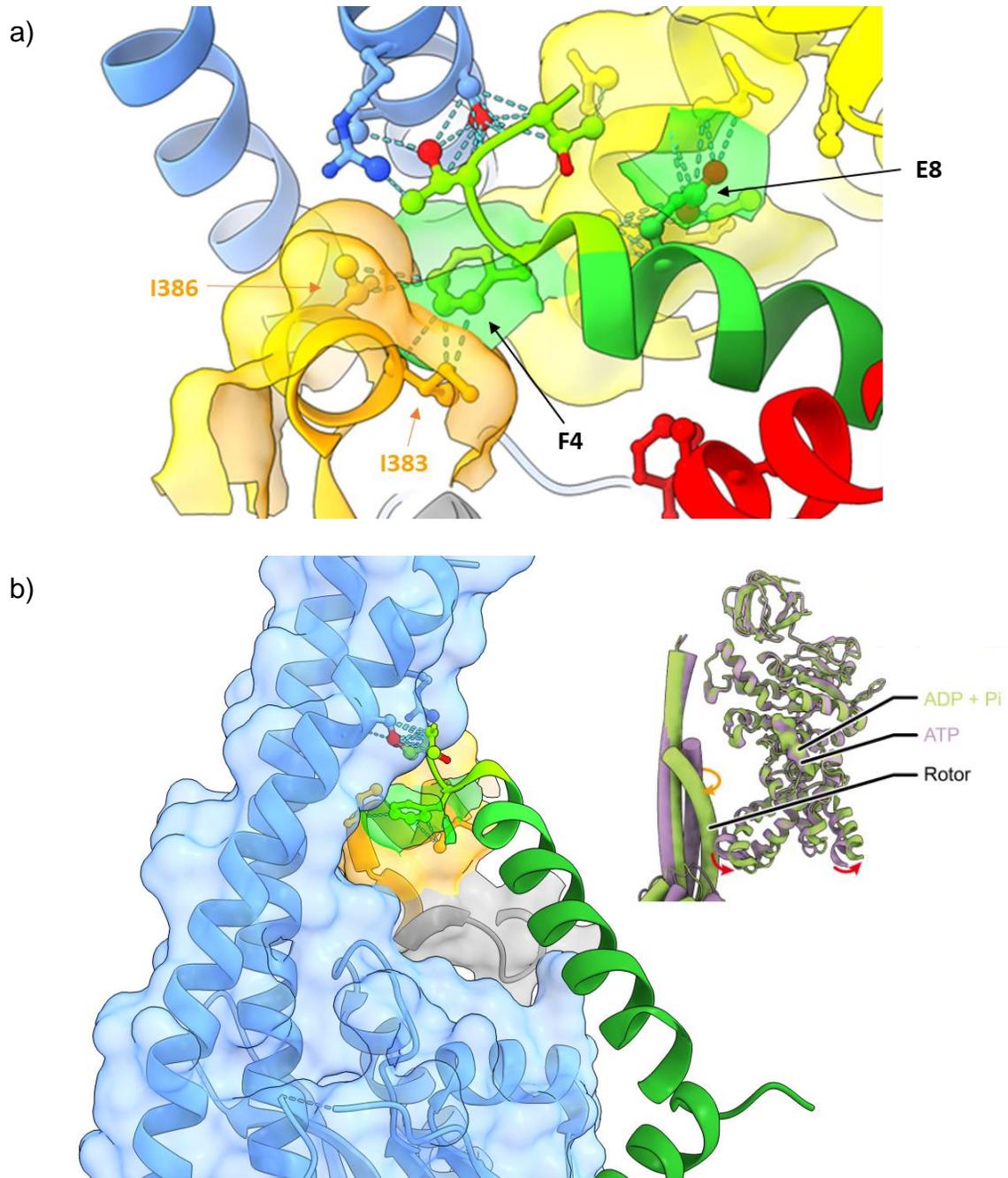
**Fig. 42** Contactos entre la subunidad  $\zeta$  y la subunidad  $\gamma$

Las treoninas 2 y 3 hacen contacto directamente con el rotor de la enzima en la subunidad  $\gamma$ , se muestran los contactos y las superficies de los residuos involucrados.

La segunda posibilidad sobre el mecanismo de  $\zeta$  recae sobre el contacto que establece la subunidad  $\zeta$  con las subunidades  $\beta_{DP}$  y  $\beta_{TP}$ . Como se aprecia en la figura 41, la treonina 2 de  $\zeta$  contacta con el aspártico 382 de la subunidad  $\beta_{DP}$  y la fenilalanina 4 mantiene un par de contactos con las isoleucinas 383 y 386 de  $\beta_{TP}$ . Las interacciones de la fenilalanina 4 de  $\zeta$  son de particular interés, ya que como se mencionó antes, este es un residuo hidrofóbico altamente conservado, e interactúa con una subunidad  $\beta$  que no es la más próxima al sitio de unión de  $\zeta$  (intercara entre  $\alpha_{DP}$  y  $\beta_{DP}$ ), sino que interactúa con la subunidad  $\beta_{TP}$ . Los residuos contactados por  $\zeta$  en ambas subunidades  $\beta$  (tanto  $\beta_{DP}$ , como  $\beta_{TP}$ ) se encuentran

en una  $\alpha$ -hélice inmediatamente previa a la región del DELSEED en la secuencia de la subunidad  $\beta$ , la cual tiene una importancia crucial en la transmisión del movimiento mecánico entre el rotor ( $\gamma$ ) y la subunidad  $\beta$ . En el funcionamiento normal de la enzima, cuando la subunidad  $\gamma$  gira, esta impulsa el movimiento de  $\beta$  inicialmente en el DELSEED, desplazándolo hacia una parte superior de la  $F_1$  (tomando como referencia la subunidad  $\delta$ , como la parte superior de la enzima y las subunidades  $c$  como la parte inferior). Este movimiento de  $\beta$ , posteriormente se traduce en otros cambios conformacionales que terminan por permitir el mecanismo catalítico de la enzima. Sin embargo, cuando  $\zeta$  está unida a la  $F_1$ , la posición de la fenilalanina 4 de  $\zeta$  y su interacción con las isoleucinas 383 y 386 de  $\beta_{TP}$  en esa región hidrofóbica, mantiene ocupado el espacio necesario para que el DELSEED de  $\beta_{TP}$  se desplace hacia la parte superior, generando un bloqueo mecánico que impide a la enzima llevar a cabo la catálisis, inhibiendo la actividad de ATPasa. Como se demostró experimentalmente en las subunidades  $\zeta$  mutantes, cuando la interacción de  $\zeta$  con  $\beta_{TP}$ , se pierde, también se pierde la función  $\zeta$  de inhibir eficientemente la actividad de ATPasa.

El mecanismo previo podría aplicar en menor medida también para los contactos entre  $\zeta$  y la subunidad  $\beta_{DP}$  (T2 de  $\zeta$  y D382 de  $\beta_{DP}$ ), sin embargo, la posición de la treonina 2, al menos en el modelo de cristalografía de rayos X, no parece proporcionar un bloqueo mecánico tan evidente como en el caso de la fenilalanina 4 con la subunidad  $\beta_{TP}$ . Esto aunado al hecho de que la mayoría de los contactos entre  $\zeta$  y  $\beta_{DP}$  que permitirían estabilizar la interacción de estas dos subunidades (residuo 7 de  $\zeta$  en adelante) si están presentes en el caso de la subunidad mutante  $\zeta_{T2\_D5del}$  y pesar de esto dicha mutante no muestra actividad inhibitoria, podría sugerir que los contactos entre  $\zeta$  y  $\beta_{TP}$  tienen un peso mayor en el mecanismo de inhibición a comparación de los contactos entre  $\zeta$  y  $\beta_{DP}$  (específicamente refiriéndose al caso de la treonina 2).



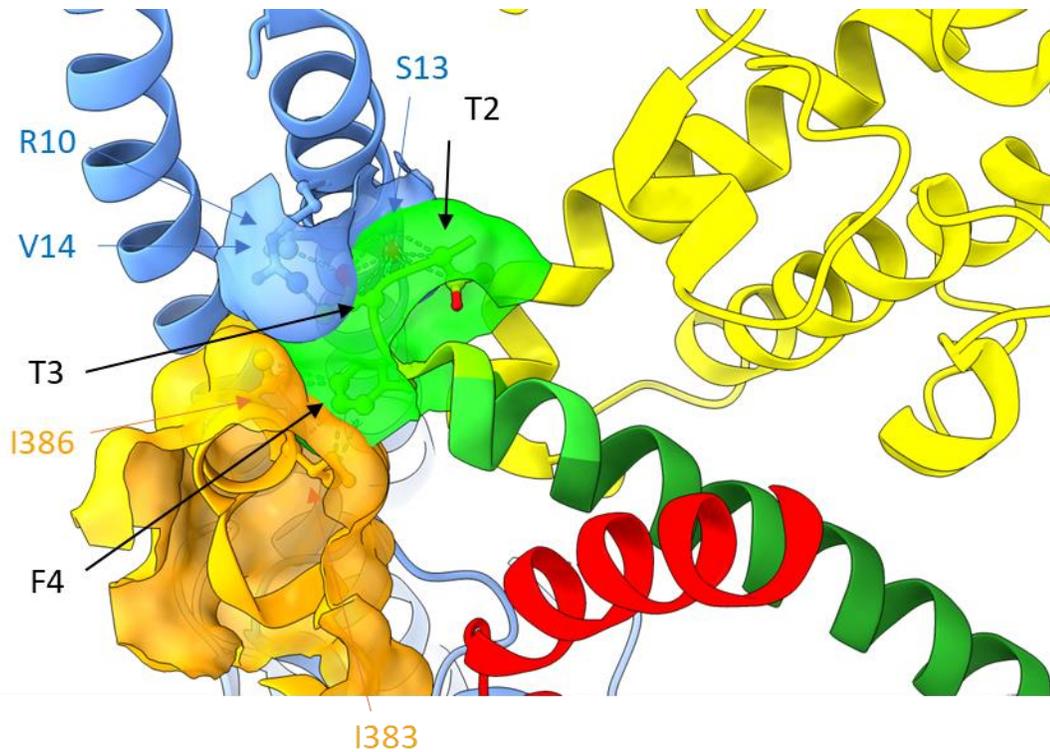
**Fig. 43** Contactos entre la subunidad  $\zeta$  y la subunidad  $\beta$  y  $\gamma$

a) La fenilalanina 4 de  $\zeta$ , contacta con la subunidad  $\beta_{TP}$  y el glutámico 8 contacta con la subunidad  $\beta_{DP}$ . b) El contacto con la subunidad  $\beta_{TP}$  se encuentra justo por arriba del DELSEED (color gris) de esta subunidad y forma un bloqueo mecánico que impediría el movimiento de este. Subunidades  $\alpha$  rojo,  $\beta_{DP}$  amarillo,  $\beta_{TP}$  dorado y azul,  $\zeta$  verde, y en gris la región DELSEED de la subunidad  $\beta$ . (PDB 5dn6 y modificado de (Guo & Rubinstein, 2022))

En resumen, se han propuesto dos posibles mecanismos para la inhibición de la actividad de ATPasa por la subunidad  $\zeta$ : El primero considera que la inhibición se

debe principalmente a las interacciones de  $\zeta$  con el rotor de la enzima (subunidad  $\gamma$ ) impidiendo que este gire y deteniendo la actividad enzimática como consecuencia. El segundo considera que la inhibición se debe mayoritariamente a las interacciones de  $\zeta$  con la subunidad  $\beta_{TP}$ , bloqueando mecánicamente el desplazamiento del DELSEED, lo cual detiene la actividad enzimática. Es de suma importancia remarcar nuevamente que estos dos posibles mecanismos no son mutuamente excluyentes, sino que es posible que sean complementarios entre sí y es esta la tercera propuesta sobre el mecanismo de inhibición. En este mecanismo conjunto, tanto los contactos con el rotor, como los contactos con la subunidad  $\beta_{TP}$ , son necesarios para la inhibición de la actividad de ATPasa por  $\zeta$ . Además de que actúen en conjunto cabe la posibilidad de que los contactos de las treoninas 2 y 3 con  $\gamma$ , asistan al bloqueo mecánico del desplazamiento del DELSEED, al encontrarse estos residuos en una región inmediatamente superior a la alfa-hélice anterior al DELSEED en la subunidad  $\beta_{TP}$  (ver figuras 43 y 44). Es este último mecanismo en donde ambas interacciones son necesarias, es el que el autor de esta tesis considera el más plausible tomando en cuenta los datos con los que se cuenta hasta la fecha.

Para elucidar los contactos esenciales o el peso específico de cada contacto entre  $\zeta$  y  $F_1$  en la inhibición, una aproximación que permitirá contar con datos experimentales es llevar a cabo mutaciones puntuales por ejemplo por alaninas (“alanine scanning”) de los residuos relevantes como las treoninas 2 y 3 y la fenilalanina 4, entre otros. Dicho proyecto se está realizando de manera simultánea en colaboración con el colega del laboratorio el Biol. Mol. Oliver Sotelo, y se espera sus resultados permitan complementar los obtenidos en este trabajo, así como se espera que los resultados obtenidos en este proyecto le permita a él guiar y complementar sus análisis.



**Fig. 44** Los contactos más plausibles que permiten la inhibición por la subunidad  $\zeta$

Se muestran las superficies en los contactos simultáneamente entre  $\zeta$  y el rotor ( $\gamma$ ), y  $\zeta$  y la subunidad  $\beta_{TP}$ , las dos interacciones que dan pie a los mecanismos propuestos en esta tesis. Subunidades  $\alpha$  color rojo  $\beta_{DP}$  amarillo,  $\beta_{TP}$  dorado,  $\gamma$  azul,  $\zeta$  verde (PDB 5dn6).

# Conclusiones

Se obtuvieron las mutantes de la subunidad  $\zeta$  T2\_D5del y  $\zeta$  T2\_R9del.

Ambas mutantes pierden su función inhibitoria. Por lo tanto, los aminoácidos dos al cinco, de la subunidad  $\zeta$  en su extremo amino son esenciales para que esta subunidad ejerza su función.

El mecanismo de inhibición de la subunidad  $\zeta$  debe recaer en las interacciones entre los primeros cinco residuos de  $\zeta$  y  $F_1$ . Esto sugiere que los residuos T2, T3 Y F4, permiten la función de  $\zeta$  al interactuar, ya sea con el rotor (T2 y T3 de  $\zeta$ , con la subunidad  $\gamma$ ), con la subunidad  $\beta_{TP}$  (F4 de  $\zeta$ ), o con ambos.

A partir de los datos experimentales y el análisis de los modelos estructurales se plantearon 3 posibles mecanismos de inhibición por la subunidad  $\zeta$  que profundizan en el conocimiento que se tenía hasta la fecha acerca de dicha forma de inhibición en la  $F_1F_0$  ATPasa de *P. denitrificans*.

# Perspectivas

- Comprobar experimentalmente la capacidad de las subunidades mutantes para competir contra la subunidad  $\zeta$  silvestre en la inhibición de la ATPasa. Para esto se planea emplear un ensayo de la actividad de hidrólisis de ATP con subunidades mutantes y silvestre simultáneamente.
- Comprobar experimentalmente la capacidad de las subunidades mutantes para interactuar con la ATPasa de *P. denitrificans*. Se propone emplear filtración en gel para dicho propósito, en un ensayo que evidencie la unión de las subunidades mutantes a la  $F_1$ .
- Para describir el correcto plegamiento de las subunidades mutantes se plantea la posibilidad de emplear técnicas como el dicróismo circular o lograr alguna colaboración con otros equipos de investigación para determinar la estructura de dichas mutantes.
- Conjuntar y analizar los datos generados en este proyecto con los resultados que se obtengan por los colegas del laboratorio para complementar el análisis del mecanismo de inhibición de la subunidad  $\zeta$ .
- A partir de lo concluido en esta tesis se propone realizar la siguiente serie de mutaciones para lograr definir puntualmente los residuos involucrados en la inhibición por  $\zeta$ :

Para discernir entre los 3 posibles mecanismos de inhibición propuestos en esta tesis se plantean las siguientes mutaciones:

- Sustituir a la fenilalanina 4 de  $\zeta$  (único contacto con  $\beta_{TP}$ ) por una alanina con el fin de interrumpir dicho contacto.
- Sustituir las treoninas 2 y 3 por alanina ya sea de forma independiente ( $\zeta T2A$ , o  $\zeta T3A$ ) o simultánea ( $\zeta T2\_T3delinsaa$ ) para eliminar los contactos entre  $\zeta$  y  $\gamma$ . A su vez, se podrían realizar las sustituciones correspondientes en  $\gamma$ , con la condición de evaluar que la actividad de ATPasa de  $F_1$  quede intacta.

- Como consideración final se debe tener presente la posibilidad de que la subunidad  $\zeta$  logre la inhibición gracias a una serie conjunta de contactos con  $F_1$ , dentro de los cuales cada uno de dichos contactos sea esencial. En otras palabras, que el remover uno solo de estos contactos sea suficiente para observar una pérdida de la función, lo cual sería una hipótesis alternativa para explicar la pérdida de la función en la subunidad  $\zeta$  T2\_D5del. Los resultados de los proyectos que se llevan a cabo simultáneamente en el laboratorio del Dr. García Trejo permitirán evaluar esta posibilidad.

# Referencias

- Adasme, M. F., Linnemann, K. L., Bolz, S. N., Kaiser, F., Salentin, S., Haupt, V. J., & Schroeder, M. (2021). PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W530–W534. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB294>
- Beijerinck, M. W., & Minkman, D. C. J. (1910). Bildung und verbrauch von stickoxydul durch bakterien. *Zentralblatt Fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten Und Hygiene Abteilung II*, *25*, 30–63.
- Benchimol, M., & de Souza, W. (2022). Giardia intestinalis and its endomembrane system\*. In *Journal of Eukaryotic Microbiology* (p. e12893). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/jeu.12893>
- Blum, T. B., Hahn, A., Meier, T., Davies, K. M., & Kühlbrandt, W. (2019). Dimers of mitochondrial ATP synthase induce membrane curvature and self-assemble into rows. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(10), 4250–4255. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816556116>
- Boreikaite, V., Wicky, B. I. M., Watt, I. N., Clarke, J., & Walker, J. E. (2019). Extrinsic conditions influence the self-association and structure of IF1, the regulatory protein of mitochondrial ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(21), 10354–10359. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903535116>
- Boyer, P. D. (1997). the Atp Synthase—a splendid molecular machine. *Annual Review of Biochemistry*, *66*(1), 717–749. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.717>
- Bravo, C., Minauro-Sanmiguel, F., Morales-Ríos, E., Rodríguez-Zavala, J. S., & García, J. J. (2004). Overexpression of the inhibitor protein IF1 in AS-30D hepatoma produces a higher association with mitochondrial F1F0 ATP

synthase compared to normal rat liver: functional and cross-linking studies. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2004 36:3, 36(3), 257–264. <https://doi.org/10.1023/B:JOB.0000031977.99479.EA>

Brito Sánchez, J. (2021). *Caracterización funcional de una proteína hipotética con dominio DUF1476 de Rhodobacter sphaeroides; posible actividad inhibitoria de la F1FO-ATPasa.* tesis que para optar por el grado de Maestro en Bioquímicas, presenta Jorge Brito Sánchez; tutor principal de tesis José de Jesús García Trejo [UNAM, Facultad de Química.] [132.248.9.195/ptd2021/junio/0812814/Index.html](https://132.248.9.195/ptd2021/junio/0812814/Index.html)

Burnap, R. L. (2022). Bioenergetics: To the dark side and back with cyanobacterial ATP synthase. *Current Biology*, 32(1), R34–R36. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.11.028>

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. <https://doi.org/10.1128/aem.45.4.1247-1253.1983>

Cingolani, G., & Duncan, T. M. (2011). Structure of the ATP synthase catalytic complex (F<sub>1</sub>) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 18(6), 701–707. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2058>

Davies, K. M., Strauss, M., Daum, B., Kief, J. H., Osiewacz, H. D., Rycovska, A., Zickermann, V., & Kühlbrandt, W. (2011). Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(34), 14121–14126. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103621108>

Davis, D. H., DOUDOROFF, M., STANIER, R. Y., & MANDEL, M. (1969). Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: Taxonomic implications. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 19(4), 375–390.

<https://doi.org/10.1099/00207713-19-4-375>

Domínguez-Ramírez, L., & Tuena de Gómez-Puyou, M. (2005). La F1F0 atp sintasa: Un complejo protéico con gran versatilidad estructural y funcional. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas TIP*, 8(1), 18–27. <https://biblat.unam.mx/es/revista/tip-revista-especializada-en-ciencias-quimico-biologicas/articulo/la-f1f0-atp-sintasa-un-complejo-proteico-con-gran-versatilidad-estructural-y-funcional>

Dunham, K. R., & Selman, B. R. (1981). Regulation of spinach chloroplast coupling factor 1 ATPase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 256(1), 212–218. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)70121-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)70121-5)

Feldman, R. I., & Boyer, P. D. (1985). The role of tightly bound ADP on chloroplast ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 260(24), 13088–13094. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)38842-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)38842-7)

Feniouk, B. A., Suzuki, T., & Yoshida, M. (2007). Regulatory interplay between proton motive force, ADP, phosphate, and subunit  $\epsilon$  in bacterial ATP synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 764–772. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606321200>

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>

Ferrándiz, M. J., & De La Campa, A. G. (2002). The membrane-associated F0F1 ATPase is essential for the viability of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters*, 212(1), 133–138. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00717-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00717-6)

Fitin, A. F., Vasilyeva, E. A., & Vinogradov, A. D. (1979). An inhibitory high affinity binding site for ADP in the oligomycin-sensitive ATPase of beef heart submitochondrial particles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 86(2), 434–439. <https://doi.org/10.1016/0006->

291X(79)90884-2

Flygaard, R. K., Mühleip, A., Tobiasson, V., & Amunts, A. (2020). Type III ATP synthase is a symmetry-deviated dimer that induces membrane curvature through tetramerization. *Nature Communications*, 11(1), 5342. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18993-6>

Fonseca, R. (2016). *GetContacts Interaction analysis for molecular structures and ensembles*. <https://getcontacts.github.io/>

Frangione, B., Rosenwasser, E., Penefsky, H. S., & Pullman, M. E. (1981). Amino acid sequence of the protein inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12), 7403. <https://doi.org/10.1073/PNAS.78.12.7403>

Gaimster, H., Alston, M., Richardson, D. J., Gates, A. J., & Rowley, G. (2018). Transcriptional and environmental control of bacterial denitrification and N<sub>2</sub>O emissions. *FEMS Microbiology Letters*, 365(5), 277. <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNX277>

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<sup>+</sup>-ATP synthase. *Cell Reports*, 12(12), 2143–2155. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.052>

García-Trejo, J. J., Zarco-Zavala, M., Mendoza-Hoffmann, F., Hernández-Luna, E., Ortega, R., & Mendoza-Hernández, G. (2016). The inhibitory mechanism of the  $\zeta$  subunit of the F<sub>1</sub>FO ATPase nanomotor of *Paracoccus denitrificans* and related  $\alpha$ -proteobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 291(2), 538–546. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.688143>

García, J. J., Morales-Ríos, E., Cortés-Hernández, P., & Rodríguez-Zavala, J. S. (2006). The inhibitor protein (IF1) promotes dimerization of the mitochondrial

F1F0-ATP synthase. *Biochemistry*, 45(42), 12695–12703. [https://doi.org/10.1021/BI060339J/ASSET/IMAGES/BI060339J.SOCIAL.JPEG\\_V03](https://doi.org/10.1021/BI060339J/ASSET/IMAGES/BI060339J.SOCIAL.JPEG_V03)

Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. In D. J. Brenner, N. R. Krieg, & J. R. Staley (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2 Edition). pp 127. Springer US. [27https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7](https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7)

Gu, J., Zhang, L., Zong, S., Guo, R., Liu, T., Yi, J., Wang, P., Zhuo, W., & Yang, M. (2019). Cryo-EM structure of the mammalian ATP synthase tetramer bound with inhibitory protein IF1. *Science*, 364(6445), 1068–1075. <https://doi.org/10.1126/science.aaw4852>

Guo, H., Courbon, G. M., Bueler, S. A., Mai, J., Liu, J., & Rubinstein, J. L. (2020). Structure of mycobacterial ATP synthase with the TB drug bedaquiline. *BioRxiv*, July, 2020.08.06.225375. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-3004-3>

Guo, H., & Rubinstein, J. L. (2022). Structure of ATP synthase under strain during catalysis. *Nature Communications*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29893-2>

Guo, H., Suzuki, T., & Rubinstein, J. L. (2019). Structure of a bacterial atp synthase. *ELife*, 8, 1–17. <https://doi.org/10.7554/eLife.43128>

Hahn, A., Vonck, J., Mills, D. J., Meier, T., & Kühlbrandt, W. (2018). Structure, mechanism, and regulation of the chloroplast ATP synthase. *Science*, 360(6389). <https://doi.org/10.1126/science.aat4318>

Herrera Romo, E. E. (2022). *Actualización del alineamiento y comparación de la estructura primaria de la subunidad zeta como inhibidor de la F1Fo-atpasa de  $\alpha$ -proteobacterias.* / trabajo monografico de actualización que para optar por el grado de Licenciado en Química Farmaceutico Biología, presenta Erick Enrique Herrera Romo ; tutor principal de tesis José de Jesús García UNAM.

- Hotra, A., Suter, M., Biukovic, G., Ragunathan, P., Kundu, S., Dick, T., & Grüber, G. (2016). Deletion of a unique loop in the mycobacterial F-ATP synthase  $\gamma$  subunit sheds light on its inhibitory role in ATP hydrolysis-driven  $H^+$  pumping. *FEBS Journal*, 283(10), 1947–1961. <https://doi.org/10.1111/febs.13715>
- Imamura, H., Huynh Nhat, K. P., Togawa, H., Saito, K., Iino, R., Kato-Yamada, Y., Nagai, T., & Noji, H. (2009). Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(37), 15651–15656. [https://doi.org/10.1073/PNAS.0904764106/SUPPL\\_FILE/0904764106SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.0904764106/SUPPL_FILE/0904764106SI.PDF)
- KEGG GENOME: *Paracoccus denitrificans*. (2022). [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_organism?org=T00440](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=T00440)
- Kühlbrandt, W. (2019). Structure and mechanisms of F-Type ATP synthases. *Annual Review of Biochemistry*, 88(7), 515–549.
- Lapashina, A. S., & Feniouk, B. A. (2018). ADP-Inhibition of  $H^+$ -FOF1-ATP Synthase. *Biochemistry (Moscow)*, 83(10), 1141–1160. <https://doi.org/10.1134/S0006297918100012>
- Liu, Y., Yu, J., Wang, M., Zeng, Q., Fu, X., & Chang, Z. (2020). A high-throughput genetically directed protein crosslinking analysis reveals the physiological relevance of the ATP synthase ‘inserted’ state. *FEBS Journal*, 1–21. <https://doi.org/10.1111/febs.15616>
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89160-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89160-4)
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K., Buckley, D. P., & Stahl, D. A. (2014). *Brock Biology of Microorganisms* (14 Edition). Benjamin-Cummings Pub Co.
- Mendoza-Hoffmann, F., Pérez-Oseguera, Á., Cevallos, M. Á., Zarco-Zavala, M.,

- Ortega, R., Peña-Segura, C., Espinoza-Simón, E., Uribe-Carvajal, S., & García-Trejo, J. J. (2018). The Biological role of the  $\zeta$  subunit as unidirectional inhibitor of the F1FO-ATPase of *Paracoccus denitrificans*. *Cell Reports*, 22(4), 1067–1078. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.12.106>
- Mendoza-Hoffmann, F., Zarco-Zavala, M., Ortega, R., Celis-Sandoval, H., Torres-Larios, A., & García-Trejo, J. J. (2022). Evolution of the inhibitory and non-inhibitory  $\epsilon$ ,  $\zeta$ , and IF1 subunits of the F1FO-ATPase as related to the endosymbiotic origin of mitochondria. *Microorganisms* 2022, Vol. 10, Page 1372, 10(7), 1372. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10071372>
- Mendoza-Hoffmann, F., Zarco-Zavala, M., Ortega, R., & García-Trejo, J. J. (2018a). Control of rotation of the F1FO-ATP synthase nanomotor by an inhibitory  $\alpha$ -helix from unfolded  $\epsilon$  or intrinsically disordered  $\zeta$  and IF1 proteins. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 50(5), 403–424. <https://doi.org/10.1007/s10863-018-9773-9>
- Mendoza-Hoffmann, F., Zarco-Zavala, M., Ortega, R., & García-Trejo, J. J. (2018b). Control of rotation of the F1FO-ATP synthase nanomotor by an inhibitory  $\alpha$ -helix from unfolded  $\epsilon$  or intrinsically disordered  $\zeta$  and IF1 proteins. In *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* (Vol. 50, Issue 5, pp. 403–424). Springer US. <https://doi.org/10.1007/s10863-018-9773-9>
- Mendoza-Hoffmann, F., Zarco Zavala, I. M., Peña-Segura, C., Uribe-Carvajal, S., Cevallos, M. Á., García-Trejo, J. J., Espinoza-Simón, E., & Pérez-Oseguera, Á. (2018). The Biological Role of the  $\zeta$  Subunit as Unidirectional Inhibitor of the F 1 F O -ATPase of *Paracoccus denitrificans*. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.106>
- Mendoza Hoffmann, F. G. (2018). *Rol biológico de la subunidad  $\zeta$  como un inhibidor unidireccional de la F1Fo-ATPasa de Paracoccus denitrificans* / tesis que para optar por el grado de Doctor en Bioquímicas, presenta Francisco Guillermo Mendoza Hoffmann ; tutor principal de tesis José de Jesús García Trejo [UNAM, Facultad de Química].

<http://132.248.9.195/ptd2018/octubre/0781506/Index.html>

- Mills, J. D., & Mitchell, P. (1982). Modulation of coupling factor ATPase activity in intact chloroplasts. Reversal of thiol modulation in the dark. *BBA - Bioenergetics*, 679(1), 75–83. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(82\)90257-2](https://doi.org/10.1016/0005-2728(82)90257-2)
- Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S., & Garcia, J. J. (2005). Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: Novel F<sub>0</sub> bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(35), 12356–12358. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503893102>
- Minkov, I. B., Fitin, A. F., Vasilyeva, E. A., & Vinogradov, A. D. (1979). Mg<sup>2+</sup>-Induced ADP-dependent inhibition of the ATPase activity of beef heart mitochondrial coupling factor F<sub>1</sub>. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 89(4), 1300–1306. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(79\)92150-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(79)92150-8)
- Morales-Ríos, E., de la Rosa-Morales, F., Mendoza-Hernández, G., Rodríguez-Zavala, J. S., Celis, H., Zarco-Zavala, M., & García-Trejo, J. J. (2009). A novel 11-kDa inhibitory subunit in the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related  $\alpha$ -proteobacteria. *The FASEB Journal*, 24(2), 599–608. <https://doi.org/10.1096/fj.09-137356>
- Morales-Rios, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (2015). Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(43), 13231–13236. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517542112>
- Morales, R. E. (2011). *Clonación, sobre-expresión, purificación y caracterización de las subunidades épsilon y de 11KDA presentes en la ATP sintasa de Paracoccus denitrificans* Tesis que para optar por el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas, presenta Edgar Morales Ríos; tutor principal de tesis

José de Jesús García Trejo [UNAM, Facultad de Química].  
[http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/6FICLDPBLLVNICBU117VQ52Y3TSGFP11QDS56GF1HMALE2HKXQ-62077?func=full-set-set&set\\_number=026980&set\\_entry=000001&format=999](http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/6FICLDPBLLVNICBU117VQ52Y3TSGFP11QDS56GF1HMALE2HKXQ-62077?func=full-set-set&set_number=026980&set_entry=000001&format=999)

Mühleip, A., Kock Flygaard, R., Ovcariakova, J., Lacombe, A., Fernandes, P., Sheiner, L., & Amunts, A. (2021). ATP synthase hexamer assemblies shape cristae of *Toxoplasma* mitochondria. *Nature Communications*, 12(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-20381-z>

Murphy, B. J., Klusch, N., Langer, J., Mills, D. J., Yildiz, Ö., & Kühlbrandt, W. (2019). Rotary substates of mitochondrial ATP synthase reveal the basis of flexible F1-Fo coupling. In *Science* (Vol. 364, Issue 6446).  
<https://doi.org/10.1126/science.aaw9128>

Nesci, S., Trombetti, F., Ventrella, V., & Pagliarani, A. (2016). The c-ring of the F1FO-ATP synthase: Facts and perspectives. *Journal of Membrane Biology*, 249(1–2), 11–21. <https://doi.org/10.1007/s00232-015-9860-3>

Nicholls, D. G., & Ferguson, S. (2013). Bioenergetics. In *Bioenergetics: Fourth Edition* (4 Edition). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-64902-9>

Nicholls, D. G., & Ferguson, S. J. (Stuart J. (2002). *Bioenergetics 3* (3 edition). Academic Press.

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

Pacheco-Moisés, F., Garcia, J. J., Rodríguez-Zavala, J. S., & Moreno-Sánchez, R. (2000). Sulfite and membrane energization induce two different active states of the *Paracoccus denitrificans* F0F1-ATPase. *European Journal of Biochemistry*, 267(4), 993–1000. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01088.x>

- Papa, S. (1996). Identification of functional domains and critical residues in the adenosinetriphosphatase inhibitor protein of mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>, ATP synthase. *European Journal of Biochemistry*, 240(2), 461–467. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1996.0461H.X>
- Paracoccus denitrificans* (ID 1658) - Genome - NCBI. (2022). [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid266\[orgn\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid266[orgn])
- Paumard, P., Vaillier, J., Â ne Â dicte Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., MMueller, D., Bre Á thes, 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>
- Pérez, J. A., & Ferguson, S. J. (1990). Kinetics of Oxidative Phosphorylation in *Paracoccus denitrificans*. 1. Mechanism of ATP Synthesis at the Active Site(s) of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase. *Biochemistry*, 29(46), 10503–10518. <https://doi.org/10.1021/BI00498A013>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, 30(1), 70–82. <https://doi.org/10.1002/PRO.3943>
- Pinke, G., Zhou, L., & Sazanov, L. A. (2020). Cryo-EM structure of the entire mammalian F-type ATP synthase. *Nature Structural and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0503-8>
- Preiss, L., Langer, J. D., Hicks, D. B., Liu, J., Yildiz, Ö., Krulwich, T. A., & Meier, T. (2014). The c-ring ion binding site of the ATP synthase from *Bacillus pseudofirmus* 0F4 is adapted to alkaliphilic lifestyle. *Molecular Microbiology*, 92(5), 973–984. <https://doi.org/10.1111/mmi.12605>
- Pullman, M. E., & Monroy, G. C. (1963). a Naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine. *The Journal of Biological Chemistry*, 238(11), 3762–3769.

- Pullman, M. E., Penefsky, H. S., Datta, A., & Racker, E. (1960). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 235(11), 3322–3329.
- Revington, M., Dunn, S. D., & Shaw, G. S. (2002). Folding and stability of the b subunit of the F1F0 ATP synthase. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 11(5), 1227. <https://doi.org/10.1110/PS.3200102>
- Rosa Morales, M. F. de la. (2005). *Composicion de subunidades y mecanismos de regulacion de la F1Fo ATP sintasa de Paracoccus denitrificans* / tesis que para optar por el grado de Maestria en Ciencias Bioquímicas, presenta Fernanda de la Rosa Moeales ; tutor principal de tesis José de Jesús García [UNAM, Facultad de Ciencias]. [http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/9RAK396916LCTN5DRCCH2MNNDT7LBRFF5HGGN42H3UGPDMMKUC-17941?func=full-set-set&set\\_number=022884&set\\_entry=000011&format=999](http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/9RAK396916LCTN5DRCCH2MNNDT7LBRFF5HGGN42H3UGPDMMKUC-17941?func=full-set-set&set_number=022884&set_entry=000011&format=999)
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14(3), 225-IN6. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3)
- Sánchez-Aragó, M., Formentini, L., Martínez-Reyes, I., García-Bermudez, J., Santacatterina, F., Sánchez-Cenizo, L., Willers, I. M., Aldea, M., Nájera, L., Juarránz, Á., López, E. C., Clofent, J., Navarro, C., Espinosa, E., & Cuezva, J. M. (2013). Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers. *Oncogenesis 2013 2:4*, 2(4), e46–e46. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.9>
- Schäfer, G., & Penefsky, H. S. (2008). Bioenergetics: energy conservation and conversion . Introduction. In *Results and problems in cell differentiation* (Vol. 45).
- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>

- Serrano, P., Geralt, M., Mohanty, B., & Wüthrich, K. (2014). NMR structures of  $\alpha$ -proteobacterial ATPase-Regulating  $\zeta$ -subunits. *Journal of Molecular Biology*, 426(14), 2547–2553. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.05.004>
- Shirakihara, Y., Shiratori, A., Tanikawa, H., Nakasako, M., Yoshida, M., & Suzuki, T. (2015). Structure of a thermophilic F1-ATPase inhibited by an  $\epsilon$ -subunit: Deeper insight into the  $\epsilon$ -inhibition mechanism. *FEBS Journal*, 282(15), 2895–2913. <https://doi.org/10.1111/febs.13329>
- Sielaff, H., Dienerowitz, F., & Dienerowitz, M. (2022). Single-molecule FRET combined with electrokinetic trapping reveals real-time enzyme kinetics of individual F-ATP synthases. *Nanoscale*. <https://doi.org/10.1039/d1nr05754e>
- Sobti, M., Ishmukhametov, R., Bouwer, J. C., Ayer, A., Suarna, C., Smith, N. J., Christie, M., Stocker, R., Duncan, T. M., & Stewart, A. G. (2019). Cryo-EM reveals distinct conformations of *E. coli* ATP synthase on exposure to ATP. *ELife*, 8, 1–16. <https://doi.org/10.7554/eLife.43864>
- Sobti, M., Smits, C., Wong, A. S. W., Ishmukhametov, R., Stock, D., Sandin, S., & Stewart, A. G. (2016). Cryo-EM structures of the autoinhibited *E. coli* ATP synthase in three rotational states. *ELife*, 5(DECEMBER2016), 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.21598>
- Sobti, M., Ueno, H., Noji, H., & Stewart, A. G. (2021). The six steps of the complete F1-ATPase rotary catalytic cycle. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25029-0>
- Sobti, M., Walshe, J. L., Wu, D., Ishmukhametov, R., Zeng, Y. C., Robinson, C. V., Berry, R. M., & Stewart, A. G. (2020). Cryo-EM structures provide insight into how *E. coli* F1Fo ATP synthase accommodates symmetry mismatch. *Nature Communications*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16387-2>
- Song, K., Baumgartner, D., Hagemann, M., Muro-Pastor, A. M., Maaß, S., Becher, D., & Hess, W. R. (2022). Atp $\Theta$  is an inhibitor of F0F1 ATP synthase to arrest ATP hydrolysis during low-energy conditions in cyanobacteria. *Current*

*Biology*, 32(1), 136-148.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.10.051>

Sternweis, P. C., & Smith, J. B. (1980). Characterization of the Inhibitory ( $\epsilon$ ) Subunit of the Proton-Translocating Adenosine Triphosphatase from *Escherichia Coli*. *Biochemistry*, 19(3), 526–531. <https://doi.org/10.1021/bi00544a021>

Tabor, S., & Richardson, C. C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(4), 1074. <https://doi.org/10.1073/PNAS.82.4.1074>

Tsunoda, S. P., Rodgers, A. J. W., Aggeler, R., Wilce, M. C. J., Yoshida, M., & Capaldi, R. A. (2001). Large conformational changes of the  $\epsilon$  subunit in the bacterial F1F0 ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), 6560–6564. <https://doi.org/10.1073/pnas.111128098>

Tuena de Gómez Puyou, M., & Trejo, J. J. G. (2015). La bioenergética, las mitocondrias y la fosforilación oxidativa. *Revista Digital Universitaria*, 16, 1–15. <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num1/art5/>

Ugurbil, K., Rottenberg, H., Glynn, P., & Shulman, R. G. (1978). <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance studies of bioenergetics and glycolysis in anaerobic *Escherichia coli* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(5), 2244–2248. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.5.2244>

Van Raaij, M. J., Orriss, G. L., Montgomery, M. G., Runswick, M. J., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., & Walker, J. E. (1996). The ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria: The minimal inhibitory sequence. *Biochemistry*, 35(49), 15618–15625. <https://doi.org/10.1021/bi960628f>

Yagi, H., Kajiwara, N., Tanaka, H., Tsukihara, T., Kato-Yamada, Y., Yoshida, M., &

- Akutsu, H. (2007). Structures of the thermophilic F1-ATPase  $\epsilon$  subunit suggesting ATP-regulated arm motion of its C-terminal domain in F1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27), 11233–11238. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0701045104>
- Yang, J. H., Williams, D., Kandiah, E., Fromme, P., & Chiu, P. L. (2020). Structural basis of redox modulation on chloroplast ATP synthase. *Communications Biology*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01221-8>
- Ye, J., An, N., Chen, H., Ying, Z., Zhang, S., & Zhao, J. (2020). Performance and mechanism of carbon dioxide fixation by a newly isolated chemoautotrophic strain *Paracoccus denitrificans* PJ-1. *Chemosphere*, 252. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.126473>
- Yoshida, M., & Allison, W. S. (1983). Modulation by ADP and Mg<sup>2+</sup> of the inactivation of the F1-ATPase from the thermophilic bacterium, PS3, with dicyclohexylcarbodiimide. *Journal of Biological Chemistry*, 258(23), 14407–14412. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)43876-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)43876-2)
- Yoshida, T., Kakizuka, A., & Imamura, H. (2016). BTeam, a Novel BRET-based Biosensor for the Accurate Quantification of ATP Concentration within Living Cells. *Scientific Reports*, 6(October), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep39618>
- Yurkanis Bruice, P. (2013). *Organic Chemistry* (A. Jaworski & Jeanne Zalesky (Eds.); 7 Edition). Pearson.
- Zanotti, F., Raho, G., Gaballo, A., & Papa, S. (2004). Inhibitory and anchoring domains in the ATPase inhibitor protein IF 1 of bovine heart mitochondrial ATP synthase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36(5), 447–457. <https://doi.org/10.1023/B:JOB.0000047327.68173.9b>
- Zarco-Zavala, M., Morales-Ríos, E., Mendoza-Hernández, G., Ramírez-Silva, L., Pérez-Hernández, G., & García-Trejo, J. J. (2014). The  $\zeta$  subunit of the F1FO-ATP synthase of  $\alpha$ -proteobacteria controls rotation of the nanomotor with a different structure. *FASEB Journal*, 28(5), 2146–2157.

<https://doi.org/10.1096/fj.13-241430>

Zarco-Zavala, M., Morales-Ríos, E., Serrano-Navarro, P., Wüthrich, K., Mendoza-Hernández, G., Ramírez-Silva, L., & García-Trejo, J. J. (2013a). Erratum: The  $\zeta$  subunit of the  $\alpha$ -proteobacterial F<sub>1</sub>FO-ATP synthase in *Paracoccus denitrificans*: A novel control mechanism of the central rotor (Biochim. Biophys. Acta 1817S (2012) (S27-S28)). *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1827(1), 60. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.09.010>

Zarco-Zavala, M., Morales-Ríos, E., Serrano-Navarro, P., Wüthrich, K., Mendoza-Hernández, G., Ramírez-Silva, L., & García-Trejo, J. J. (2013b). Corrigendum to “The  $\zeta$  subunit of the  $\alpha$ -proteobacterial F<sub>1</sub>FO-ATP synthase in *Paracoccus denitrificans*: A novel control mechanism of the central rotor” [Biochim. Biophys. Acta 1817S (2012) S27–S28]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(1), 60. <https://doi.org/10.1016/J.BBABI.2012.09.010>

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* F<sub>1</sub>-ATPase is different from that of the bacterial and mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(47), 29647–29657. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2003163117/-/DCSUPPLEMENTAL>

Zarco Zavala, I. M. (2014). *Caracterización del nuevo mecanismo de control de la f1f0 atpasa de la alfa - proteobacteria paracoccus denitrificans mediado por la subunidad zeta/ Tesis que para optar por el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas, presenta Ilse Mariel Zarco Zavala ; tutor principal de tesis José de Jesús García Trejo [UNAM, Facultad de Química].* [http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/9RAK396916LCTN5DRCCH2MNDT7LBRFF5HGGN42H3UGPDMMJKUC-05154?func=full-set-set&set\\_number=022734&set\\_entry=000003&format=999](http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/9RAK396916LCTN5DRCCH2MNDT7LBRFF5HGGN42H3UGPDMMJKUC-05154?func=full-set-set&set_number=022734&set_entry=000003&format=999)

Zharova, T. V., & Vinogradov, A. D. (2003). *of Paracoccus denitrificans: ATP Hydrolytic Activity*. 68(10).

Zubareva, V. M., Lapashina, A. S., Shugaeva, T. E., Litvin, A. V., & Feniouk, B. A. (2020). Rotary Ion-Translocating ATPases/ATP Synthases: Diversity, Similarities, and Differences. *Biochemistry. Biokhimiia*, *85*(12), 1613–1630. <https://doi.org/10.1134/S0006297920120135>

# Anexos

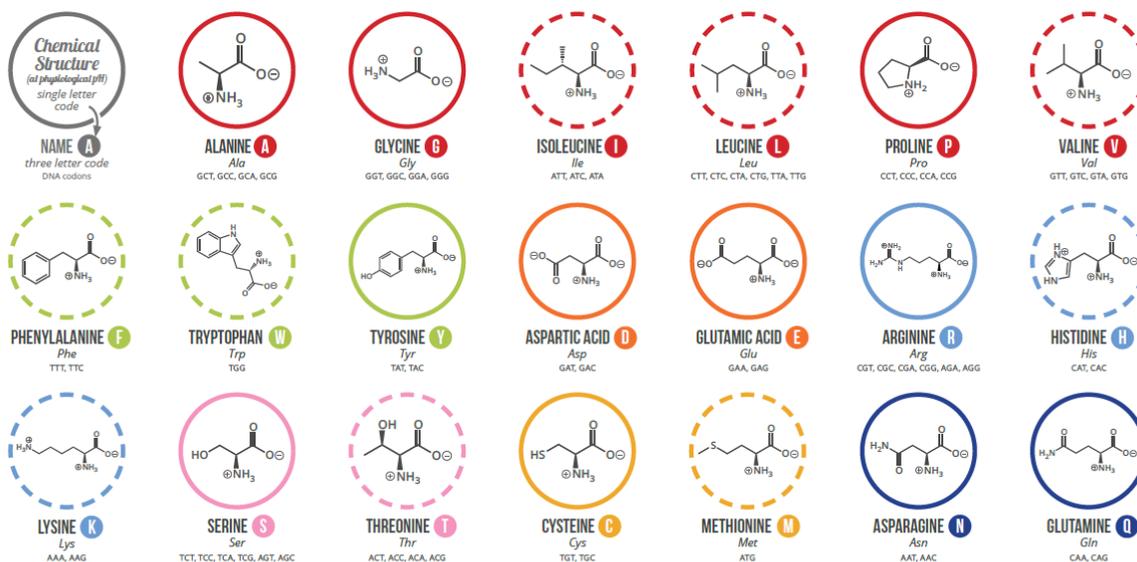
## Anexo I

Abreviaturas y estructuras de los 20 aminoácidos comunes. Créditos en la figura.

# A GUIDE TO THE TWENTY COMMON AMINO ACIDS

AMINO ACIDS ARE THE BUILDING BLOCKS OF PROTEINS IN LIVING ORGANISMS. THERE ARE OVER 500 AMINO ACIDS FOUND IN NATURE - HOWEVER, THE HUMAN GENETIC CODE ONLY DIRECTLY ENCODES 20. 'ESSENTIAL' AMINO ACIDS MUST BE OBTAINED FROM THE DIET, WHILST NON-ESSENTIAL AMINO ACIDS CAN BE SYNTHESISED IN THE BODY.

**Chart Key:** ● ALIPHATIC ● AROMATIC ● ACIDIC ● BASIC ● HYDROXYLIC ● SULFUR-CONTAINING ● AMIDIC ○ NON-ESSENTIAL ○ ESSENTIAL



**Note:** This chart only shows those amino acids for which the human genetic code directly codes for. Selenocysteine is often referred to as the 21st amino acid, but is encoded in a special manner. In some cases, distinguishing between asparagine/aspartic acid and glutamine/glutamic acid is difficult. In these cases, the codes asx (B) and glx (Z) are respectively used.

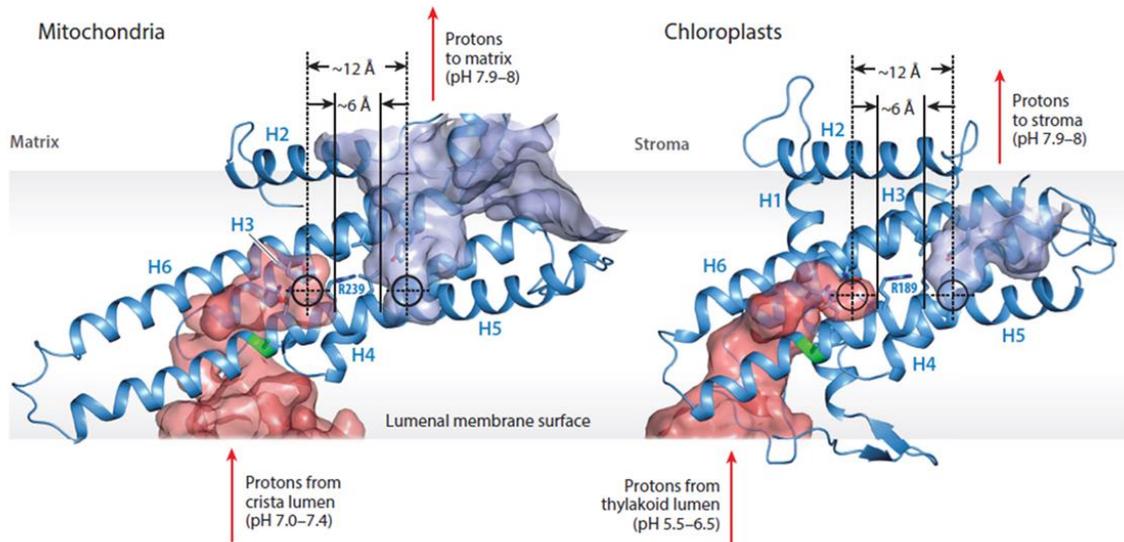
© COMPOUND INTEREST 2014 - WWW.COMPOUNDCHEM.COM | Twitter: @compoundchem | Facebook: www.facebook.com/compoundchem  
Shared under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives licence.



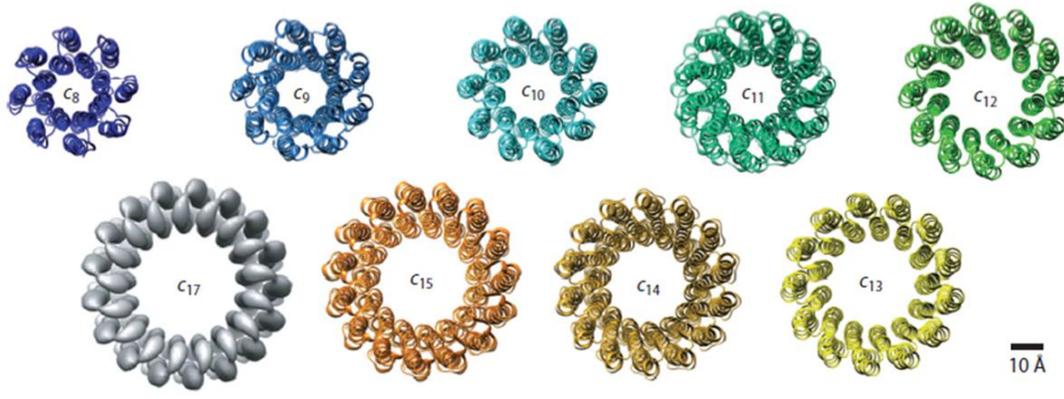
## Anexo II

### Hemicanales y anillo de subunidades c

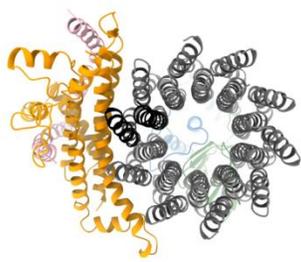
a)



b)



c)



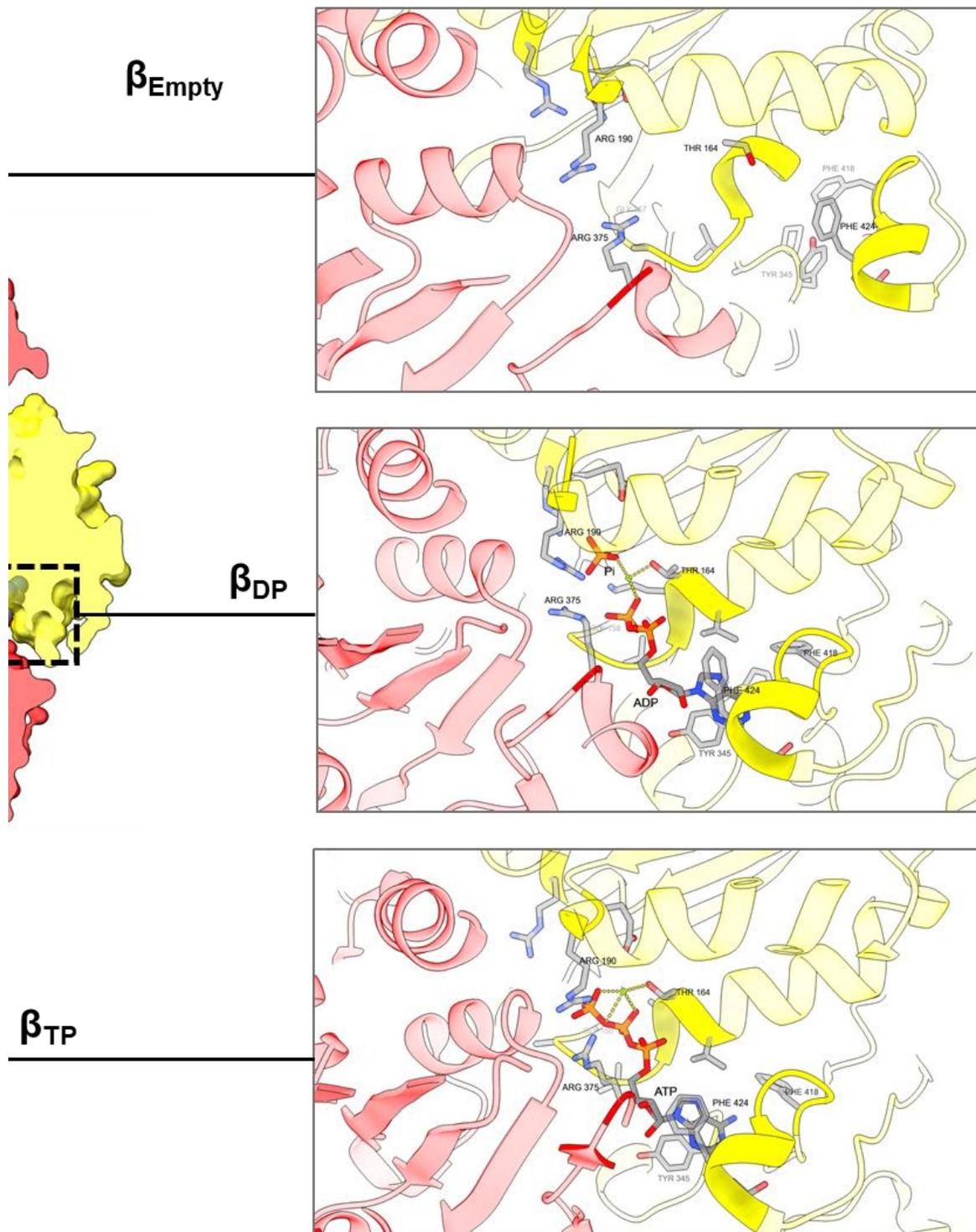
### Hemicanales y anillo de subunidades c

a) detalle de los Hemicanales en mitocondria (izquierda) y cloroplasto (derecha). b) Anillos de subunidades c de diferentes especies y tamaños. (Kühlbrandt, Et al., 2019) c) vista inferior (desde F<sub>0</sub> a F<sub>1</sub>) del anillo de subunidades c. El movimiento se ejemplifica con una animación en el video suplementario 2 de (Sobti, Et al., 2020): <https://www.nature.com/articles/s41467-020-16387-2#Sec15>

Anexo III

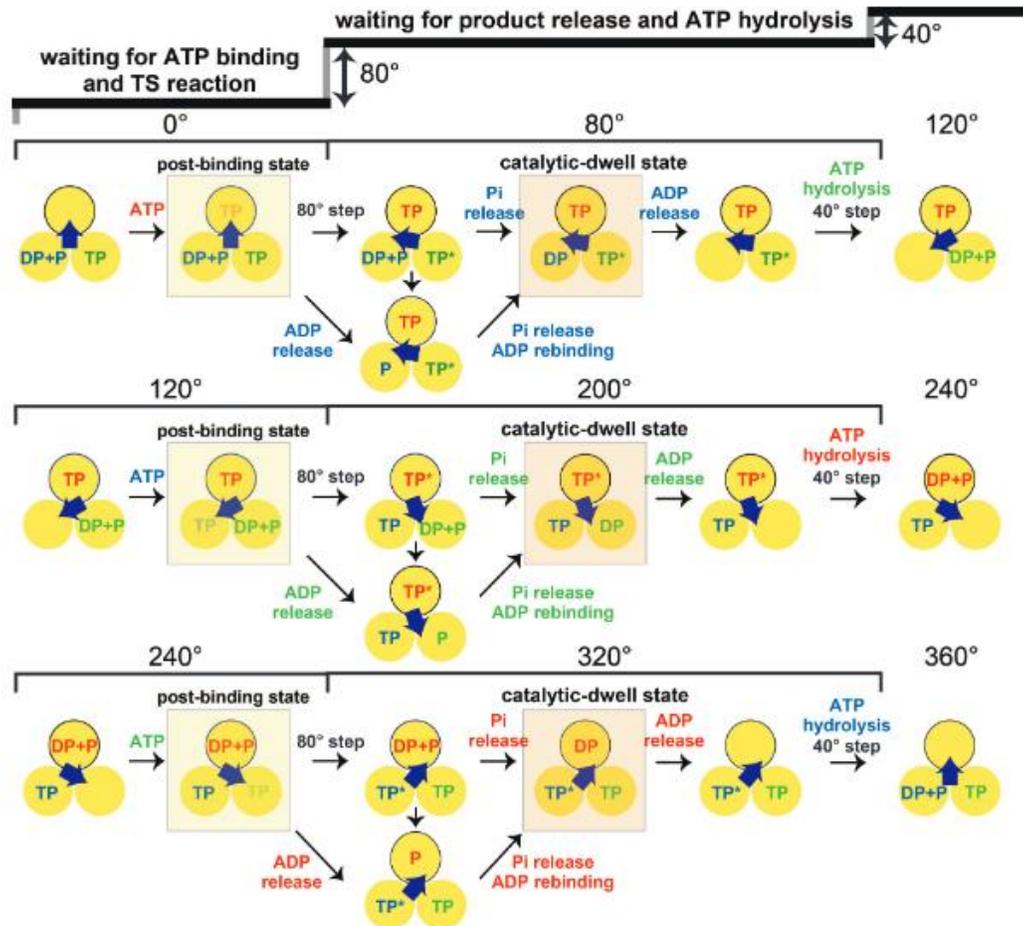
Amplificación de la figura 9:

Sitios catalíticos:



## Anexo IV

Esquema detallado de los pasos del ciclo catalítico de la ATPasa. Tomado del material suplementario de (Sobti et al., 2021)

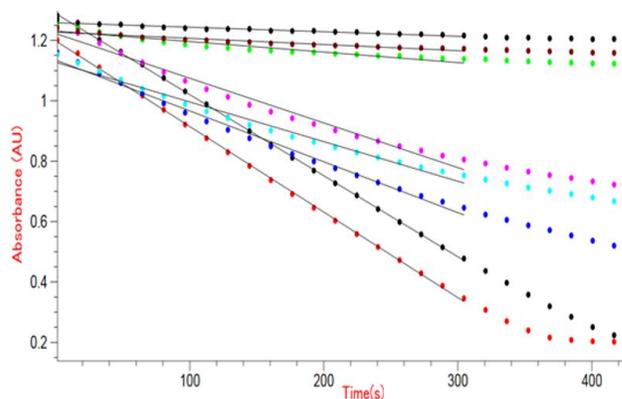


## Anexo V

### Resumen de datos crudos de los ensayos de hidrólisis de ATP.

Actividades		primera	duplicado	triplicado	promedio ponderado
-	[ ] uM preincubacion	actividad esp (uM/min*mg)	actividad esp (uM/min*mg)	actividad esp (uM/min*mg)	%
-	0	0.524115756	0.294186495	0.303603613	-
-	0	0.549839228	0.277987138	0.323726096	-
-	promedio de 0	0.536977492	0.286086817	0.313664854	100
z wild type	0.5	0.321543408	0.244659164	0.246644314	71.50752461
z wild type	1	0.247588424	0.18521865	0.216451599	57.11639098
z wild type	1.5	-	0.147167203	0.21287866	56.73588247
z wild type	5	0.057234727	0.050096463	0.070743781	15.66555835
z wild type	8	0.035691318	0.029749518	0.042621425	9.506421095
z wild type	15	0.025209003	0.02183119	0.027851582	6.588356988
experimentos subunidades mutantes					
muestra	[ ] uM z	actividad esp (uM/min*mg)	actividad esp (uM/min*mg)	actividad esp (uM/min*mg)	%
control sin zeta	0	0.450160772	0.323215434	0.355916399	-
control sin zeta	0	-	0.289659164	0.317881029	-
zeta wt pd	15	0.022057878	-	-	-
prom 0		0.450160772	0.306437299	0.336898714	100
z -4aa 1uM	1	0.405144695	0.288138264	0.311881029	91.92198837
z-4aa 5uM	5	0.437299035	0.290086817	0.294212219	93.42488109
z-4aa 15uM	15	0.495176849	0.281707395	0.27922508	96.58092641
z-8aa 1uM	1	0.434083601	0.267244373	0.295199357	91.1321684
z-8aa 5uM	5	0.40192926	0.263102894	0.280411576	86.46058619
z-8aa 15uM	15	0.430868167	0.258491961	0.272237942	87.93789651
experimentos con mutantes hasta 20 ug					
muestra	[ ] uM z	primera	duplicado	triplicado	promedio ponderado (%)
z-4AA 20ug	35.70001	0.810836013	0.879453376	-	92.8555447
control sin zeta	0	0.933954984	0.916173633	0.880385852	96.72746971
z-8AA 20ug	37.56609284	0.0018511	0.0019416	-	121.9439264
control sin zeta	0	0.0016195	0.0014907	-	100
z wt (experimento 1)	34.27885851	0.019801	0.020261	-	2.226064014
z wt (experimento 2)	34.27885851	0.00040795	0.00035192	-	22.63005594

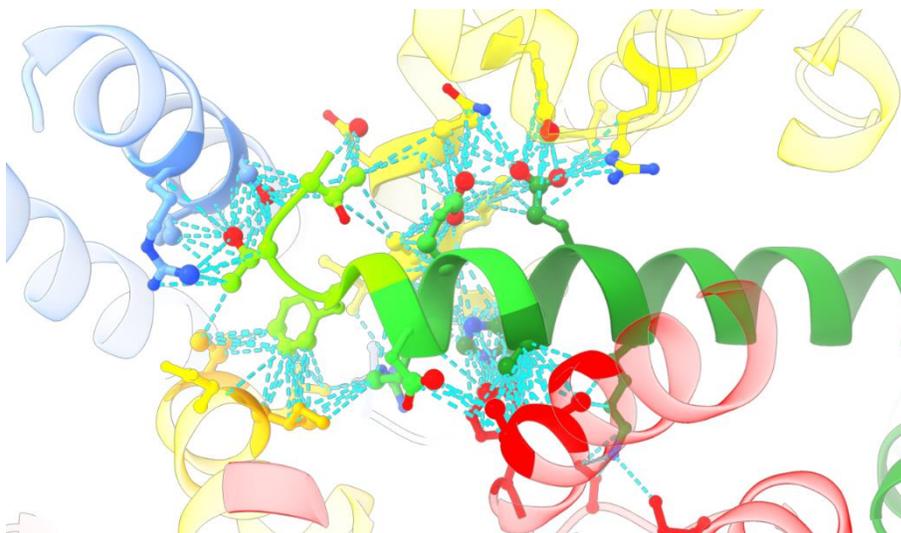
Ejemplo de un curso temporal de actividad de hidrólisis de ATP en medio regenerante con diferentes concentraciones de inhibidor:



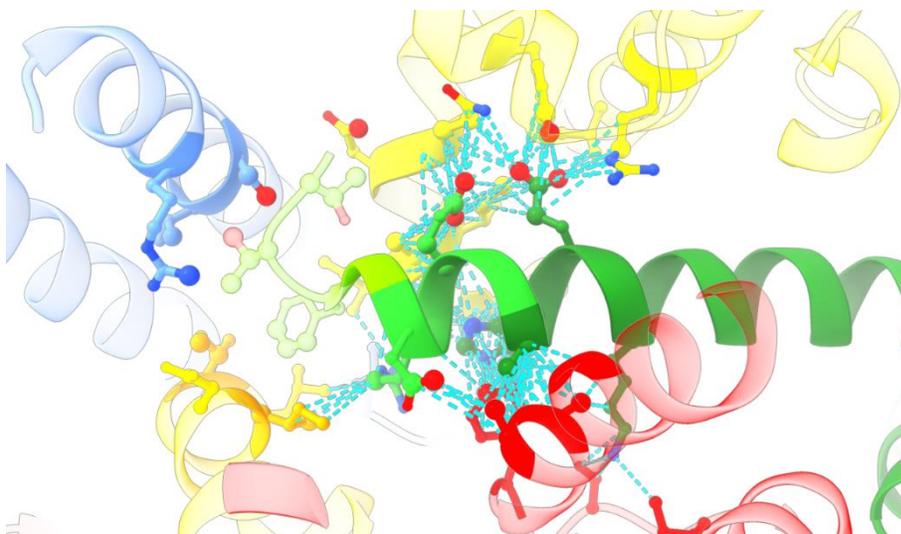
## Anexo VI

Modelos de la figura 38 en un tamaño mayor.

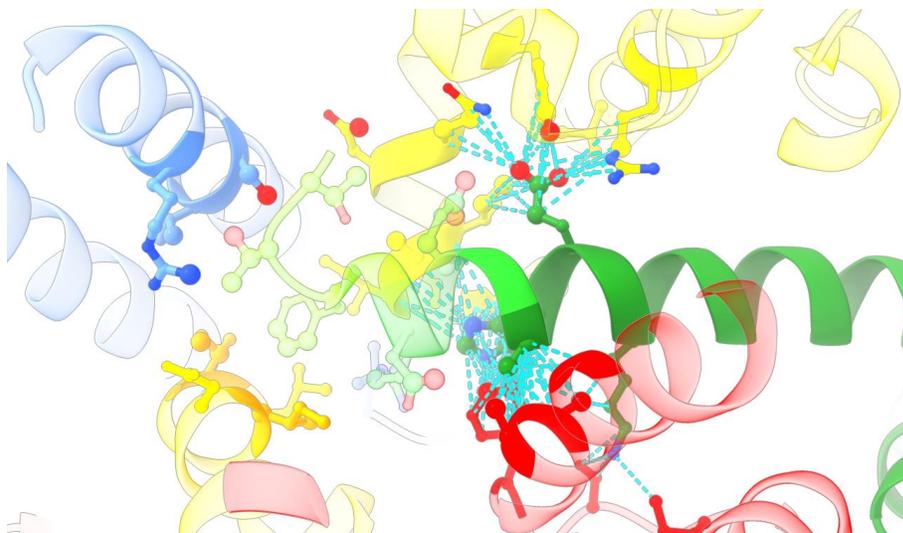
Subunidad  $\zeta$  silvestre:



Subunidad  $\zeta$  T2\_D5del:



Subunidad  $\zeta$  T2\_R9del:



Subunidad  $\zeta$  T2\_A13del:

