



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**HISTORIA NATURAL Y DISTRIBUCIÓN FILÉTICA DE LAS SUBUNIDADES
ACCESORIAS RESPONSABLES DE LA FORMACIÓN DE DÍMEROS DE LA F1FO-
ATP SINTASA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. EXP. HERNÁNDEZ ZÚÑIGA JOSÉ ALFREDO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. HÉCTOR RIVEROS ROSAS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. OSCAR FLORES HERRERA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. AGOSTO, 2023



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**HISTORIA NATURAL Y DISTRIBUCIÓN FILÉTICA DE LAS SUBUNIDADES
ACCESORIAS RESPONSABLES DE LA FORMACIÓN DE DÍMEROS DE LA F1FO-
ATP SINTASA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. EXP. HERNÁNDEZ ZÚÑIGA JOSÉ ALFREDO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. HÉCTOR RIVEROS ROSAS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. OSCAR FLORES HERRERA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. AGOSTO, 2023

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/406/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **28 de noviembre de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del estudiante **HERNÁNDEZ ZUÑIGA JOSÉ ALFREDO** con número de cuenta **520019287** con la tesis titulada "**HISTORIA NATURAL Y DISTRIBUCIÓN FILÉTICA DE LAS SUBUNIDADES ACCESORIAS RESPONSABLES DE LA FORMACIÓN DE DíMEROS DE LA F1FO-ATP SINTASA**", realizada bajo la dirección del **DR. HÉCTOR RIVEROS ROSAS**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO
Vocal: DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN
Vocal: DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO
Vocal: DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL
Secretario: DR. OSCAR FLORES HERRERA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 16 de mayo de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos Institucionales

Primeramente, al Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por permitirme formarme y llevar a cabo mi investigación en tan prestigiosa institución. A la facultad de medicina por recibirme en sus instalaciones.

A continuación, a los apoyos económicos recibidos sin los cuales hubiera sido imposible llevar a cabo este trabajo (beca CONACYT 1033911, apoyo a Proyectos de Investigación PAPIIT IN218819 y IN219022 así como al Comité Organizador del XXII Congreso de Bioenergética y Biomembranas de la Sociedad Mexicana de Bioquímica por el apoyo para la asistencia al congreso.

A mi tutor el Dr. Héctor Riveros Rosas a quien agradezco que me brindó las herramientas que necesitaba para el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Oscar Flores Herrera, con quien me inicié en la investigación, así como el estudio de las ATP sintasas.

Al Dr. Enrique García Hernández por sus comentarios, esenciales para retroalimentar este trabajo.

Agradecimientos A Título Personal

A mi tutor el Dr. Héctor Riveros Rosas quien me dio muestras constantes de apoyo y compromiso con el trabajo desde que iniciamos el proyecto. Jamás dejé de sentir su apoyo tanto académico como personal. Muchas gracias doctor.

Al Dr. Federico Martínez y a la Biól. Exp. Sofía Olvera Sánchez. Quienes me abrieron la puerta al Lab 5 cuando inicié mi formación.

Al Dr. Oscar Flores Herrera y la Dra. Mercedes Esparza Perusquía por recibirme en el 5bis (en ese entonces) y al apoyo de mis amistades que hice ahí y que todavía conservo.

Dedicatoria.

A quienes son mi soporte, mi lugar seguro y mi apoyo en todo momento. Para mi familia.

Índice

Lista de Figuras

Lista de Tablas

Índice de abreviaturas

Resumen	1
Abstract	2
1 Introducción	3
1.1 La mitocondria como organelo esencial en eucariotes.....	3
1.1.1 Endosimbiosis y otros eventos clave en el origen de las mitocondrias y la evolución de los eucariotas	3
1.1.2 La estructura mitocondrial es dinámica y es modificada acorde a los requerimientos energéticos	7
1.2 Vías metabólicas involucradas en la obtención de ATP a partir de la glucosa.....	11
1.2.1 Glucólisis. Vía metabólica citosólica preparativa para la obtención de ATP	11
1.2.2 Fermentación alcohólica ó láctica del piruvato	15
1.2.3 Oxidación del piruvato para la obtención de Acetil Co A	15
1.2.4 Ciclo de Krebs	16
1.2.5 Cadena de transporte de electrones	20
1.3. La familia de las ATPasas/ATP sintasas rotatorias translocadoras de iones.....	26
1.3.1 ATPasas/ATP sintasas rotatorias translocadoras de iones	26
1.3.2 Particularidades de la composición de las ATP sintasas	33
2 Hipótesis	40
3 Objetivos	40
3.1 Objetivo General.....	40
3.2 Objetivos Específicos	40
4 Metodología	41
5 Evidencia experimental	43
5.1 Las ATP sintasas mitocondriales como moduladores de la formación de las crestas mitocondriales.....	43
5.1.1 Modelo de Allen de la cresta mitocondrial y la Electroforesis nativa (BN-PAGE) como primeros antecedentes	43
5.1.2 Diferentes tipos de dímeros de la F₁F₀-ATP sintasa (V₂) han sido descritos en distintos linajes	43
5.1.2.1 Evidencias del V ₂ tipo I	43

5.1.2.2 Elucidación de composición de la F_1F_0 ATP sintasa en otros organismos eucariotes.	44
5.1.2.3 Evidencias del V_2 tipo II.....	51
5.1.2.4 V_2 en forma de U presente en el V_2 tipo III encontrado en <i>Tetrahymena thermophila</i> y en <i>Paramecium tetraurelia</i>	51
5.1.2.5 V_2 tipo IV: <i>Euglena gracilis</i> y <i>T. brucei</i> comparten otras subunidades atípicas en su V_2	52
5.1.2.6 Hexámeros de la ATP sintasa presente en <i>Toxoplasma gondii</i>	53
6 Resultados	62
6.1 Subunidad γ	62
6.2 Subunidad g	64
6.3 Subunidad e	73
6.4 Subunidad i/j.....	81
6.5 Subunidad k.	85
7 Discusión	90
8 Conclusiones	95
9 Referencias bibliográficas	96

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema sobre la evolución de los plástidos obtenidos a través de endosimbiosis secundaria.....	6
Figura 2. Esquema que detalla las partes de la mitocondria.....	7
Figura 3. Productos obtenidos en las reacciones de la glucólisis.....	14
Figura 4. Esquema que resume los ocho pasos del ciclo de Krebs.....	19
Figura 5. Esquema que resume la síntesis de ATP a través de un mecanismo quimiosmótico.....	24
Figura 6. Esquema que muestra por color la relación entre las subunidades de las ATP sintasas de distintos organismos y la relación de la enzima con la actividad fisiológica.....	31
Figura 7. La relación filogenética más probable de las subunidades β (A en ATP sintasa tipo A y tipo V) y α (B en ATP sintasa tipo A y V) de las ATP sintasas.....	34
Figura 8. La sola presencia del V_2 de <i>Polytomella</i> sp y <i>Y lipolytica</i> provoca una curvatura de los proteoliposomas.....	38
Figura 9. Conservación de las subunidades de la F_1F_0 ATP sintasa dentro de 759 especies.....	45
Figura 10. Visualización de la triple hélice en forma de cuña del dímero tipo I entre las subunidades e, g y b.....	47
Figura 11. Visualización del modelo del V_2 obtenido por crio-EM en bovino en comparación con el V_2 de <i>S. cerevisiae</i>	49
Figura 12. Presencia de genes de subunidades involucradas en la formación del tallo periférico y la dimerización en eucariotes.....	50
Figura 13. Crio ET de dímeros de la ATP sintasa y promedio de subtomogramas de la disposición 3D en las crestas.....	54
Figura 14. Árbol guía sin enraizar de 6592 secuencias homólogas de la subunidad γ	63
Figura 15. Análisis filogenético de la subunidad g de la ATP sintasa.....	65
Figura 16. Presencia de homólogos de la subunidad g en 985 de los 1110 genomas analizados.....	67
Figura 17. Dendrograma que considera la cantidad de homólogos de la subunidad g hallados a través de la búsqueda vía blast en 1110 genomas secuenciados.....	68

Figura 18. Alineamiento por MAFFT de homólogos de la subunidad g utilizando organismos representativos de distintos grupos taxonómicos.....	69
Figura 19. Alineamientos en Chimera de secuencias de subunidades g modeladas por homología.....	70
Figura 20. Contextos genómicos de la subunidad g en animales.....	72
Figura 21. Análisis filogenético de la subunidad e de la ATP sintasa.....	74
Figura 22. Presencia de homólogos de la subunidad e en 880 de los 1110 genomas analizados.....	76
Figura 23. Dendrograma que considera la cantidad de genes homólogos de la subunidad e hallados a través de la búsqueda vía blast en 1110 genomas secuenciados.....	77
Figura 24. Alineamiento (Chimera) de modelado por homología de la subunidad e utilizando organismos representativos de distintos grupos taxonómicos.....	79
Figura 25. Alineamiento por MAFFT de homólogos de la subunidad e utilizando organismos representativos de distintos grupos taxonómicos.....	80
Figura 26. Análisis filogenético de la subunidad i/j de la ATP sintasa.....	81
Figura 27. Presencia de homólogos de la subunidad i/j en 272 de los 1110 genomas analizados.....	82
Figura 28. Dendrograma que considera la cantidad de homólogos de la subunidad i/j hallados a través de la búsqueda vía blast en 1110 genomas secuenciados.....	83
Figura 29. Alineamiento por MAFFT de homólogos de la subunidad i/j utilizando organismos representativos de distintos grupos taxonómicos.....	84
Figura 30. Análisis filogenético de la subunidad k de la ATP sintasa.....	86
Figura 31. Distribución filética de la subunidad k en 1110 genomas analizados.....	87
Figura 32. Dendrograma que considera la cantidad de homólogos de la subunidad k hallados a través de la búsqueda vía blast en 1110 genomas secuenciados.....	88
Figura 33. Alineamiento por MAFFT de la subunidad k utilizando organismos representativos de distintos grupos taxonómicos.....	89
Figura 34. Resultados que muestran el probable reclutamiento de las subunidades e, g, i/j, k involucradas en la oligomerización de la ATP sintasa.....	92

Lista de Tablas

Tabla 1. Relación de homología entre las subunidades más conservadas de las distintas ATP sintasas.....28

Tabla 2. Composición y estequiometría de las subunidades que conforman el V_2 de los organismos modelo más estudiados hasta el momento en eucariotes.....55

Índice de abreviaturas

$\Delta\mu\text{H}^+$ Gradiente electroquímico de protones

6.8 pl 6.8-kDa proteolipid. Subunidad de la ATP sintasa de 6.8 kDa (mamíferos)

A6L Subunidad codificada por el gen MT-ATP8, parcialmente traslapado al gen mitocondrial MT-ATP6, también llamada como ATP8 o URFA6L

Acetil Co A Acetil Coenzima A

ADP Adenosine Diphosphate ó difosfato de adenosina

ASA ATP Synthase Associated protein o proteínas asociadas a la ATP sintasa (algas clorofíceas).

ARN Ácido RiboNucleico

AT3G01130 Gen de *Arabidopsis thaliana* sugerido como homólogo a la subunidad e de la ATP sintasa.

AT5G15320 Gen de *Arabidopsis thaliana* sugerido como homólogo a la subunidad e de la ATP sintasa.

AtAUCSIA-1 proteína de *Arabidopsis thaliana* que mostró interacción con proteínas relacionadas con la kinesina.

ATP. Adenosine Triphosphate ó trifosfato de adenosina.

ATPTG Subunidades asociadas a la ATP sintasa en *Toxoplasma gondii*

ATPTT Subunidades asociadas a la ATP sintasa en *Tetrahymena thermophila*

ATPTB Subunidades asociadas a la ATP sintasa en *Trypanosoma brucei*

BAR Bin-Amphiphysin-Rvs. Grupos que promueven la deformación de la membrana.

Blastp Basic Local Alignment Search Tool for Proteins

BLOSUM (BLOCKS of Amino Acid SUBstitution Matrix, o matriz de sustitución de bloques de aminoácidos)

BN-PAGE Blue Native PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.

Ca⁺² ion de Calcio

CJ Cristae Junction. Unión de cresta.

Clustal X Programa de alineamiento múltiple de secuencias.

CO₂ Dióxido de carbono

Crio-EM Crio-Electron Microscopy

DAPIT Diabetes-Associated Protein In insulin-sensitive Tissue. Subunidad de la ATPsintasa (mamíferos)

Dnm1 Dinamina 1, GTPasa proteína relacionada al mantenimiento de la morfología mitocondrial. También conocida como Drp1 ó Dlp1.

e⁻ electrón

ET Electron tomography ó tomografía electrónica

ED Vía Entner-Doudoroff es una ruta de catabolismo de la glucosa alternativa a la glucólisis.

F6 Subunidad F6 codificada por el gen ATP5PF, también denominada como CF6, ATP5, ATPM, ATP5A, ó ATP5J

FAd Proteína mitocondrial codificada por el mensajero MGP1 en *Arabidopsis thaliana*

Fo Sector membranal sensible a la oligomicina de la F1FO ATP sintasa.

FADH₂ Flavin Adenin Dinucleótido reducido

FAD Flavin Adenin Dinucleotido oxidado

Fe-S Centro fierro-Azufre.

FGENESH+ Programa de detección de genes dentro de secuencias de ADN genómico.

FMN Flavin MonoNucleotido

GADPH GlycerAldehyDe-3-Phosphate deHhydrogenase ó Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GTP Guanosine TriPhosphate ó trifosfato de guanosina

GTPasa GTP hidrolasa

GXXXG Motivo conservado. Zipper de glicina o cremallera de glicina.

HAP1 Línea celular humana derivada de la línea celular KBM-7 de leucemia mieloide crónica

HeLa Línea celular de adenocarcinoma cervical humano

HHMER Programa para búsqueda de secuencias haciendo uso de perfiles modelos ocultos de markov (**H**idden **M**arkov **M**odels)

HSP70 Heat Shock Protein 70 ó proteínas de choque térmico de 70 kDa

IBM Inner Boundary Membrane ó Membrana limitrofe interna.

IM. Inner Membrane ó membrana interna mitocondrial.

IF1 Inhibitory Factor 1. Subunidad inhibidora de la F₁ ATPasa

IMS **I**nter**M**embrane **S**pace ó espacio intermembranal

Lado N. Lado con carga negativa en la membrana interna mitocondrial

Lado P. Lado con carga positiva en la membrana interna mitocondrial

MAFFT **M**ultiple **A**lignment using **F**ast **F**ourier **T**ransform ó alineamiento múltiple mediante transformada rápida de Fourier

MASAP **M**itochondrial **A**TP **S**ynthase-**A**sociated **P**rotein ó proteína asociada a la ATP sintasa mitocondrial. Posteriormente renombrada como ASA1

MEGA **M**olecular **E**volutionary **G**enetics **A**nalysis. Software de análisis evolutivo.

Mg²⁺ Ion magnesio

Mn²⁺ Ion manganeso

Mgm1. También llamada Opa1 o Msp1 GTPasa involucrada en la morfología mitocondrial

MICOS **M**itochondrial **C**ontact **S**ite and cristae organizing system

MRO Organelo relacionado a la mitocondria del inglés **M**itochondrial **R**elated **O**rganelle

MS mass spectrometry ó espectrometría de masas

NAD⁺ Nicotinamida Adenina Dinucleótido oxidada

NADH+H⁺ Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducida

NCBI. Nacional **C**enter for **B**iotecnology **I**nformation. Centro para la información biotecnológica de la biblioteca nacional de medicina de EEUU.

O₂ Oxígeno

OM **O**uter **M**embrane ó Membrana externa

OPA1 **O**ptic **A**trophy **1**

OSCP **O**ligomycin **S**ensitivity **C**onferral **P**rotein

Pfam Protein family ó familia de proteínas. Base de datos

pH potential of **H**ydrogen ó potencial de hidrogeno

Pi Fosfato inorgánico

QH₂ Ubiquinol

Redox reduction/oxidation

Refseq **R**eference **s**equence ó secuencia de referencia

ROS **R**eactive **O**xygen **S**pecies ó especies reactivas de oxígeno

SAM proteínas mitocondriales pertenecientes al **Sorting and Assembly Machinery**

SAR Stramenopiles, Alveolates **Rhizaria**

SDS-PAGE Sodium **Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis**

STF1 ATPase-**STabilizing Factor** 9 kDa

STF2. ATPase-**STabilizing Factor** 15 kDa

tRNA Ácido ribonucleico de transferencia.

TEM **Transmission Electron Microscopy.** Microscopia electronica de transmission.

TIM **Translocase of the Inner Membrane** ó translocasa de la membrana interna

TOM **Translocase of the Outer Membrane** ó translocasa de la membrana externa

TPP **Thiamine PyroPhosphate** ó tiamina pirofosfato

Tim11 Gen que codifica a la subunidad e de la ATP sintasa.

TH Tiol reducido.

UNIPROT. Base de datos de proteínas en línea.

V₂ dímero de la F₁F₀ ATP sintasa

V₄ tetrámero de la F₁F₀ ATP sintasa

V₆ hexámero de la F₁F₀ ATP sintasa

VAST **Vector Alignment Search Tool**

VDAC **Voltage-Dependent Anion Channel** ó Canales anionicos dependientes de voltaje.

Resumen

La F_1F_0 ATP sintasa se encuentra ampliamente conservada en bacterias, mitocondrias, cloroplastos e incluso en algunas arqueas. La ATP sintasa, particularmente la mitocondrial, puede encontrarse en arreglos dimérico/oligoméricos. Los arreglos en dímeros u oligómeros se organizan en filas induciendo invaginaciones membranales llamadas crestas mitocondriales. El estudio de distintos organismos modelo ha llevado a identificar distintos dímeros que varían en la composición de subunidades, el ángulo de curvatura entre monómeros así como su organización supramolecular.

El dímero de la F_1F_0 ATP sintasa (V_2) presente en mamíferos y hongos es estabilizado principalmente por las subunidades e, g y b. Así como la subunidad i/j y k de acuerdo con los modelos obtenidos. La presencia aparentemente ubicua del V_2 en eucariotes nos llevó a preguntarnos: ¿Cómo fueron reclutadas las subunidades que participan en la dimerización de F_0 de la F_1F_0 ATP sintasa mitocondrial? ¿Cuál es su historia natural y la distribución filética de las subunidades responsables de la dimerización de F_0 ? Para responder estas preguntas, se obtuvieron las secuencias disponibles tanto en el NCBI como en pfam de las subunidades de interés. Se depuraron las secuencias duplicadas, obsoletas y se seleccionó la isoforma más conservada por gen para obtener árboles filogenéticos. También se realizó un análisis sobre la presencia/ausencia de las subunidades de interés realizando la búsqueda en 1110 genomas refseq de organismos eucariotes. Por último, se utilizó las secuencias ya depuradas y alineadas para generar logos de secuencias de los aminoácidos conservados.

Los resultados obtenidos mostraron una amplia presencia de la subunidad e y g dentro de ophistokonta, amebozoa, arqueoplastida y otros protistas. El motivo GXXXG y otras posiciones claves halladas previamente se presentan incluso en taxas más divergentes. Esto sugiere una composición del V_2 de plantas similar a la de animales. La subunidad i/j y k, en cambio, se hallaron únicamente en hongos.

Ninguna subunidad fue hallada dentro de microsporidia, discosea y archamoebae. Dichas taxa se distinguen por poseer organelos relacionados a la mitocondria (MRO) en lugar de mitocondrias. Todas las subunidades mostraron alta divergencia. Además, la subunidad e y g presentaron una alta redundancia de homólogos en plantas y animales.

Abstract

F₁F₀ ATP synthase is widely conserved in bacteria, mitochondria, chloroplasts, and even in some archaea. ATP synthase, particularly mitochondrial, can be found in dimeric/oligomeric arrangements. The dimeric or oligomeric arrangements are organized in rows, inducing membrane invaginations called mitochondrial cristae. Different dimers have been identified through the study of various model organisms. Dimers vary in their subunit composition as well as angle of curvature between monomers, and supramolecular organization.

The F₁F₀ ATP synthase dimer (V₂), which is present in mammals and fungi, has been shown to be stabilized primarily by the e, g, and b, as well as the i/j and k subunits. The apparently ubiquitous presence of V₂ in eukaryotes led us to ask: How the subunits involved in F₀ dimerization were recruited? What is its natural history and the phyletic distribution of the subunits responsible for dimerization? To answer these questions, sequences available from both NCBI and pfam of the subunits of interest were retrieved. Obsolete duplicate sequences were purged and the most conserved isoform per gene was selected to obtain phylogenetic trees. Also, We did of the presence/absence analysis of the subunits of interest was also performed by searching 1110 refseq genomes of eukaryotic organisms. Finally, the recovery of purified sequences was used to generate sequence logos of the most conserved amino acids.

The results obtained showed a wide presence of the e and g subunits within ophistokonta, amebozoa, and even archaeplastida and other protists. The GXXXG motif and other key positions found previously are even present in more divergent taxa. This suggests a V₂ composition in plants like that of animals. The i/j and k subunits, on the other hand, were found only in fungi.

No subunit was found within microsporidia, discosea, and archamoebae. These taxa are distinguished by having organelles that are reminiscent of original mitochondria (MRO) instead of functional mitochondria. All subunits showed high divergence. Furthermore, the e and g subunits showed high redundancy of homologs in plants and animals.

1 Introducción.

1.1 La mitocondria como organelo esencial en eucariotes.

La mitocondria es un organelo esencial para el metabolismo de casi todas las células eucariotes. Una de las características diferenciales de las células eucariotas, con respecto a las células procariotas, es la presencia de organelos conformados por compartimentos membranales especializados en los cuales se llevan a cabo tareas específicas (Mierke, 2020).

La mitocondria cumple funciones diversas y desempeña un papel central en el metabolismo celular. Algunas de sus funciones incluyen la síntesis de algunas proteínas, participa en el metabolismo de aminoácidos y nucleótidos, en el catabolismo de ácidos grasos, y la biosíntesis de lípidos, quinonas y esteroides (Roger *et al.*, 2017). Otras funciones involucran la homeostasis de calcio, la generación de especies reactivas de oxígeno y la regulación de la apoptosis (Van Der Bliet *et al.*, 2017). En el ámbito bioenergético, la mitocondria desempeña un rol fundamental, generando ATP a través de la fosforilación oxidativa de los nutrientes transformados en Acetil-CoA y utilizando oxígeno en el proceso denominado respiración aerobia. La alternativa al metabolismo aerobio es la respiración anaerobia. No requiere de oxígeno, pero es unas 15 veces menos eficiente (Véase en el sección 1.2.5), las vías involucradas en la síntesis de ATP) (Mierke, 2020). El ATP obtenido es utilizado como reservorio de energía química. Las mitocondrias también son fuentes importantes de generación de radicales libres y la alteración genética de importantes procesos celulares llevados a cabo en la mitocondria llevan al desarrollo de un diverso número de enfermedades (Nelson *et al.*, 2017) por lo que son del mayor interés en biomedicina.

1.1.1 Endosimbiosis y otros eventos clave en el origen de las mitocondrias y la evolución de los eucariotas.

El origen de las mitocondrias fue sugerido por Lynn Margulis (Sagan, 1967) en *On the origin of mitosing cells* con la teoría que se denominaría como teoría endosimbiótica serial. Dicha teoría menciona que el origen de los eucariotes se dio a través de procesos sucesivos de endosimbiosis. La idea no fue nueva (Mereschkowsky C, 1910), sin embargo, si presentó una teoría integradora sobre la eucariogénesis. La teoría propuesta buscó explicar el origen de los flagelos, las mitocondrias y los cloroplastos a través de procesos de

endosimbiosis seriadas que dieron lugar a los orgánulos en el orden previamente mencionado. De acuerdo con Margulis, el detonador que daría lugar al proceso de endosimbiosis y que originaría a la mitocondria, sería un incremento en la concentración de oxígeno atmosférico producto de la fotosíntesis realizada por procariotes fotótrofos ancestrales. Un procariote heterótrofo anaerobio, orillado por un ambiente con mayores concentraciones de oxígeno atmosférico, engulliría a un procariote aerobio. De este procariote aerobio ancestral surgieron las actuales mitocondrias. Esta endosimbiosis se volvió obligatoria hasta “integrarse” en un solo organismo. De igual manera, Margulis sugirió que una espiroqueta ancestral atravesaría por un proceso de endosimbiosis para dar lugar a los flagelos de las células eucariotes. Por último, una cianobacteria ancestral sería incorporada dando lugar a los cloroplastos.

La presencia de genomas propios, ribosomas y tARN, así como la similitud estructural y bioquímica entre mitocondrias y cloroplastos con sus contrapartes procariotes, amén de la alta disponibilidad de datos aportados por secuenciaciones de alto rendimiento apoyan el origen por endosimbiosis de la mitocondria y el cloroplasto. En cambio, hasta ahora, no hay genoma asociado a los flagelos o evidencia que apoye que el origen de los flagelos se debe a una endosimbiosis (Muñoz-Gómez *et al.*, 2017). Los eventos de simbiogénesis que daría lugar a la mitocondria serían uno de los eventos clave de la eucariogénesis.

Actualmente, se tiene evidencia sobre organismos que poseen una relativa cercanía filogenética con los procariotes ancestrales que fungieron como endosimbionte: las α proteobacterias en el caso de la mitocondria (Archibald, 2015; Ku *et al.*, 2015; Margulis & Chapman, 1998), o las cianobacterias en el caso de los cloroplastos (Ris & Plaut, 1962), aunque hay otras propuestas alternativas (Martijn *et al.*, 2018). Además, la presencia de proteínas encontradas anteriormente en eucariotes apuntan a que arqueas pertenecientes al superfilum Asgard son cercanas filogenéticamente al hospedero pre-eucariote ancestral (Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017). Sin embargo, aún son discutidas muchas incógnitas sobre los detalles de la transición hacia las células eucariotes.

Estudios proteómicos, genómicos y bioinformáticos en diversos tejidos e incluso diversos organismos eucariotes aproximan que unas 1000 proteínas o incluso más, forman o formaron parte del proteoma mitocondrial. La mayoría de las proteínas mitocondriales tienen

un origen bacteriano o *de novo*. Buena parte del genoma mitocondrial ha sido transferido eventualmente al genoma nuclear. Por lo que una vez traducido, buena parte del proteoma mitocondrial debe de ser importado a la mitocondria. En mitocondrias de humanos solamente 13 proteínas son codificadas por el genoma mitocondrial, 22 tARNs y dos ARNs ribosomales (Lott *et al.*, 2013). Las pocas proteínas codificadas en la mitocondria suelen mostrar la característica de ser altamente hidrofóbicas. Las proteínas codificadas por las mitocondrias en humanos, corresponden principalmente a subunidades de la cadena de transporte de electrones y a la ATP sintasa (Mierke, 2020).

La estimación del árbol de la vida para los eucariotes ha involucrado la búsqueda extensiva de fósiles. Sin embargo, como factor limitante tenemos la escasez de fósiles que provean evidencia sobre el origen de los eucariotes. Por ejemplo, el fósil más antiguo hallado para eucariotes pertenece a un alga roja *Bangiomorpha* de hace 1200 millones de años (Ma) y pocos ejemplos más pueden ser hallados de hace 635 Ma (Butterfield, 2000). Otros intentos involucran la generación de árboles filogenéticos con un solo gen como el ARN ribosomal 16S (Edman *et al.*, 1988), o con un grupo de genes en donde es frecuente no encontrar consenso, y la más reciente empleando filogenómica (Rodríguez-Ezpeleta *et al.*, 2005). Alguna de las clasificaciones de los eucariotes con más apoyo, los dividen en 6 supergrupos putativos que incluyen: Ophistokonta (que comprende a los animales, hongos y coanoflagelados), Amoebozoa, Archaeoplastida (que incluye algas rojas, algas verdes, plantas terrestres y glaucophyta), Chromalveolata (incluye apicomplexa o ciliados), rhizaria y excavata (parabasalia y diplomonas) (Keeling *et al.*, 2005). Se estima que gran parte de las divergencias que dieron lugar a estos 6 grupos, ocurrieron entre el Mesoproterozoico y el neoproterozoico temprano. Esto sería entre hace 1600 Ma y 900 Ma (Blair Hedges & Kumar, 2009).

Otro de los eventos más importantes en la evolución de los eucariotes que también involucran procesos de endosimbiosis de plástidos posteriores, son conocidas como endosimbiosis secundarias (Ver **Figura 1**). Las endosimbiosis secundarias surgieron en diversos grupos de eucariotes. El proceso consiste en la adquisición de plástidos de eucariotes por la engullición de un eucariote fototrófico. Este proceso ha dado como resultado grupos

de eucariotes altamente diversos donde, en algunos casos es difícil determinar las veces que ha ocurrido la incorporación de plástidos (Archibald & Keeling, 2002).

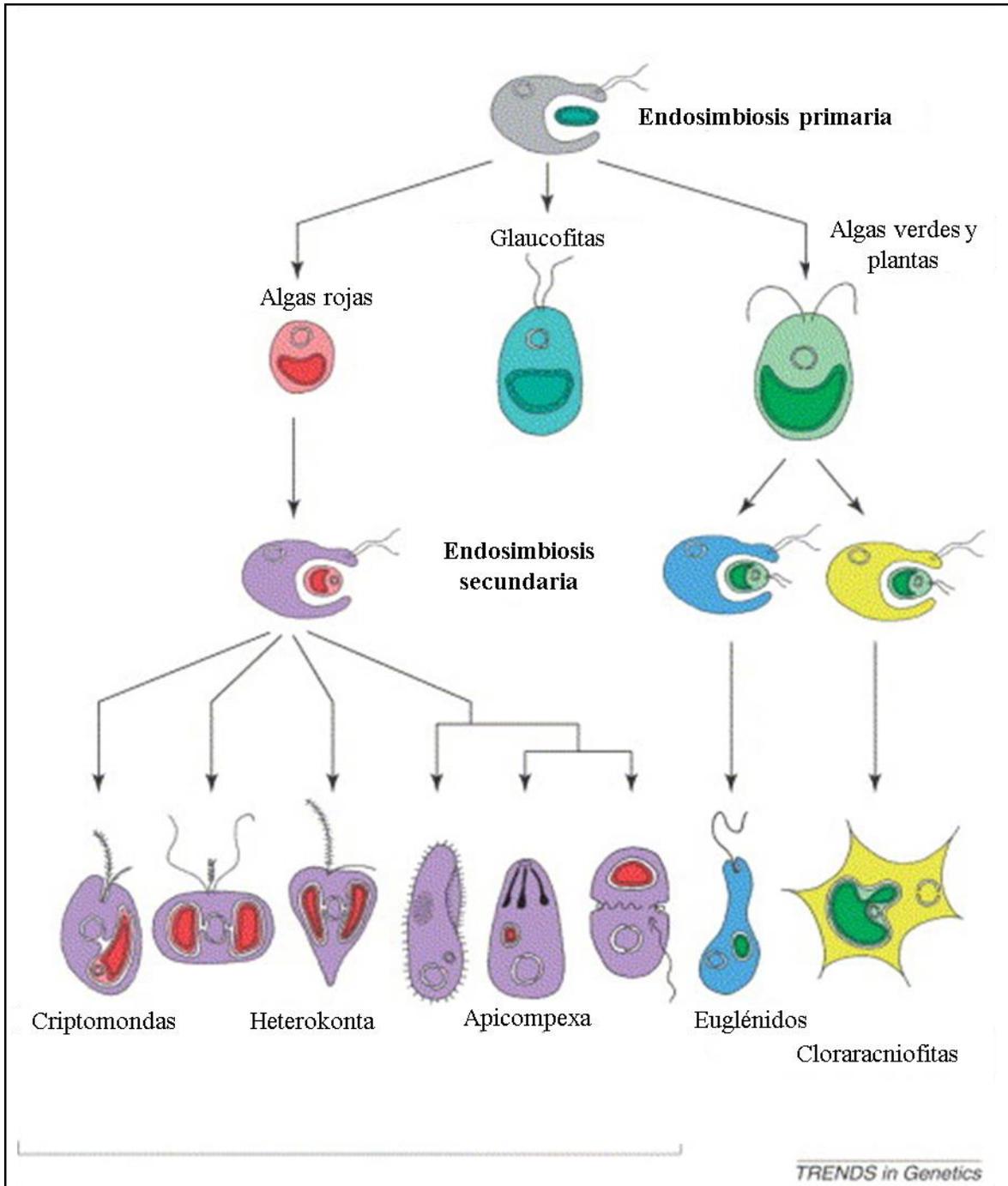


Figura 1. Esquema sobre la evolución de los plástidos obtenidos a través de endosimbiosis secundaria. Esquema modificado de Archibald y colaboradores (2002).

1.1.2 La estructura mitocondrial es dinámica y es modificada acorde a los requerimientos energéticos.

La mitocondria está constituida por una membrana externa (Outer Membrane, OM) y una membrana interna (Inner Membrane IM), que a su vez se subdivide en: i) membrana limítrofe interna (IBM, del inglés Inner Boundary Membrane) que es la región adyacente a la OM, y ii) las crestas mitocondriales. Las crestas mitocondriales por su parte son regiones membranales de morfología tubular, lamelar o incluso en forma de disco. Las crestas comúnmente conectan al menos una región de la IBM. A la región que conecta la IBM con la cresta se le denomina unión de cresta (CJ, del inglés Cristae Junction) (Ver **Figura 2** (Zick *et al.*, 2009). La morfología de las mitocondrias varía dependiendo de la especie, etapas de la vida del organismo o incluso entre distintos tejidos de una especie. En animales u hongos la morfología de las crestas mitocondria es similar a láminas (Davies *et al.*, 2012), en cambio, en organismos como *Paramecium multimicronucleatum* es de aspecto tubular (Allen *et al.*, 1989). El interior del compartimento de la membrana interna es la matriz mitocondrial.

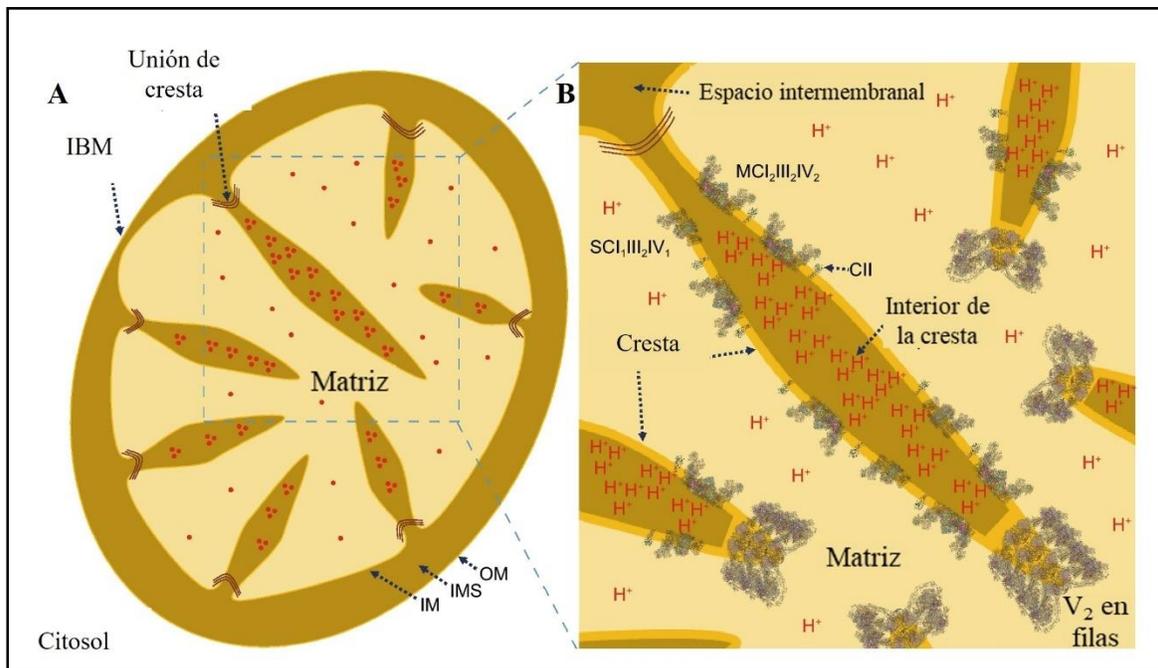


Figura 2. A) Esquema que detalla las partes de la mitocondria.. OM. Membrana externa. IM Membrana interna. IMS. Espacio intermembranal. IBM membrana limítrofe externa. B) Arreglo de los complejos implicados en la fosforilación oxidativa dentro de la cresta mitocondrial. Obtenido de Wu y colaboradores (2020).

La membrana externa y la membrana interna tienen funciones distintas, lo cual se refleja en su composición. Los lípidos más abundantes en las membranas mitocondriales son la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina. En cambio, los esteroides y esfingolípidos suelen encontrarse en baja cantidad a diferencia de las membranas de otros organelos (Horvath & Daum, 2013). La membrana externa también contiene canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC) que regulan la difusión de moléculas por debajo de 10 kDa.

Además, la IM posee alto contenido de cardiolipinas. La cardiolipina, al igual que la fosfatidiletanolamina, asumen una forma cónica debido al tamaño pequeño de su cabeza polar en comparación con su región hidrofóbica. La IM es permeable a O_2 , CO_2 y compuestos no polares. El porcentaje de proteínas de la membrana interna mitocondrial es aproximadamente del 75% siendo mucho más densa que la OM. El paso de metabolitos en la IM, a diferencia de la OM, requiere de transportadores específicos que permiten el paso de moléculas como el ATP, ADP, piruvato, Ca^{+2} , fosfato entre muchos otros compuestos más. Las moléculas como el NADH, producto de la glucólisis en el citosol son aprovechadas para la fosforilación oxidativa como veremos más adelante (Ver sección **1.2.5**), requieren el uso de diversos sistemas de lanzaderas debido a que no es posible intercambiar NAD(H) entre el citosol y la mitocondria. Se han descrito varios sistemas de lanzaderas; posiblemente el más importante es la lanzadera de malato-aspartato, que involucra la participación de cuatro enzimas y dos transportadores y puede resumirse en un sistema de transporte neto de equivalentes reductores ($NADH + H^+$) hacia el interior mitocondrial (Bücher & Klingenberg, 1958; LaNoue *et al.*, 1973). Otro sistema de lanzadera de malato-aspartato ha sido hallado en hígado, riñón y corazón. Para músculo y cerebro hay un transporte alternativo de NADH denominado lanzadera glicerol-3-fosfato. Para el transporte de equivalentes reductores por glicerol-3-fosfato se utiliza una isoenzima de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. La enzima es clave en la reducción de FAD a $FADH_2$ (Blanco & Blanco, 2017). El $FADH_2$, a su vez, permite la incorporación de los electrones a la cadena de transporte de electrones a través de la reducción de la ubiquinona (Ver cadena de transporte de electrones). Adicionalmente, la lanzadera de piruvato-citrato (Farfari *et al.*, 2000) es apoyada por cinco enzimas y dos

intercambiadores: uno de citrato/malato y uno de malato/fosfato así como un bombeo de piruvato a la matriz que es dependiente de pH.

El complejo TOM permite el transporte de casi la totalidad de proteínas que ingresan a la mitocondria. Las proteínas son internalizadas a través del complejo TOM a través de tres destinos principales: 1) El primero permite la entrada de proteínas que poseen presecuencias en su amino terminal y se internalizan hacia la matriz mitocondrial a través del complejo TIM23 (translocasa de la membrana interna mitocondrial) apoyado por mtHSP70. 2) las proteínas altamente hidrofóbicas que no poseen presecuencias serían internalizadas a través del complejo TIM22 y otras chaperonas. 3) Las proteínas precursoras presentes en la OM son ensambladas e integradas gracias al complejo SAM (Wiedemann *et al.*, 2004).

La composición de proteínas en la membrana interna también varía entre sus subregiones (Vogel *et al.*, 2006; Wurm & Jakobs, 2006). La membrana limítrofe externa posee mayoritariamente traslocasas mientras que la cresta mitocondrial posee complejos de la cadena de transporte de electrones y la ATP sintasa. La unión de cresta, funcionalmente, se cree que facilitaría la delimitación de procesos entre la cresta y la IBM (Quintana-Cabrera *et al.*, 2018). Sobre la unión de cresta, ha sido propuesto un modelo en el que la formación de la CJ es apoyada por algunas subunidades pertenecientes al complejo MICOS (mitochondrial contact site and cristae-organizing system). Stephan y colaboradores eliminaron subunidades del complejo MICOS en células humanas seguido de una reexpresión controlada. Así mostraron una relación entre la reexpresión y la formación de la CJ, así como la biogénesis mitocondrial (Stephan *et al.*, 2020).

La morfología mitocondrial es modificada de forma reversible en consecuencia a la actividad respiratoria. Chance y Williams (Chance & Williams, 1955), identificaron diferentes estados metabólicos de las mitocondrias mediante la administración de concentraciones diferenciales de ADP así como el sustrato usado para alimentar la cadena de fosforilación oxidativa. Al medir el consumo de oxígeno, así como otros parámetros más hallaron cinco estados distintos. Más tarde, Hackenbrock (1966), halló cambios morfológicos reversibles, especialmente en la transición entre dos de los estados. La forma ortodoxa, llamada así por ser la que se encuentra usualmente en los tejidos fijados intactos, fue hallada a los 15 min de encontrarse en estado IV. La forma ortodoxa posee una matriz mitocondrial

expandida, además son pocas las conexiones entre crestas y funcionalmente muestra un bajo consumo de O₂ y bajas cantidades de síntesis de ATP. La forma condensada, hallada en la transición al estado III, incrementa las conexiones entre crestas (Jayashankar *et al.*, 2016). Así mismo, la mitocondria es capaz de encontrarse en enramados mitocondriales extensos distribuido en la célula, o bien, en numerosas mitocondrias de un tamaño reducido. . La arquitectura de la mitocondria es dinámica y responde a los requerimientos metabólicos y energéticos. Dentro de los mecanismos para modular la dinámica mitocondrial podemos encontrar: la fusión y fisión de mitocondrias, así como motilidad y anclaje. Sobre las subunidades involucradas en estos fenómenos se ha identificado proteínas involucradas como las GTPasas Dnm1 (también llamada Drp1 ó Dlp1), Fzo (también conocida como mitofusina) y Mgm1 (conocida como Opa1 o Msp1) halladas en levaduras (Shaw & Nunnari, 2002). Sin embargo, el número de proteínas reportadas que podrían estar participando en estos procesos ha incrementado notablemente (Zick *et al.*, 2009).

Al comparar la morfología de la mitocondria en organismos juveniles con otros más longevos como en el caso de *Caenorhabditis elegans*, los más jóvenes presentan enramados mitocondriales más extensos (Regmi *et al.*, 2014). Mientras que, al comparar las mitocondrias presentes en distintos tejidos de un organismo es posible identificar diferencias en la organización mitocondrial (Zick *et al.*, 2009). Durante la fase estacionaria del ciclo celular de las levaduras, las mitocondrias se encuentran fragmentadas en pequeñas unidades, mientras que durante la fase S, las mitocondrias se fusionan en redes de mayor tamaño (Merz *et al.*, 2007). Otras condiciones que se han hallado relacionadas a las mitocondrias en formaciones de enramados mitocondriales son: condiciones de ayuno que promueven la autofagia. Por otro lado, un exceso de nutrientes se ha relacionado con la presencia de mitocondrias fragmentadas (Cogliati *et al.*, 2016). Por último, bajo determinadas condiciones, factores liberados desde la mitocondria, participan en cascadas de señalización celular que llevan eventualmente a la apoptosis (Cogliati *et al.*, 2016). En resumen, la actividad metabólica, los requerimientos energéticos y la morfología mitocondrial se encuentran íntimamente interrelacionados.

1.2 Vías metabólicas involucradas en la obtención de ATP a partir de la glucosa.

1.2.1 Glucólisis. Vía metabólica citosólica preparativa para la obtención de ATP.

El glucógeno o el almidón son polisacáridos de moléculas de glucosa aprovechados como almacenamiento de energía. El glucógeno es el de mayor distribución encontrándose en todos los dominios de la vida (Ball *et al.*, 2011). A partir del metabolismo de la glucosa es posible obtener metabolitos necesarios para la síntesis de ribosas presentes en el ADN así como una variedad de aminoácidos, nucleótidos, coenzimas, ácidos grasos y otros intermediarios metabólicos imprescindibles. También se puede obtener una gran cantidad de energía a partir de la oxidación de la glucosa.

Los organismos heterótrofos obtienen la glucosa principalmente a partir de la dieta. En cambio, los organismos fotosintéticos llevan a cabo la reducción del CO₂ gracias a la fotosíntesis. Las triosas obtenidas por la reducción del CO₂ son utilizadas para su conversión a hexosas, entre ellas la glucosa (Nelson *et al.*, 2017). La glucosa es esencial en el metabolismo energético de animales, hongos, plantas, bacterias aerobias, diversos protistas y algunos microorganismos anaerobios. Ciertas células u órganos en mamíferos tales como: esperma, cerebro, medula renal entre otros requieren un consumo principalmente de glucosa como fuente energética. En eritrocitos, al igual que algunos microorganismos anaerobios, el consumo de glucosa es imprescindible.

El catabolismo de la glucosa se considera una de las vías metabólicas con mayor distribución en los seres vivos e involucra dos vías altamente conservadas. La vía Entner-Doudoroff (ED) y la glucólisis. Comparten las últimas 6 reacciones, pero poseen marcadas diferencias. La vía ED se encuentra principalmente en bacterias, aunque el metabolismo bacteriano es altamente diverso llegando a involucrar otras vías (Flamholz *et al.*, 2013). También se debe resaltar que hay bacterias y arqueas donde encontramos ambas vías. En eucariotes, en cambio, encontramos la glucólisis. En arqueas es común encontrar modificaciones de la glucólisis y la ED (Kim & Gadd, 2008). La glucólisis, también es denominada como la vía Embden-Meyerhof-Parnas por los investigadores que trabajaron en su elucidación en la primera mitad del siglo XX (Embden *et al.*, 1933; Meyerhof, 1927; Parnas *et al.*, 1934; Semenza G, 2012).

También es común encontrar la presencia de isoenzimas y se han descrito algunos casos en donde su presencia se explica por duplicación génica ó transferencia horizontal (Fothergill-Gilmore & Michels, 1993). En eucariotes las diferencias frecuentes que se pueden encontrar en la glucólisis en distintas especies suele radicar en cambio, en los mecanismos de regulación (Nelson *et al.*, 2017). Por otra parte, en eucariotes adaptados a vivir en condiciones de hipoxia se ha identificado modificaciones en la vía, por ejemplo, versiones extendidas de la glucólisis han sido halladas en los géneros: *Trichomonas*, *Giardia*, *Pygusua*, *Mastigamoeba*, etc (Stairs *et al.*, 2015).

La glucólisis se lleva a cabo a través de 10 reacciones sucesivas (Ver **Figura 3**) y es dividida en dos fases: una preparatoria y otra de recuperación de energía. La reacción global es la siguiente:



En la primera reacción la glucosa es fosforilada en el grupo hidroxilo (OH) del carbono 6 (C6) (Meyerhof, 1927). La reacción es favorecida por la hexocinasa en presencia de Mg^{2+} y requiere el consumo de un ATP (Ver **Figura 3, paso 1**). Se lleva a cabo un ataque nucleofílico al grupo OH de la glucosa. El siguiente paso (paso 2) es llevado a cabo por la fosfoglucosa isomerasa que cataliza la isomerización de la glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato (Robison, 1932). Esta isomerización es una reacción reversible. La isomerización se lleva a cabo gracias a la sustracción de un protón (H^+) del C2 de la glucosa-6-fosfato, la formación de un intermediario enediol y un reordenamiento. A continuación, la fosfofructoquinasa-1 cataliza la transferencia de un grupo fosfato a la fructosa 6-fosfato dando como resultado fructosa-1-6-bifosfato (paso 3). Nuevamente, se requiere de Mg^{2+} como cofactor, se consume 1 ATP, y la reacción es irreversible. Posteriormente la aldolasa (paso 4) cataliza la obtención de dos triosas a partir de la fructosa-1-6-bifosfato. La gliceraldehído-3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato (Embden *et al.*, 1933). La fructosa-1-6-bifosfato interacciona con la cadena lateral de una lisina conservada que lleva a la formación de una base de Schiff con el C2. Una serie de reordenamientos deshidratan a la hexosa y permite la obtención de las triosas. Posteriormente, la dihidroxiacetona fosfato es isomerizada a gliceraldehído-3-fosfato por la triosa fosfato isomerasa en el paso 5 (Meyerhof & Beck, 1944). La reacción es favorecida por la pérdida de un protón, la reacción es

catalizada por un residuo de glutamato conservado, que lleva a la formación de un intermediario enol. Posteriormente, un residuo de histidina conservado sustrae un protón para inducir la formación del grupo ceto. En la siguiente reacción (paso 6) se lleva a cabo una oxidación del gliceraldehído-3-fosfato para formar 1,3-bifosfoglicerato, en una reacción catalizada por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Ercolani *et al.*, 1988). La reacción permite la obtención de 1,3-bifosfoglicerato usando NAD^+ como coenzima. La reacción inicia con la unión del gliceraldehído-3-fosfato con el grupo SH de una cisteína presente en el sitio activo de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (Warburg & Walter, 1939) formando un tiohemiacetal con el grupo carbonilo. A continuación, el NAD^+ se une al sitio activo y es reducido. El grupo fosfato se transfiere al carbono y se libera el enlace tioester. La fosfoglicerato quinasa permite una reacción reversible catalizando la transferencia del fosfato inorgánico al ADP (paso 7). La transferencia del grupo fosfato se acopla a la oxidación del 1,3 bifosfoglicerato para formar 3-fosfoglicerato. Para la reacción se requiere de ADP, fosfato inorgánico y Mg^{2+} . La siguiente reacción (paso 8) implica la conversión de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato, y para llevarla a cabo se requiere la presencia de Mg^{2+} como cofactor y la fosfoglicerato mutasa. En la reacción participan dos histidinas adyacentes en el sitio activo de la enzima que, mediante un ataque nucleofílico, facilitan el intercambio (reversible) del grupo fosfato entre el C3 y C2. El paso 9 es favorecido por la enolasa (Warburg & Walter, 1939) y permite la obtención de fosfoenolpiruvato a partir de 2-fosfoglicerato. La reacción requiere de Mg^{2+} como cofactor y promueve la deshidratación del 2-fosfoglicerato y es una reacción reversible. La última enzima de la glucólisis es la piruvato cinasa que cataliza la transferencia del grupo fosforil del fosfoenolpiruvato al ADP (Parnas *et al.*, 1934). La reacción requiere de K^+ y Mg^{2+} o Mn^{2+} como cofactores.

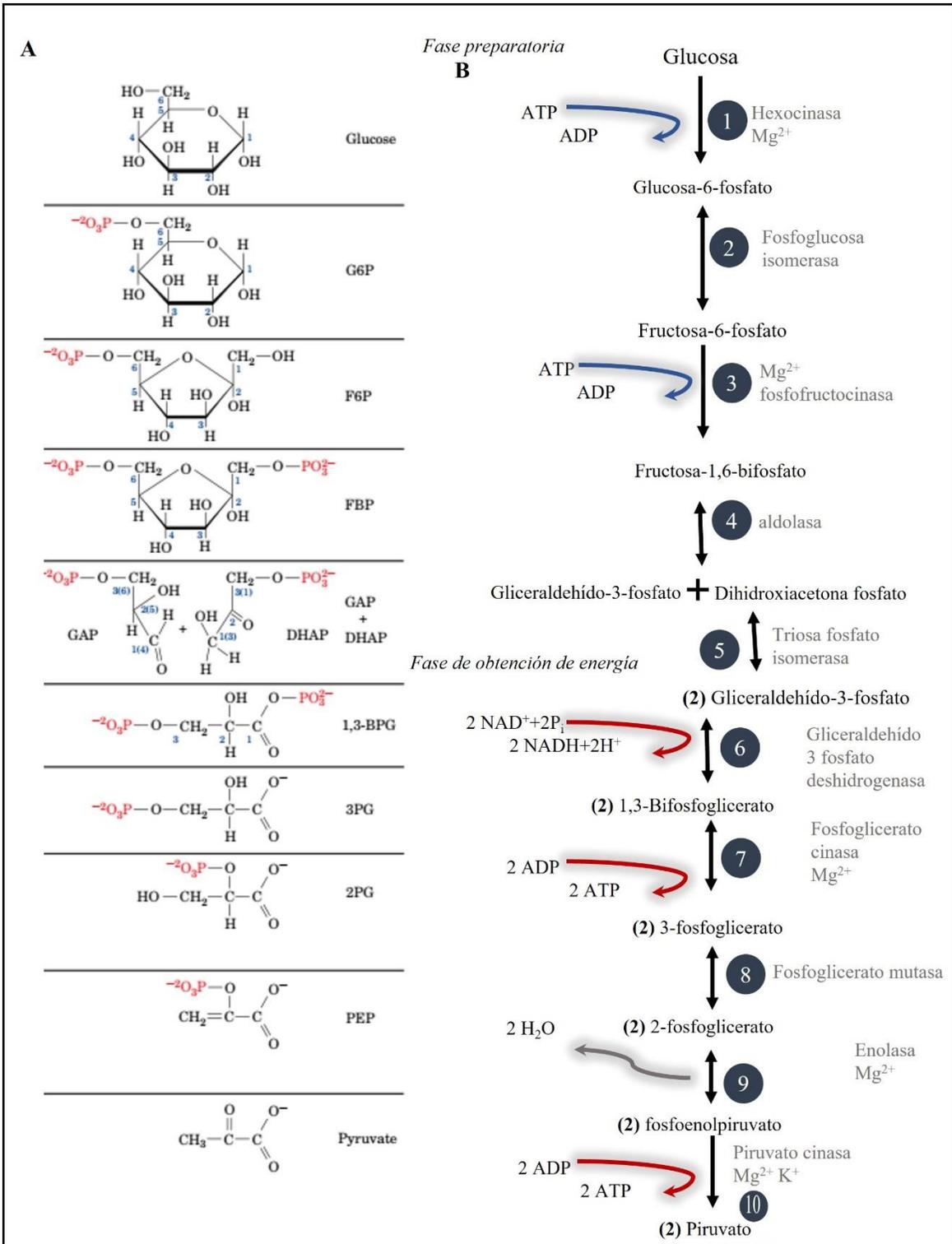


Figura 3. A) Productos obtenidos en las reacciones de la glicolisis. B) Esquema que muestra las las reacciones que se llevan a cabo en la glucólisis. Flecha azul inversión de energía. Flecha roja obtención de energía. Esquema modificado de Voet y colaboradores (2016)

De la reacción 1 a la 5 se le considera la primera fase donde requiere un suministro de energía con un consumo de 2 ATP por glucosa y la obtención de 2 moléculas de gliceraldehído 3-fosfato. La segunda fase es una fase de recuperación de energía, comprende de la reacción 6 a la 10. De las dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato son obtenidas 2 moléculas de piruvato con la generación de 4 moléculas de ATP (Voet *et al.*, 2016).

Por su parte las dos moléculas de $\text{NADH}+\text{H}^+$ obtenidas durante la glucólisis, en presencia de oxígeno, pueden indirectamente, incorporarse en la cadena de transporte de electrones donde serán oxidadas (Véase sección **1.2.5**).

1.2.2 Fermentación alcohólica ó láctica del piruvato.

La fermentación alcohólica o láctica son vías importantes para la supervivencia, particularmente, en condiciones de hipoxia, ya que la acumulación del $\text{NADH}+\text{H}^+$ generado por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, en la reacción 6 de la glucólisis (véase paso 6 de la **Figura 3**), puede generar eventualmente una inhibición de la glucólisis si no se dispone del NADH generado.

En levaduras, en algunas plantas y otros organismos se lleva a cabo la descarboxilación del piruvato gracias a la piruvato descarboxilasa, obteniendo acetaldehído y CO_2 . La alcohol deshidrogenasa consume entonces un $\text{NADH}+\text{H}^+$ por cada molécula de acetaldehído reducido, convirtiéndolo en etanol.

En mamíferos, el piruvato directamente es reducido por la lactato deshidrogenasa (Adams *et al.*, 1973) haciendo uso del $\text{NADH}+\text{H}^+$. Como resultado se obtiene lactato. En mamíferos, el lactato producido en el músculo esquelético, por ejemplo, puede ser exportado hacia el hígado. Una vez atendido el déficit de oxígeno, el lactato es reutilizado para sintetizar glucosa nuevamente (Voet *et al.*, 2016).

1.2.3 Oxidación del piruvato para la obtención de Acetil Co A.

En condiciones aeróbicas, la mayoría de las células eucariotes y muchas bacterias llevan a cabo una descarboxilación oxidativa del piruvato obteniendo acetil-CoA y CO_2 por

el complejo de la piruvato deshidrogenasa, requiriendo para ello como coenzimas la tiamina pirofosfato (TPP), la lipoamida, la coenzima A, NAD⁺ y FAD (Voet *et al.*, 2016). En eucariotes, la reacción se lleva a cabo en la matriz mitocondrial por lo que el piruvato debe difundir a través de la membrana interna mitocondrial para ser transportado por el acarreador mitocondrial de piruvato para incorporarlo al interior de la matriz mitocondrial (Nelson *et al.*, 2017). Por su parte en bacterias la reacción se lleva a cabo en el citosol. La reacción, tomando en cuenta la estequiometría obtenida por el metabolismo de una molécula de glucosa, sería la siguiente:



El Acetil-CoA es un metabolito altamente versátil que juega un papel central en el metabolismo. Puede ser usado incorporándolo al ciclo del ácido cítrico para su oxidación y así obtener ATP, o bien, puede ser empleado para la síntesis de ácidos grasos, esteroides, aminoácidos, o involucrado en la señalización celular al ser usado como cofactor para la donación del grupo acetilo (Voet *et al.*, 2016). El metabolismo de algunos otros aminoácidos en cambio, no llevan a la obtención de acetil-CoA, pero si a alguno de los productos intermediarios del ciclo de Krebs como el succinato o malato (Voet *et al.*, 2016).

Al optar por la oxidación de acetil-CoA, la coenzima es utilizada para la incorporación de grupos acetilo en el ciclo de Krebs. Los grupos acetilo serán oxidados hasta la obtención de CO₂. Mientras que gran parte de la energía será almacenada en forma de NADH+H⁺ y FADH₂.

1.2.4 Ciclo de Krebs.

El acetil-CoA es incorporado en una serie de reacciones conocidas como ciclo de Krebs, también denominadas: Ciclo de los ácidos tricarbóxicos ó ciclo del citrato. El ciclo de Krebs tiene lugar en la matriz mitocondrial, que corresponde al lumen de las crestas mitocondriales o el citosol de algunas bacterias (Nelson *et al.*, 2017). El ciclo es constituido por 8 reacciones sucesivas (Véase la **Figura 4**). El ciclo de Krebs mantiene una amplia presencia en organismos aerobios y muchos organismos anaerobios. A pesar de estar altamente conservado entre muchos procariotes, algunos carecen de ciertas enzimas del ciclo de Krebs, especialmente las enzimas del paso 1-3. Además, en ocasiones, la vía posee

adaptaciones acordes a las condiciones de vida de los organismos. Sin embargo, las cuatro últimas reacciones son las que se encuentran mayormente conservadas (Huynen *et al.*, 1999).

El acetil-CoA se incorpora en el ciclo de Krebs mediante una condensación aldólica con el oxalacetato (**Figura 4**, paso 1), gracias a la acción de la enzima citrato sintasa. Esta reacción produce una molécula de citrato. Un ácido aspártico conservado de la citrato sintasa, favorece la formación de un intermediario enol. Este intermediario enol ataca el carbonilo del oxalacetato, formando citroil-CoA. La hidrólisis del tioéster en el citroil-CoA libera al citrato y la CoA-SH (Wiegand & Remington, 1986). El siguiente paso en el ciclo de Krebs es una hidratación e isomerización llevada a cabo por la enzima aconitasa (paso 2). La aconitasa contiene un centro Hierro-Azufre (Fe-S) que facilita la eliminación de un grupo hidroxilo (OH) del átomo de C3 y un hidrógeno (H) del átomo de C4, lo que provoca una deshidratación. Como resultado, se forma el intermediario cis-aconitato. Posteriormente, la aconitasa hidrata este intermediario, reordenando el grupo hidroxilo al átomo de C4 y el hidrógeno al átomo de C3 dando lugar al isocitrato (Lauble *et al.*, 1994). A continuación, la isocitrato deshidrogenasa, en el paso 3, cataliza una descarboxilación oxidativa del isocitrato para obtener α -cetoglutarato. La reacción permite la obtención de una molécula de $\text{NADH}+\text{H}^+$ y requiere de Mn^{2+} gracias a que una interacción con oxígenos facilita la descarboxilación (Ceccarelli *et al.*, 2002). En el paso 4, el α -cetoglutarato es oxidado a succinil-Co-A y CO_2 por la α -cetoglutarato deshidrogenasa. Al igual que en la descarboxilación oxidativa del piruvato, esta oxidación requiere de NAD^+ , CoA-SH, lipoato, TPP y FAD como cofactores (Perham, 2003). Cabe mencionar que esta reacción es irreversible y la similitud entre la descarboxilación oxidativa del piruvato y la oxidación del α -cetoglutarato es debido a que ambas enzimas derivan de un ancestro en común.

El paso 5 es la conversión del Succinil-CoA a succinato gracias a la succinil-CoA sintetasa. La reacción es reversible además de requerir de GDP y Pi. Una histidina conservada de la enzima facilita la fosforilación del sustrato obteniendo succinil fosfato; el succinil fosfato transfiere el grupo fosforilo a la histidina conservada de la enzima y finalmente se transfiere el grupo fosforilo al GDP para obtener succinato y GTP (Wolodko *et al.*, 1994). A continuación, el succinato es oxidado a fumarato por la succinato deshidrogenasa en una reacción reversible (paso 6). La succinato deshidrogenasa posee una función dual: lleva a

cabo la oxidación del succinato requerida en el ciclo de Krebs y brinda FADH₂ para alimentar la cadena de transporte de electrones. La oxidación del succinato se detalla más adelante puesto que también corresponde al complejo II de la cadena respiratoria y es la única enzima del ciclo de Krebs localizada en la membrana (Ver La cadena de transporte de electrones: Complejo II).

El fumarato es hidratado a malato por la acción de la enzima fumarato hidratasa o simplemente fumarasa (paso 7). Durante la reacción, se forma un estado de transición en forma de carbanión, que es facilitado por la unión de un grupo OH al carbono, lo que provoca la ruptura del doble enlace y la posterior incorporación de un átomo de hidrogeno para formar malato (Nelson *et al.*, 2017). La última reacción del ciclo de Krebs (paso 8) es la oxidación del malato a oxalacetato. Esta reacción es catalizada por la malato deshidrogenasa y lleva a cabo la reducción del NAD⁺

Al completar una vuelta del ciclo puede describirse con la siguiente reacción global:



A través de las 8 reacciones se lleva a cabo la oxidación de un grupo acetilo por vuelta (Voet *et al.*, 2016). Los equivalentes reductores que pueden proporcionar el NADH+H⁺ y FADH como veremos a continuación, serán utilizados en la cadena de transporte de electrones ubicada en la membrana interna mitocondrial. La energía obtenida por la oxidación del NADH+H⁺ y el FADH₂ es conservada en forma de un potencial electroquímico. El último paso es la síntesis de ATP mediante la fosforilación oxidativa realizada gracias a la ATP sintasa (Véase **1.2.5**).

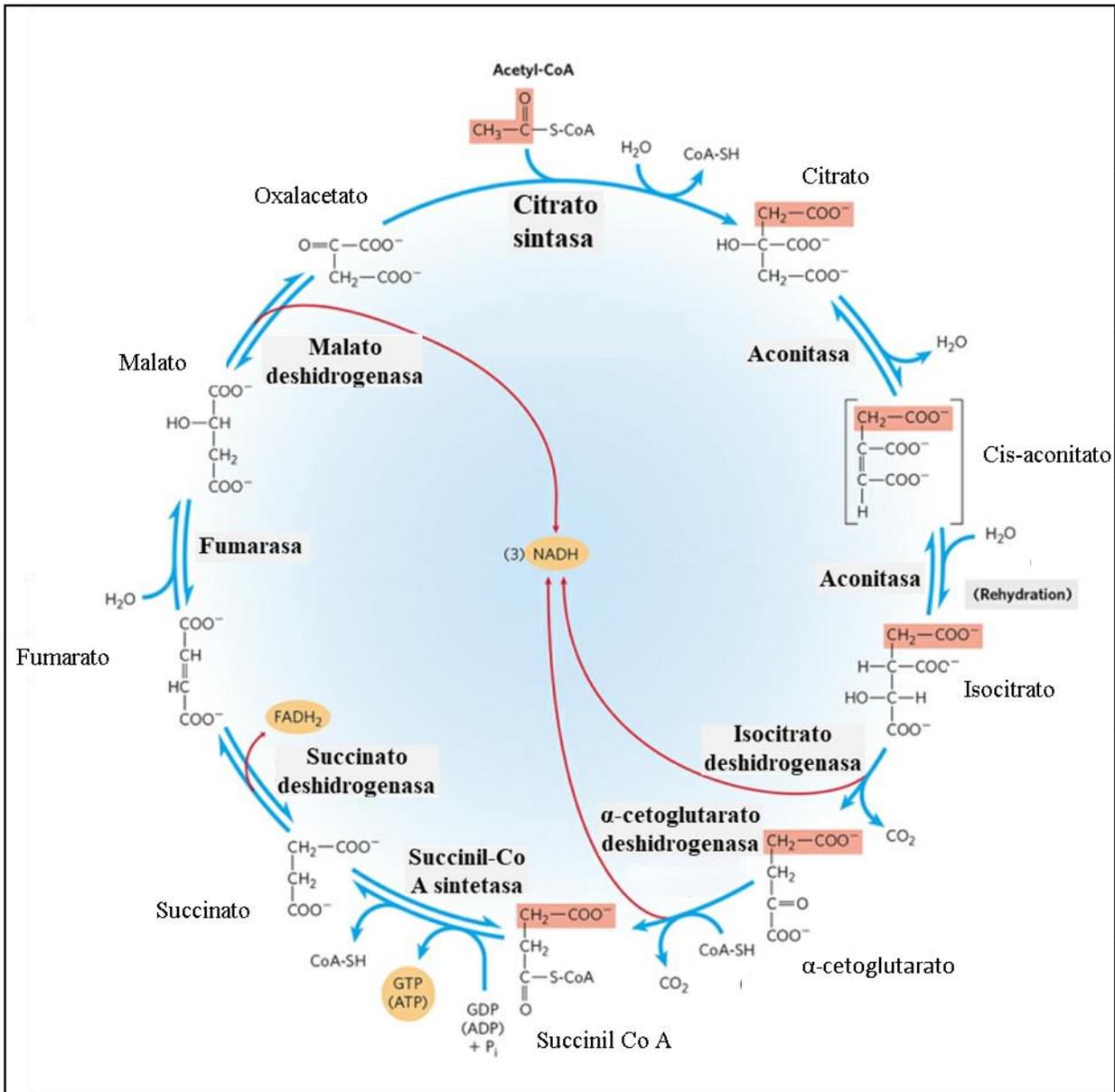


Figura 4. Esquema que resume los 8 pasos del ciclo de Krebs. Flecha azul. Dirección de la reacción así como flujo de sustratos . Flechas rojas. Resaltan la obtención de coenzimas reducidas (ovalo amarillo) a partir de la oxidación de los grupos acetilo. Obtenido y modificado de Nelson y colaboradores (2017).

1.2.5 Cadena de transporte de electrones.

Al igual que la descarboxilación del piruvato, la cadena respiratoria o de transporte de electrones tiene lugar en la mitocondria, específicamente en la membrana interna. Fue gracias a Peter Mitchell (Mitchell, 1961) que surgió la teoría quimiosmótica. La visión ortodoxa en ese entonces proponía la existencia de un sistema de transferencias mediante un intermediario fosforilado acoplado a las reacciones de oxido-reducción específicas de la cadena respiratoria. Sin embargo, nunca se pudo aislar al intermediario fosforilado que permitiría explicar el proceso de acoplamiento entre la actividad de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa y fotosintética. Es por lo anterior que Mitchell propuso el acoplamiento quimiosmótico. En este modelo, la organización supramolecular de los sistemas enzimáticos presentes en la membrana mitocondrial juega un papel importante en la traslocación de protones y el flujo de electrones a través de la membrana, lo que permite el acoplamiento entre la fosforilación oxidativa y la producción de ATP.

La síntesis de ATP se apoya en la energía libre disponible gracias a una diferencia de concentración de protones separados por una membrana (Nelson *et al.*, 2017). El bombeo de protones es impulsado por reacciones de óxido-reducción. Los electrones provenientes de $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 son cedidos en una serie de reacciones redox llevadas a cabo por complejos enzimáticos de la cadena de transporte de electrones. Las sucesivas reacciones redox son favorecidas por un incremento progresivo en su potencial redox, lo que a su vez impulsa la generación de flujos de electrones a través de la membrana interna, que a su vez facilitan la translocación de protones desde la matriz mitocondrial hacia el lumen de las crestas mitocondriales. El aceptor final de los electrones es el O_2 que consumen los organismos aerobios formando H_2O . Así, de manera paralela, conforme fluyen los electrones por los diferentes componentes de la cadena respiratoria, se lleva a cabo un bombeo de protones en contra del gradiente de concentración que se encuentra acoplado a las reacciones redox de la cadena de transporte de electrones. En el panel A de la **Figura 5**, se muestra un esquema general de la cadena de transporte de electrones y su relación con la síntesis de ATP. En la figura, se visualiza la generación de un gradiente electroquímico de protones ya sea: Entre la membrana plasmática, la membrana tilacoidal o en este caso, la cresta mitocondrial. La generación del gradiente electroquímico de protones generalmente es obtenido gracias a los complejos I-IV (Véase la **Figura 5** panel **B**) como se detallará a continuación:

El complejo I también denominado NADH deshidrogenasa es un complejo con forma de L y consta de cuatro módulos funcionales. Dos módulos (N y Q) constituyen el brazo incrustado en la membrana, mientras que los otros dos módulos (PP y PD) se prolongan hacia la matriz (Wirth *et al.*, 2016). El complejo I está constituido de 45 subunidades en humanos, de las cuales, 14 constituyen el core o núcleo central de la enzima y se encuentran conservadas desde bacterias hasta humanos. De las 14 subunidades esenciales del complejo I, siete están localizadas en el brazo membranal y siete en el brazo de la matriz (Wirth *et al.*, 2016). Adicionalmente posee un FMN y al menos ocho centros fierro azufre. La oxidación del NADH se lleva a cabo en el brazo de la matriz donde se toma un ion hidruro para transferirlo al FMN. Del FMN se transfieren dos electrones (e^-) a través de múltiples centros FeS hasta transferir los electrones fuera del complejo, cediéndolos a una ubiquinona o coenzima Q. Paralelo a la transferencia de electrones, se realiza el bombeo de tres protones por par de electrones gracias a tres subunidades presentes en el brazo membranal: Nqo12, Nqo13 y Nqo14. Estas subunidades están relacionadas al antiportador $Na^+ -H^+$. El cuarto protón parece ser bombeado por una subunidad cercana al sitio de unión a la quinona (Baradaran *et al.*, 2013). La ubiquinona (Q) puede recibir dos electrones para obtener ubiquinol (QH_2).

El complejo II también denominado succinato deshidrogenasa consta de cuatro subunidades. Las subunidades A y B se localizan en la porción soluble, mientras que la porción incrustada en la membrana está constituida por las subunidades C y D. El complejo II posee cinco grupos prostéticos: un FAD, tres centros fierro azufre y un grupo Hemo b. Nombrados en orden al incremento en proximidad con la porción membranal. El sitio de unión al succinato se encuentra en la subunidad A. Con la oxidación del succinato, dos electrones son transferidos al FAD y posteriormente a los centros fierro azufre. El grupo hemo no pertenece a la vía principal de transferencia de electrones, sin embargo, su importancia radica en la protección para reducir o evitar la generación de ROS (Sun *et al.*, 2005).

El complejo II participa en la oxidación del succinato y, al igual que el complejo I, reduce la ubiquinona. A diferencia del complejo I, el complejo II no realiza un bombeo de

protones. Sin embargo, alimentará al complejo III y IV. Tanto el complejo I como el complejo II transfieren electrones a la coenzima Q para convertirla en QH₂.

El complejo III, también llamado ubiquinona: citocromo c oxidorreductasa es un dímero funcional. Cada monómero está constituido por tres proteínas centrales: citocromo b, citocromo c₁ y una proteína ferro-sulfurada tipo Rieske con dos centros Fe-2S y 8 subunidades adicionales (Schägger *et al.*, 1995). Como grupos prostéticos el citocromo b posee dos hemo (b_H y b_L), la proteína ferro-sulfurada tipo Rieske posee dos centros Fe-2S y el citocromo c₁ posee un grupo hemo. La ubiquinona tiene dos sitios de unión por monómero para la ubiquinona: Q_P y Q_N que corresponde al sitio de unión del ubiquinol y ubiquinona respectivamente. El complejo III funge como intermediario en la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo c a través de dos ciclos de la quinona denominados ciclo Q propuestos por Mitchell (Mitchell, 1975). El ciclo Q inicia con la unión de QH₂ al sitio Q_P. La oxidación de QH₂ libera dos H⁺ y dos e⁻. Los protones son liberados al espacio intermembranal. Cada e⁻ toma una dirección distinta. Un e⁻ es transferido a los centros hierro azufre y posteriormente al hemo c₁ para después reducir al citocromo c. El segundo e⁻ es transferido al Hemo b_L, Hemo b_H y finalmente a una ubiquinona localizada en el sitio Q_N (oxidada) para reducirla a un radical semiquinona. En la siguiente oxidación de QH₂ un e⁻ nuevamente será dirigido al citocromo c con la liberación de dos H⁺ al IMS. El segundo e⁻ tomará nuevamente la ruta hacia Q_N para reducir el radical semiquinona a QH₂. Para la reducción a ubiquinol el radical semiquinona toma dos protones de la matriz mitocondrial. El QH₂ recién generado es liberado para poder ser reutilizado. Tomando en cuenta el ciclo Q, por cada QH₂ oxidado se reducen dos citocromos c, además de la toma de dos protones del lado N o matriz mitocondrial y la colocación de cuatro protones al lado P o espacio intermembranal. Sin embargo, dos de los cuatro protones transferidos al lado P son electrogénicos y dos son electroneutros.

El citocromo c es una proteína soluble que acepta un electrón en su grupo hemo y lo transfiere al complejo IV. El complejo IV, también conocido como citocromo c oxidasa, es una proteína dimérica. En mamíferos, cada monómero está constituido por trece subunidades. Sin embargo, el complejo IV de bacterias está constituido por tres o cuatro subunidades por monómero. Las subunidades más conservadas del complejo IV son la subunidad I, la

subunidad II y la subunidad III. La subunidad I posee un Cu_B , un Hemo a_3 y un Hemo a como grupos prostéticos mientras que la subunidad II cuenta con un Cu_A . La oxidación-reducción entre el complejo IV y el citocromo c transfiere un e^- , a partir de la oxidación del citocromo c. El electrón es transferido a Cu_A , hemo a, hemo a_3 y hemo Cu_B para finalmente ser transferido a un oxígeno. Son requeridos un total de cuatro citocromos para la reducción de una molécula de O_2 para obtener dos moléculas de H_2O . En paralelo a la reducción de O_2 a H_2O con cuatro electrones, son tomados cuatro protones del lado N para la reducción a H_2O y son bombeados otros cuatro H^+ hacia el lado P. Finalmente, en el siguiente apartado se revisará el aprovechamiento del gradiente electroquímico de protones para sintetizar ATP a través de la F_1F_0 ATP sintasa.

Al elaborar el recuento por molécula de glucosa utilizada se obtienen: la producción neta de dos NADH y dos ATP en la glucólisis que ocurre en el citosol. Cuando las dos moléculas de piruvato, producto de la glucólisis se canalizan a la mitocondria, se obtiene además dos NADH de la oxidación de dos piruvatos con la formación de 2 moléculas de acetil-CoA. Si estas últimas dos moléculas, alimentan al ciclo de Krebs, tenemos que al finalizar dos vueltas del ciclo se obtienen 6 $\text{NADH}+\text{H}^+$, dos FADH_2 y dos GTP. Así, por cada molécula de glucosa se obtiene un total de 10 $\text{NADH}+\text{H}^+$, dos FADH_2 , dos ATP y dos GTP (Voet *et al.*, 2016). Además, el bombeo de protones por cada $\text{NADH}+\text{H}^+$ oxidado permite la síntesis aproximada de 2.5 moléculas de ATP. Por otro lado, por cada FADH_2 se producen aproximadamente 1.5 moléculas de ATP. En resumen, el total de moléculas de ATP que se obtiene es de alrededor de 32 moléculas de ATP por cada glucosa oxidada.

En animales, plantas y hongos se ha encontrado además de los cuatro complejos antes mencionados, la presencia de una oxidasa alterna (Hernansanz-Agustín & Enríquez, 2023). En el caso de *S. cerevisiae* carece de complejo I y la oxidasa alterna cumple la función de oxidar el $\text{NADH}+\text{H}^+$ (de Vries & Grivell, 1988). Sin embargo, la oxidasa alterna, no se encuentra en una buena cantidad de especies incluido el humano.

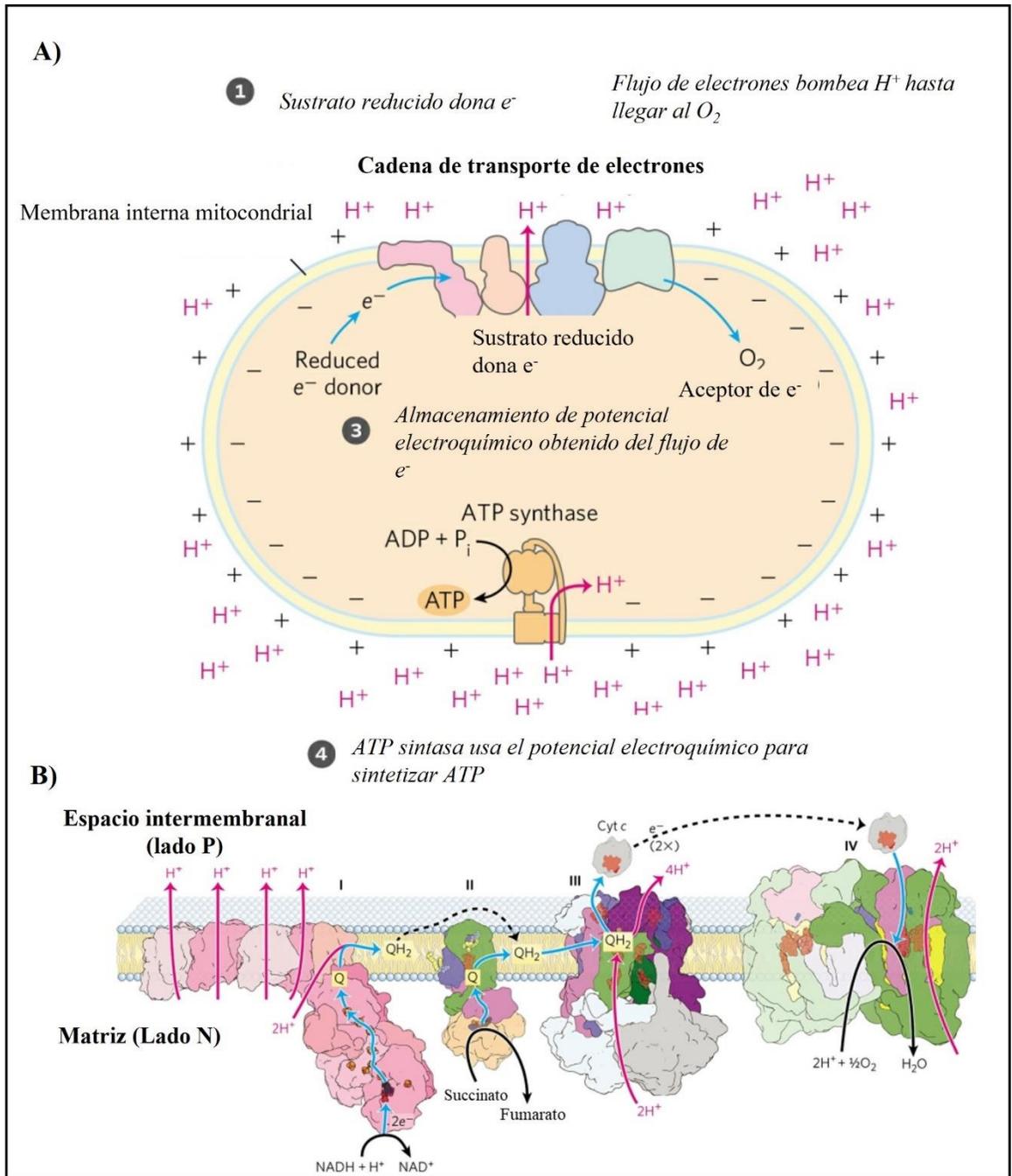


Figura 5. A). Esquema que resume la síntesis de ATP a través de un mecanismo quimiosmótico. **1)** Sustrato reducido (NADH+H⁺ o FADH) dona electrones (e⁻). **2)** El flujo de electrones permite el bombeo de protones (H⁺) **3)** El potencial electroquímico es almacenado y **4)** Se utiliza el potencial electroquímico para sintetizar ATP. **B).** Se desglosan los complejos de la cadena de transporte de electrones que participan en la generación del potencial electroquímico. Flechas azules: Flujo de electrones desde los donadores hasta el receptor final. Flechas rosas: Bombeo de protones. Esquema modificado de Nelson y colaboradores (2017).

Por otra parte, los estudios sobre la organización de los complejos de la cadena de transporte de electrones involucró múltiples modelos. Una vez identificada la actividad enzimática del citocromo c, así como de la ubiquinona (Keilin & Hartree, 1947), se elucidó la secuencia de proteínas donde ocurrían las reacciones de oxidación-reducción (Chance & Williams, 1956). Fue entonces cuando se acuñó el término “oxisoma” para describir unidades con capacidad de transporte electrónico que operaban a través de grupos hemo yuxtapuestos (Chance *et al.*, 1963). Dando lugar a el modelo sólido que consideró asociaciones fijas entre los complejos. El modelo sólido comenzó a ganar popularidad. Sin embargo, la reconstitución de complejos independientes con actividad enzimática (Hatefi *et al.*, 1962), así como una identificación de libertad en la difusión lateral llevaron a cuestionar el modelo sólido y el surgimiento del modelo fluido (Hackenbrock, 1977). El modelo fluido, consideró movimientos constantes e independientes entre los complejos, así como la libre difusión de la quinona y el citocromo c. El modelo fluido desplazó al modelo sólido.

En 1989, Allen, gracias a experimentos de congelamiento y criofractura obtiene arreglos en filas dobles de proyecciones de 9 nm con un espacio de 12 nm entre ellas zigzagueando las crestas mitocondriales. Las proyecciones de 9 nm habían sido reconocidas previamente como porciones F_1 de la ATP sintasa. Identifica además otras filas de proyecciones de 10 nm que especula podría tratarse del complejo I (Allen *et al.*, 1989). Sin embargo, en el año 2000, Schagger y Pfeiffer (Schagger & Pfeiffer, 2000), reportaron geles nativos de solubilizados de mitocondrias de levaduras y mamíferos. Al utilizar un detergente suave (digitonina), identificaron la migración de complejos mitocondriales asociados denominados supercomplejos, retomando la discusión entre el modelo sólido y el fluido. Los supercomplejos se hallaron en estequiometrias bien definidas en organismos muy diversos incluyendo la espinaca (Krause *et al.*, 2004; Schagger & Pfeiffer, 2000). Las proporciones de supercomplejos obtenidos podían modificarse de acuerdo con el sustrato utilizado para alimentar a la cadena. También fue posible identificar complejos libres funcionales (Schagger & Pfeiffer, 2000).

Los supercomplejos más frecuentemente encontrados en plantas y mamíferos son: I_1III_2 , y $I_1III_2IV_1$. El supercomplejo $I_1III_2IV_1$ tiene la característica de contener los complejos necesarios para llevar a cabo la oxidación del NADH hasta la formación de H_2O , por lo que

es denominado como respirosoma. La aparente contradicción entre el modelo sólido y el modelo fluido encontró un punto de convergencia en el modelo plástico (Acín-Pérez *et al.*, 2008; Enríquez, 2016), en donde los complejos pueden encontrarse simultáneamente libres o en asociaciones de supercomplejos. Por su parte, el complejo II suele mantenerse aislado del resto de los complejos respiratorios.

Estudios dirigidos a explorar la distribución de los complejos que realizan la fosforilación oxidativa, realizados a través de un marcaje con oro del complejo III y la ATP sintasa, así como su visualización por TEM, han indicado que la cresta mitocondrial contiene cerca del 94% del complejo III. Un resultado similar se obtuvo con la distribución del citocromo c (85%), lo que apoya que la fosforilación oxidativa se lleva a cabo principalmente en la cresta mitocondrial (Gilkerson *et al.*, 2003).

Otras funciones fisiológicas que mantienen un funcionamiento similar al explicado por la teoría quimiosmótica, es la fotofosforilación que es realizada en plantas, el transporte activo en las membranas y el movimiento flagelar, ambos en bacterias, son ejemplos de procesos que requieren de la formación de un gradiente electroquímico, y que se mencionan en el apartado siguiente de forma breve.

1.3. La familia de las ATPasas/ATP sintasas rotatorias translocadoras de iones

1.3.1 ATPasas/ATP sintasas rotatorias translocadoras de iones.

La superfamilia de las ATP sintasas rotatorias translocadoras de iones incluye a: la F_1F_0 ATP sintasa (ATP sintasa tipo F), la A_1A_0 ATP sintasa (ATP sintasa tipo A) y la V_1V_0 ATP sintasa (ATPasa tipo V) principalmente, así como también incluye la ATP sintasa tipo P y los transportadores ABC, aunque estas últimas dos no se revisarán. La ATP sintasa tipo F, tipo A y tipo V comparten un origen común y un funcionamiento similar como enzimas múltiproteicas membranales, cuyo funcionamiento se basa en la generación o utilización de un gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu H^+$) o, en algunas ocasiones, de iones Na^+ entre dos compartimentos separados por una membrana. Por lo tanto, habrá un lado con mayor carga positiva (lado P) y lado con carga negativa (lado N) (Zubareva *et al.*, 2020). La superfamilia de las ATP sintasas mantienen una distribución universal en todos los dominios

de la vida, lo que las convierte en una de las superfamilias de enzimas más antiguas. La A_1A_0 ATP sintasa se encuentra presente en la membrana plasmática de arqueas y en algunas bacterias, como resultado de transferencias horizontales independientes (Allewell *et al.*, 2013). La F_1F_0 ATP sintasa se encuentra tanto en la membrana plasmática de bacterias como en la membrana interna mitocondrial y la membrana tilacoidal de los cloroplastos (en eucariotes) incluso se ha hallado su presencia en algunas arqueas como en *Methanosarcina acetivorans* y *Methanosarcina. Barkeri* (Müller & Grüber, 2003; Zubareva *et al.*, 2020). Por último, la V_1V_0 ATPasa se encuentra en múltiples organelos de células eucariotes como, por ejemplo, vacuolas.

Las ATP sintasas tienen la estructura de un nanomotor. La enzima modelo con estructura más simple es la ATP sintasa de tipo F de *Bacillus* sp PS3 que se describirá para entender su estructura. Sin embargo, todas las ATP sintasas tienen una enorme similitud estructural y funcional y puede encontrarse un buen número subunidades homologas entre las subunidades más esenciales de las ATP sintasas (Véase la **Tabla 1** así como la **Figura 6**).

La ATP sintasa de tipo F consta de una porción fija y una móvil. La porción móvil o rotor de la enzima incluye a un anillo de subunidades “c” insertado en la membrana interna mitocondrial. El anillo de subunidades “c” se encuentra conectado a un tallo central por las subunidades “ γ ” y “ ϵ ” en las ATP sintasas de tipo F bacteriana, adicional a la subunidad “ δ ” en la ATPasa de tipo F de eucariotes (la subunidad “ δ ” en la ATP sintasa de tipo F mitocondrial es homóloga a la subunidad “ ϵ ” de la ATP sintasa de tipo F bacteriana.). El estator está compuesto por el tallo periférico, la subunidad “a” que abraza a parte del anillo de subunidades “c” y un anillo de subunidades “ α ” y “ β ” alternadas en estequiometría 3:3 que se encuentran conectadas al tallo central. El tallo periférico, por su parte está conformado por una subunidad “ δ ” (distinta a la “ δ ” mitocondrial) y la subunidad “b” y “b2”. De hecho, la subunidad “ δ ” presente en la ATP sintasa bacteriana es homóloga a la subunidad OSCP de la ATP sintasa tipo F mitocondrial), La interfaz entre la subunidad “ β ” y “ α ” es la región donde se lleva a cabo la unión del sustrato Mg-ADP.

Tabla 1. Relación de homología entre las subunidades más conservadas de las distintas ATP sintasas. Para cada tipo de ATP sintasa se utilizó como modelo estructuras 3-D resuelta (su número de acceso en el Protein Data Bank está indicado en el primer renglón de cada columna). La familia de proteínas, de acuerdo con la base de datos de Pfam, a la que pertenece cada subunidad se indica entre paréntesis.				
Tipo A 5GAR	Tipo V 3J9T	Tipo F (bacterias) 6OQR	Tipo F (mitocondrias) 7AJC	Comentario
Subunidades Catalíticas (forman parte de la porción soluble A ₁ /V ₁ /F ₁ respectivamente)				
β (A) (PF02874, dominio del barril-beta) (PF16886, extensión del dominio N-terminal) (PF00006, dominio de unión al nucleótido)	β (A) (PF02874, dominio del barril-beta) (PF16886, extensión del dominio N-terminal) (PF00006, dominio de unión al nucleótido)	β (PF02874, dominio del barril-beta), (PF00006, dominio de unión al nucleótido)	β (PF02874, dominio del barril-beta), (PF00006, dominio de unión al nucleótido)	
α (B) (PF02874, dominio del barril-beta), (PF00006, dominio de unión al nucleótido)	α (B) (PF02874, dominio del barril-beta), (PF00006, dominio de unión al nucleótido)	α (PF02874, dominio del barril-beta), (PF00006, dominio de unión a nucleótido) (PF00306, dominio de C terminal)	α (PF02874, dominio del barril-beta) (PF00006, dominio de unión a nucleótido) (PF00306, dominio de C terminal)	
Subunidades del Tallo central (forman parte de la porción soluble A ₁ /V ₁ /F ₁ respectivamente)				
D ** (PF01813)	D ** (PF01813)	γ ** (PF00231)	γ ** (PF00231)	Homología incierta entre “D” y “γ”
F (PF01990)	F (PF01990)	-	-	
-	-	ε ^b (PF02823, dominio de sándwich-beta) (PF00401, dominio de hèlice alfa)	δ ^m (PF02823)	
-	-	-	ε ^m (PF04627)	

d (C) (PF01992)	d (PF01992)	-	-	La subunidad d en la ATP sintasa tipo A también puede ser denominada como subunidad C
Subunidades Membranales (forman parte de la porción insoluble $A_o/V_o/F_o$ respectivamente)				
c (K y L) (PF00137)	c (c, c'y c'') (PF00137)	c (PF00137)	c (PF00137)	
a (I) (PF18274, dominio lóbulo proximal del N-terminal) (PF18670, N-terminal) (PF01496, dominio 116 kDa de la ATPasa tipo V)	a (PF01496)	a (PF00119)	a (PF00119)	La subunidad a de la ATP sintasa de Archeas tipo A puede ser denominada como subunidad I
Subunidades del Tallo periférico (forman parte de la porción soluble $A_i/V_i/F_i$ respectivamente)				
G (H) (PF16999)	G (PF03179)	b (PF00430)	b (PF05405)	La subunidad G de la ATP sintasa tipo A puede ser denominada como subunidad H. Posible homólogo G con b
E* (PF01991)	E* (PF01991)	δ^b (PF00213)	OSCP (PF00213)	
-	C (PF03223)	-	-	
-	H (PF03224, dominio N- terminal) (PF11698, dominio C- terminal)	-	-	
<p>Nota: Puede observarse en la Tabla que hay varias subunidades en bacterias y mitocondrias que, sin ser homólogas, reciben el mismo nombre. Para distinguirlas, en este trabajo seguiremos la propuesta de Muench <i>et al.</i> (2011), utilizando el superíndice b para las descritas en bacterias, y el superíndice m para las descritas en mitocondria. Así, La subunidad ϵ^b ha sido remarcada para enfatizar que no es homóloga con la ϵ^m sino con la δ^m. Por su parte la δ^b es homóloga con la subunidad OSCP.</p> <p>* No hay claridad en su relación evolutiva.</p> <p>Fuente: Müller <i>et al.</i> (2003), Muench <i>et al.</i> (2011) y Zuvareva <i>et al.</i> (2020).</p> <p>** La subunidad D y la subunidad γ forman una estructura en hélice superenrollada. Sin embargo, hay diferencias a nivel de secuencia de acuerdo con Numoto (2009) y Muench (2011). La definición original de homología de Owen (1843: 379) es “the same organ in different animals under every variety of form and function” Parafraseando a Owen, una definición actual del término sería sustituir el concepto de "organo" por el concepto de "gen".</p>				

Otra manera de identificar a las subunidades tiene que ver con el nombre de la enzima. La primera enzima de la familia en ser descubierta fue la ATP sintasa tipo F designando “F₁ o Fracción 1”, a la porción soluble de la enzima que es capaz de disociarse (Pullman *et al.*, 1960). La porción F₁ incluye al anillo de subunidades α y β , así como las subunidades del tallo central. Mientras que se designó como F_O a la porción membranal por ser sensible a la oligomicina (Racker, 1963). La porción F_O incluye al anillo de subunidades c, la subunidad a y la subunidad b. En la ATP sintasa mitocondrial la porción F_O también incluye a un número considerable de subunidades supernumerarias (Walker *et al.*, 1991) que fueron denominadas así al no ser esenciales para la síntesis de ATP. Sobre las subunidades supernumerarias se ahondará con detalle más adelante.

Al identificarse otras ATP sintasas se continuó usando una nomenclatura similar cambiando la F de fracción por V de Vacuolar (Zhang *et al.*, 1992) ya que fue el primer organelo donde se identificó, o A de “archaea” a pesar de que la V_O y la A_O no son sensibles a oligomicina.

Con la actividad catalítica de la enzima, el anillo de subunidades c gira con el paso de protones o iones. Los protones o iones entran y salen por dos hemicanales de la subunidad a asociada íntimamente al anillo de subunidades c. El movimiento del rotor a su vez es transmitido por el tallo central a las subunidades catalíticas. El cambio estructural inducido en las subunidades catalíticas por las subunidades del tallo central permitirá la síntesis o hidrólisis de ATP. La subunidad γ brinda una asimetría (Duncan *et al.*, 1995) que permite la adopción de tres conformaciones distintas entre cada par de subunidades $\alpha\beta$. La adopción de los estados conformacionales fue propuesta por Boyer y colaboradores (Boyer *et al.*, 1977). Los investigadores encontraron una relación entre el ADP y Pi y la producción de ATP, lo cual los llevó a proponer el modelo alternante. En este modelo, se sugiere que la producción de ATP ocurre a través de cambios conformacionales en el mecanismo de producción de ATP. Teniendo así que la interfaz $\alpha\beta$ alterna con sus vecinos entre tres estados distintos: β_{TP} , β_{DP} , β_E . Se nombra como β_{TP} cuando la subunidad β es ocupada por Mg-ATP. Siendo β_{DP} ocupada por Mg-ADP. Mientras que β_E corresponde a la interfaz cuando se encuentra vacía para darse un recambio del sustrato.

La síntesis o hidrólisis se lleva a cabo de acuerdo con la dirección del flujo de iones o protones (Ver **Figura 6**). Sí los iones o protones van del lado P al lado N permitirá la síntesis de ATP. Sí se disipa la diferencia de gradiente, en algunos casos, se puede hidrolizar ATP girando el anillo c en el sentido contrario de las manecillas del reloj, lo que permite la restauración del gradiente electroquímico.

Las ATP sintasas de tipo F y de tipo A pueden realizar la reacción en ambos sentidos, aunque usualmente trabajan en el sentido de la síntesis de ATP. Sin embargo, bajo determinadas condiciones pueden tener actividad en el sentido de la hidrólisis. En bacterias, por ejemplo, se lleva a cabo la hidrólisis de ATP en condiciones anaerobias para mantener el gradiente ya que es utilizado también para transporte, rotación flagelar o quimiotaxis (Walker, 2013). En mitocondrias, en condiciones de isquemia o en cloroplastos, en condiciones de luz baja, pueden llevar a la hidrólisis de ATP. Las ATP sintasas tipo F de mitocondrias, cloroplasto o incluso otras bacterias regulan la hidrólisis de ATP a través de mecanismos sensibles a cambios de pH. Por ejemplo, en *Escherichia coli* o cloroplastos el mecanismo de inhibición involucra al carboxilo terminal de la subunidad ϵ que se inserta en la interfaz catalítica (Sternweis & Smith, 1980). La subunidad IF_1 en la ATP sintasa mitocondrial (Pullman & Monroy, 1963) o la subunidad ζ mantiene un rol similar en mitocondrias y en α proteobacterias respectivamente (Mendoza-Hoffmann, Pérez-Oseguera, *et al.*, 2018; Mendoza-Hoffmann, Zarco-Zavala, *et al.*, 2018; Morales-Ríos *et al.*, 2010; Zarco-Zavala *et al.*, 2014).

Las ATPasas de tipo V, en cambio, actúan como una bomba de protones dependiente de la hidrólisis de ATP y su función es acidificar compartimentos celulares tales como: vacuolas, endosomas tardíos, y cisternas Golgi trans. También es posible encontrarlas en la membrana plasmática acidificando el espacio extracelular en células especializadas como osteoclastos, necesario para la reabsorción o mantenimiento del hueso, o en células intercaladas renales (Walker, 2013). En plantas, se han visto involucradas en la respuesta al estrés salino. Incluso su función se ha encontrado involucrada con vías de señalización (Zubareva *et al.*, 2020). En la ATPasa de tipo V la síntesis de ATP solamente se ha obtenido

in vitro generando el $\Delta\mu\text{H}^+$ a través de la introducción artificial de una pirofosfatasa translocadora de protones en presencia de pirofosfato (Hirata *et al.*, 2000).

Por otra parte, la similitud entre secuencias de la subunidad A y B presentes (β y la α en la ATP sintasa tipo F) llevó a Gogarten (Gogarten *et al.*, 1989) a sugerir que comparten el mismo ancestro en común, siendo esta la hipótesis más aceptada sobre el origen de las ATP sintasas rotatorias. De acuerdo con sus resultados, la similitud entre la subunidad β y la α (A y B en ATP sintasa tipo A y V) sugiere fuertemente que son resultado de un evento de duplicación previo a la separación entre eubacterias y arqueas. También se encontró una mayor identidad entre las subunidades A y B de la A_1A_0 ATP sintasa con sus contrapartes de la V_1V_0 ATPasa en comparación con las subunidades β y α de la F_1F_0 ATP sintasa (50% y 25% respectivamente) así como una región homóloga que pueden encontrarse en las subunidades de la ATP sintasas de tipo A y V pero no en la tipo F. Esta región no homóloga sugiere fuertemente una mayor cercanía filogenética entre las dos primeras (tipo A y V) con respecto a la ATP sintasa de tipo F. La presencia tanto de la ATP sintasa de tipo F y de tipo V en células eucariotes es consistente con su origen mismo a partir de un proceso de endosimbiosis. La ATP sintasa de tipo F sería incorporada a partir de la ATP sintasa bacteriana a través del proceso de endosimbiosis (Ver **Figura 7**).

1.3.2 Particularidades de la composición de las ATP sintasas.

Otras subunidades altamente conservadas conforman al anillo de subunidades c de número variable. En el caso del anillo de subunidades c de la ATP sintasa vacuolar está conformado por anillos heterooligoméricos de dos o, en levaduras, hasta tres subunidades c homólogas que son muy probablemente, resultado de eventos de duplicación (Mandel *et al.*, 1988).

Las ATP sintasas de tipo A y V presentan a la subunidad d, F y D en el tallo central. La subunidad D es la contraparte de la subunidad γ de la ATP sintasa tipo F. Tanto la subunidad d y la F solo se encuentran presente en La ATPasa de tipo V y tipo A. La subunidad D es similar en estructura a la subunidad γ presente en la ATPasa tipo F formando una hélice superenrollada pero distinta a nivel de secuencia, de acuerdo con Numoto (2009) y Muench (Muench *et al.*, 2011), por lo que no puede descartarse la posibilidad de que pudieran ser incluso análogas entre las ATP sintasas (Véase la **Tabla 1**). La subunidad D esta descrita en

la base de datos de Pfam como perteneciente a la familia de proteínas pfam01813 mientras que la subunidad γ pertenece a la familia pfam00231.

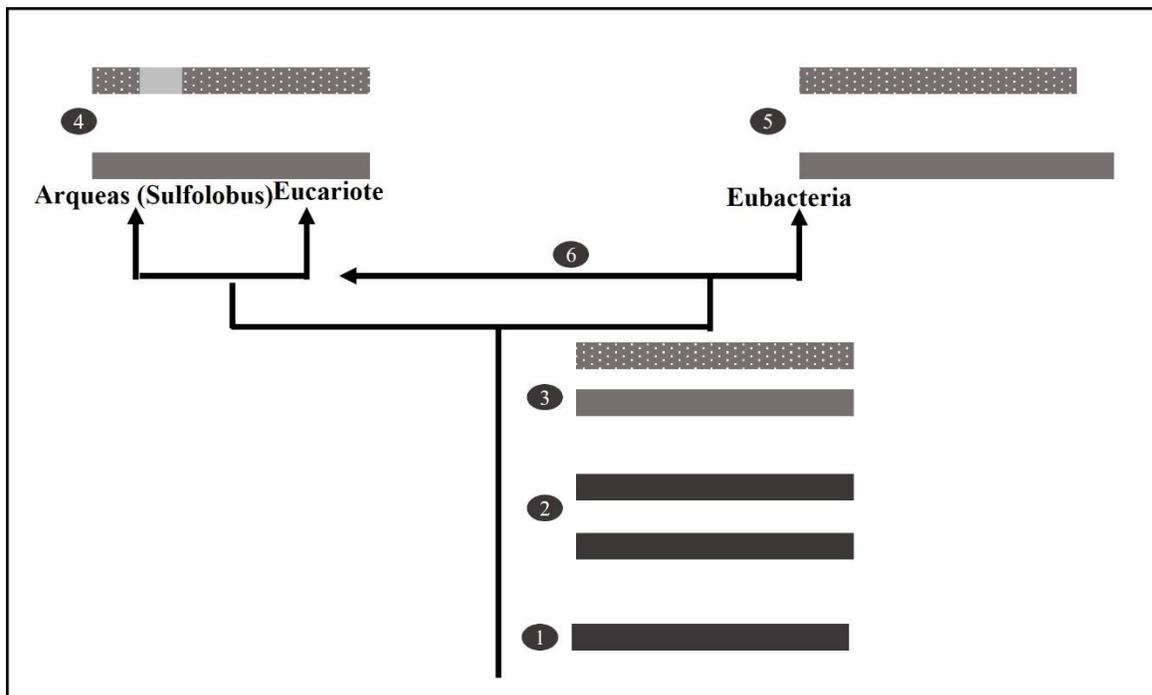


Figura 7.. La relación filogenética más probable de las subunidades β (A en ATP sintasa tipo A y tipo V) y α (B en ATP sintasa tipo A y V) de las ATP sintasas. (1) Subunidad ancestral con actividad catalítica. (2) Posteriormente habría un evento de duplicación. (3) Una de las subunidades pierde su capacidad de unión al sustrato. (gris). La otra mantiene su actividad (gris punteada) (4) La subunidad A de la ATP sintasa tipo A y tipo V gana una región que no se encuentra en la subunidad β en la ATP sintasa tipo F. (5) La subunidad α de la ATP sintasa tipo F gana tamaño. (6) Evento de endosimbiosis. Replica de esquema basado en resultados por parsimonia de Gogogarten (1989)

Si bien, existe consenso en que todas las ATPasas rotatorias tienen un mismo ancestro común, la duplicación que dio origen a las ATP sintasas tipo F y tipo V, es un evento anterior al origen del último ancestro común, por lo que, si bien estructural y funcionalmente son equivalentes, ya no es posible detectar similitud de secuencias por métodos como BLASTP y HMMER (resultados no mostrados).

Las subunidades C y H presentes en la ATPasa vacuolar son subunidades exclusivas y funcionan como punto de unión entre las subunidades del tallo periférico (E y G) y el anillo

c de la enzima (Vasanthakumar & Rubinstein, 2020). Además, se añadieron otras subunidades a la ATP sintasa tipo V que no tienen su contraparte en las ATP sintasa tipo F o tipo A y tienen que ver con una regulación de su actividad por un mecanismo particular de disociación reversible de la porción V_1 (Müller & Grüber, 2003).

El tallo periférico es la porción de la enzima con mayor divergencia entre las ATP sintasas ya que la F_1F_0 ATP sintasa posee un solo tallo periférico. A diferencia de los dos de la A_1A_0 ATP sintasa y los tres tallos periféricos de la V_1V_0 ATPasa. Tanto la ATP sintasa tipo A como la tipo V poseen una subunidad E y G por cada tallo periférico (posibles homólogos de la subunidad δ y b de la ATP sintasa tipo F) (Zubareva *et al.*, 2020). La subunidad I, de la ATP sintasa de tipo A (homólogo de la subunidad a en la ATP sintasa tipo F) posee un dominio en forma de collar que la diferencia de las ATP sintasas de tipo F. El dominio en forma de collar permite la extensión de dos de los tallos periféricos de la ATPasa tipo V.

En el tallo periférico de la ATP sintasa tipo F de mamíferos solamente se encuentra una subunidad b junto con la subunidad F6 y la d, además de poseer subunidades supernumerarias presentes en la región membranal (Walker, 2013) (Véase **Tabla 2**). En cambio, el tallo periférico como las subunidades presentes en La ATP sintasa de tipo F de cloroplasto, muestra una mayor similitud a la ATP sintasa tipo F presente en bacterias.

La ATP sintasa de tipo F presenta particularidades importantes en mitocondrias, además de una importante diversidad de subunidades adicionales linaje-específicas (Ver **Tabla 2**) como el factor B presente en la ATP sintasa tipo F de mamíferos, también conocido como subunidad s, el cual funciona como un factor de acoplamiento mitocondrial, ya que es capaz de restaurar la fosforilación oxidativa en vesículas aisladas de membrana mitocondrial (Lee *et al.*, 2008), o las subunidades STF1 y STF2 presentes en hongos que son proteínas asociadas con Inh1 (Wittig *et al.*, 2008)

Es posible encontrar una alta divergencia estructural entre las subunidades que conforman el tallo periférico de las ATP sintasas tipo F mitocondriales en algunos organismos eucariotes (Colina-Tenorio *et al.*, 2018). La otra característica son arreglos en doble fila de las ATP sintasas en los bordes de las crestas mitocondriales formando asociaciones dimérico/oligoméricas.

La descripción al respecto de ATP sintasas en arreglos de doble fila espaciadas por 12 nm presentes en el borde externo de la cresta se obtuvo por micrografías obtenidas por congelamiento rápido en *Paramecium multimicronucleatum* por Allen y colaboradores (Allen *et al.*, 1989). Posteriormente, la técnica para obtener proteínas membranales solubilizadas por BN PAGE permitió obtener arreglos dimérico/oligoméricos en *Saccharomyces cerevisiae* (Arnold *et al.*, 1998), en bovino (Schagger & Pfeiffer, 2000), así como en *Arabidopsis thaliana*, frijol, papa y cebada (Eubel *et al.*, 2003). El análisis de una segunda dimensión por SDS-PAGE permitió un acercamiento sobre la composición del dímero de la ATP sintasa tipo F (V_2) y sus monómeros (V_1) en *S. cerevisiae*, así como la caracterización de mutantes ayudó a identificar que las subunidades e, g y k se encontraban exclusivamente en el V_2 y que la eliminación de las subunidades e y g daban como resultado la pérdida del V_2 (Arnold *et al.*, 1998). Además, se descubrió que la delección de alguna de las subunidades e o g, en levaduras, estaba acompañada de una alteración en la morfología mitocondrial (Paumard *et al.*, 2002). Las crestas alteradas por la ausencia de V_2 adquirieron una conformación de “aros de cebolla”.

En paralelo a estos estudios, se aisló por primera vez al dímero de la ATP sintasa mitocondrial en mitocondrias de corazón de bovino (*Bos taurus*) (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005) y de levadura (*S. cerevisiae*) (Couoh-Cardel *et al.*, 2010). En estos estudios, sobre todo en el de la enzima de bovino, se observó una interfaz proteica conectando los sectores F_0 - F_0 del dímero la cual se propuso desde entonces que se formaba por las subunidades e y g (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005). Además de esto, aunado a estudios bioquímicos de reconstitución, se propuso que la proteína inhibidora de la F_1 -ATPasa mitocondrial (IF₁) también participaría en la dimerización y estabilización del dímero y oligómeros de la ATP sintasa mitocondrial (García *et al.*, 2006; Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005). Esta participación de la IF₁ en la dimerización, tetramerización y posterior oligomerización de la ATP sintasa mitocondrial se ha corroborado en recientes estudios de crío-microscopía electrónica de la ATP sintasa de cerdo (*Sus scrofa*) (Gu *et al.*, 2019; Mendoza-Hoffmann *et al.*, 2022). En resumen, hay una interfaz dimerizante F_0 - F_0 donde las subunidades e y g principalmente, que favorecen la dimerización de manera indirecta (como detallaremos más adelante). Con la oligomerización de la enzima se generan también dímeros transversales a lo largo de la cadena de ATP sintasas en las crestas mitocondriales (Paumard *et al.*, 2002). En los dímeros

transversales, hay otra interfaz dimerizante y oligomerizante entre los sectores F_1 - F_1 donde la IF_1 promueve y estabiliza a los dímeros que se forman longitudinalmente a lo largo de la cadena de las ATP sintasas y estabiliza la formación del dímero, tetrámero y posterior oligómero de las ATP sintasas (Mendoza-Hoffmann *et al.*, 2022).

Al estudiar las ATP sintasas de *Chlamydomonas reinhardtii*, se encontró un V_2 con una inusual dificultad para disociar la porción F_1 y con una subunidad atípica MASAP (de Mitochondrial ATP Synthase Associated Protein renombrada posteriormente como subunidad ASA1). Posteriormente a través del análisis por microscopía electrónica de *C. reinhardtii* y *Polytomella* sp se encontró que la interacción del V_2 se daba a través de la porción F_0 e inducía a una fuerte curvatura de la membrana mitocondrial (Dudkina *et al.*, 2005). Al analizar su composición por SDS-PAGE se identificaron homólogos de la subunidad α , β , γ , δ , a, c y OSCP. Sin embargo, no se identificaron homólogos para la subunidad ϵ , b, d, e, f, g, IF_1 , A6L o F6. En su lugar se identificaron las subunidades ASA 1-8 (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006), involucradas en la formación del tallo periférico y la dimerización.

De forma paralela, en *Trypanosoma brucei* (Zíková *et al.*, 2009) se encontró una ATP sintasa atípica donde 14 de las 22 subunidades identificadas parecían subunidades específicas de *Trypanosoma*. Las subunidades con homólogos identificados fueron las subunidades α , β , γ , ϵ , b, c y OSCP. Por su parte los resultados por microscopía electrónica en *Tetrahymena thermophila* mostraron un V_2 con una inusual estructura en paralelo, un dominio membranal inusualmente grande, así como la presencia de 7 subunidades canónicas y al menos 13 subunidades atípicas con subunidades aparentemente limitadas a ciliados (Balabaskaran Nina *et al.*, 2010)

Al buscar elucidar la relación entre los dímeros intactos y el característico arreglo oligomérico, se visualizó la morfología de la cresta y los arreglos oligómeros a través de promedios de subtomogramas en *S. cerevisiae* en WT, Δe , Δg y $\Delta bTM1$ (Davies *et al.*, 2012). Una de las observaciones más importantes que se obtuvieron en ese trabajo, es que los mutantes, además de carecer de crestas lamelares características del WT, mostraban pocas crestas de morfología vesicular. Por otra parte, la distribución de los monómeros de las ATP sintasas tipo F fue aleatoria. Para ahondar sobre una hipótesis del mecanismo de ensamblaje

de las filas de dímeros por autoensamble se realizaron simulaciones por dinámica molecular sobre el efecto de V_2 individuales en una bicapa lipídica. Los resultados sugirieron una deformación que refuerza una curvatura negativa que podría ser suficiente para facilitar el autoensamblaje en oligómeros (Davies *et al.*, 2012).

Posteriormente un experimento *in vitro* mostró la obtención de una curvatura en proteoliposomas al agregar V_2 de *Yarrowia lipolytica* y *Polytomella* sp. La presencia de curvaturas incrementaba conforme incrementaba la relación de proteína:lípido. En contraste, se obtuvieron vesículas esféricas si se agregaba el V_1 aislado (Ver **Figura 8**) (Blum *et al.*, 2019).

En resumen, existe una amplia evidencia sobre una variedad de subunidades implicadas en la dimerización y oligomerización de las ATP sintasas y su relación con la curvatura de la cresta mitocondrial (Davies *et al.*, 2011; García *et al.*, 2006; Giraud *et al.*, 2002; Minauro-

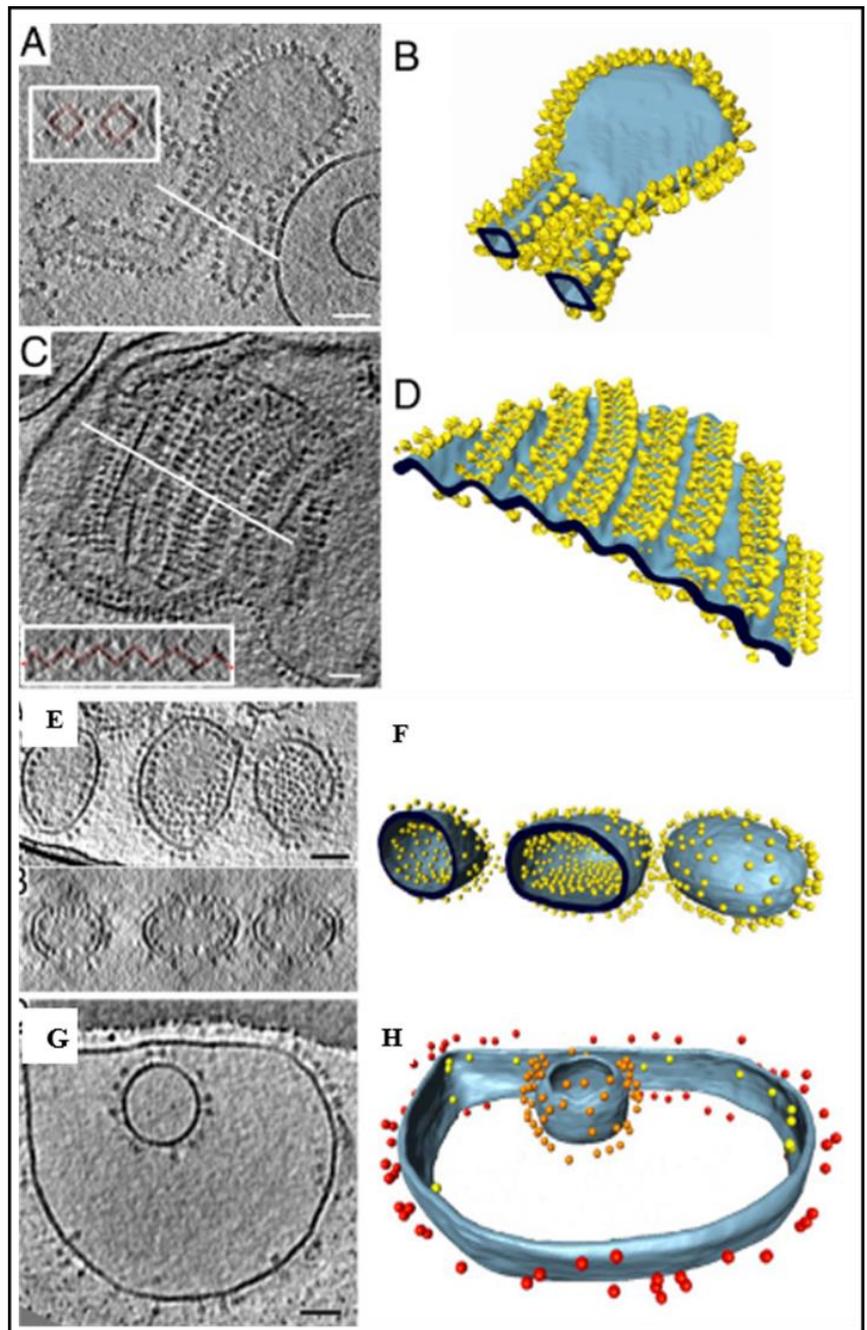


Figura 8. La sola presencia del V_2 de *Polytomella* sp y *Y lipolytica* provoca una curvatura de los proteoliposomas que se acentuaba con el incremento de la relación proteína:lípido(A-D). Misma que incrementó con el incremento de la relación proteína-lípido. A diferencia del V_1 (E-H). Tomada y modificada de Blum (2019).

Sanmiguel *et al.*, 2005). Se ha sugerido que las crestas mitocondriales incrementan el área de superficie para la fosforilación oxidativa optimizando la síntesis de ATP. En esta tesis nos concentraremos únicamente en las subunidades que se ha reportado participan en la dimerización del sector F_O de la ATP sintasa, es decir, principalmente en las subunidades e, g, i/j y k.

Todo esto sugiere que la conformación de los oligómeros para la formación de las crestas micondriales podría estar sujeta a fuertes presiones de selección, lo que posiblemente está asociado a lo señalado por Strauss (Strauss *et al.*, 2008) quien sugiere que las crestas mitocondriales pueden funcionar como trampas de protones. Sin embargo, la distribución filética de las subunidades que participan en la formación de dímeros no se ha estudiado a detalle. Futuros estudios permitirán detallar los distintos mecanismos específicos de formación del V₂, la interacción entre los dímeros, y por qué no, la historia evolutiva de las crestas mitocondriales. Algunas de las interrogantes a responder en cuestión son: ¿Cuál es el ensamble y mecanismo de interacción en cada tipo de V₂? ¿Tienen todos o algunos de los casos continuidad histórica que quizá no sea tan evidente o haya divergido tanto que sea irreconocible? ¿Son resultado de reclutamientos independientes? ¿Es esencial la presencia de V₂ en organismos eucariotes realmente? o ¿Será posible encontrar eucariotes sin dímeros de ATP sintasa? ó ¿Existirán otros tipos de V₂ sin identificar?

El presente trabajo estudia la historia natural y distribución filética de 4 de las subunidades accesorias de *S cerevisiae* que han mostrado un papel estructural en la formación de dímeros de la F₁F_O ATP sintasa.

2 Hipótesis

La dimerización de la F_1F_0 ATP sintasa depende de diferentes subunidades accesorias linaje-dependientes, por lo tanto, el fenómeno de dimerización de la enzima podría ser un evento evolutivo convergente y las subunidades dimerizantes accesorias, encontrarse ampliamente distribuidas en los eucariotes ya sea como proteínas homólogas o análogas.

3 Objetivos

3.1 Objetivo General

Determinar mediante análisis filogenéticos, la historia evolutiva y distribución filética de las subunidades accesorias del canal de protones F_0 asociadas a la formación de dímeros de la F_1F_0 ATP sintasa en los eucariotes.

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Recopilar evidencias experimentales del papel de las subunidades asociadas a la formación de dímeros de la F_1F_0 -ATP sintasa en diferentes organismos eucariotes.
- 2) Recuperar de las bases de datos públicas, las secuencias de aminoácidos de las subunidades responsables de la formación de dímeros de la F_1 - F_0 ATP sintasa.
- 3) Construir alineamientos a partir de los cuales se pueden generar árboles filogenéticos de las subunidades asociadas a la formación de dímeros.
- 4) Construir un árbol filogenético de la subunidad γ de la F_1F_0 -ATP sintasa, codificada por un gen de copia única que está muy conservado en bacterias y eucariotes, y que servirá como referencia para el análisis de la filogenia obtenida para las subunidades asociadas al V_2 de las F_1 - F_0 ATP sintasa.
- 5) Analizar presencia/ausencia de las subunidades accesorias asociadas a la formación de dímeros de las F_1 - F_0 ATP sintasa, a partir de su búsqueda en 1110 genomas de eucariotes completamente secuenciados (reference genomes)

4 Metodología

Se utilizó la herramienta BLASTP del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con matriz de sustitución BLOSUM 62 para recuperar las secuencias de aminoácidos de las subunidades responsables de la formación de V_2 de la F_1F_0 ATP sintasa. En forma paralela, se identificó en la base de datos Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) la familia a la que pertenecen las secuencias recuperadas y se colectaron secuencias representativas de cada una de las familias identificadas. Se realizó una depuración manual para eliminar secuencias duplicadas codificadas por un mismo gen. También recortamos los dominios extras que no pertenezcan a la proteína de interés y que pudieran estar presentes. Esto último se realizó utilizando la base de datos de dominios conservados del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) y empleando Bioedit como editor de secuencias (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>). También, se recuperaron las secuencias de proteínas de la base de datos de genomas de referencia del NCBI (RefSeq genome database).

En el caso de encontrar secuencias divergentes, se revisó la predicción del gene haciendo uso de la herramienta FGENESH+ para corregir posibles errores en la secuencia (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenes&group=programs&subgroup=gfind>). En casos necesarios, se realizó el remplazo con la predicción obtenida. Se utilizó CLUSTAL X (<http://www.clustal.org/>) para construir alineamientos múltiples de las secuencias obtenidas y/o Muscle (<https://drive5.com/muscle5/manual/topics.html>) (Edgar, 2004a, 2004b) y se realizaron correcciones manuales con Bioedit. Los análisis filogenéticos se realizaron con el programa MEGA7 y MEGAX (<http://www.megasoftware.net>) empleando el método de máxima verosimilitud (maximum likelihood). Por último, se utilizaron las secuencias alineadas para generar logos e identificar las posiciones más conservadas con la plataforma de weblogo 3 (<http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi>).

Una vez obtenidos los primeros árboles filogenéticos, se seleccionaron secuencias representativas (secuencias semilla) de las principales ramas del árbol. Las secuencias semilla fueron utilizadas para realizar búsquedas por blastp en los 1110 genomas de referencia completamente secuenciados depositados en el NCBI (refseq). Esto nos permitió realizar una búsqueda exhaustiva para obtener información cuantitativa sobre el número de

genes involucrados con la formación de V₂ dentro de nuestros 1110 genomas de referencia. De igual manera en algunos casos, y para corroborar que se obtuvieron todas las secuencias homólogas, incluso las más divergentes, se realizaron búsquedas de secuencias en Uniprot empleando la herramienta de búsqueda de secuencias HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>), la cual, mediante el empleo de perfiles de modelos ocultos de Markov (profile hidden Markov models (HMM)), es capaz de identificar con mayor sensibilidad que BLASTP, la existencia de homología entre secuencias (Potter *et al.*, 2018)

Se tomaron como punto de partida para los análisis, las secuencias con mayor información experimental, como son las subunidades e y g, i/j y k presentes en hongos y que están reportadas como responsables de la dimerización. De igual manera, se analizó también la subunidad γ ya que, como se mencionó anteriormente, se trata de una subunidad esencial para la catálisis codificada en la mayoría de los organismos en una copia única estrictamente conservada (resultados no mostrados) (Niu *et al.*, 2017), por lo que se utilizó como referente para el análisis filogenético de las subunidades accesorias.

5 Evidencia experimental.

5.1 Las ATP sintasas mitocondriales como moduladores de la formación de las crestas mitocondriales

5.1.1 Modelo de Allen de la cresta mitocondrial y la Electroforesis nativa (BN-PAGE) como primeros antecedentes.

Un estudio de la cresta mitocondrial de *P. multimicronucleatum* a través de congelamiento, criofractura, revelado en platino y visualización mediante microscopía electrónica, mostró la presencia de protuberancias en dobles filas localizados a lo largo de la cresta mitocondrial. Por trabajos previos se determinó que correspondían a la porción F₁ de la ATP sintasa, lo que llevó a proponer a Allen y col. (1989) que eran arreglos en doble fila de la ATP sintasa que se presentaban en el borde externo de las crestas distribuyéndose en forma helicoidal a lo largo de la cresta mitocondrial en forma helicoidal (Allen *et al.*, 1989).

Otros indicios sobre la estructura oligomérica de la F₁F₀ ATP sintasa en eucariotes fueron obtenidos gracias al uso de un detergente suave (digitonina) que permitió estandarizar técnicas para solubilizar y aislar complejos mitocondriales nativos asociados en forma de supercomplejos (Schägger & von Jagow, 1991). Esto permitió identificar nuevas subunidades membranales de la enzima de las cuales anteriormente se desconocía su existencia.

5.1.2 Diferentes tipos de dímeros de la F₁F₀-ATP sintasa (V₂) han sido descritos en distintos linajes.

5.1.2.1 Evidencias del V₂ tipo I

El V₂ fue identificado en otros organismos como en bovino (en corazón) (Schagger & Pfeiffer, 2000), así como en *A. thaliana* a concentraciones bajas de detergente (Eubel *et al.*, 2003) y en *Chlorococcum ellipsoideum*, aunque sin la posibilidad de hacer análisis adicionales en estos últimos dos (Lapaille *et al.*, 2010). En levaduras se identificó que el motivo GXXXG de las subunidades g es esencial para la dimerización (Bustos & Velours, 2005) y de igual forma se demostró necesaria la presencia del mismo motivo en la subunidad e (Arselin *et al.*, 2003).

El V₂ hallado por Allen *et al.*, (1989) en mitocondrias de *P. multimicronucleatum* también se reportó que está presente en corazón de bovino (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005), y en *S. cerevisiae* (Couoh-Cardel *et al.*, 2010). Se propuso que algunas de las subunidades supernumerarias estaban involucradas en la dimerización entre ellas la subunidad e, g, e IF1.

También se encontró que los dímeros se encontraban presentes en la región que tenía mayor curvatura de las crestas mitocondriales. Se presentaron dímeros y oligómeros con actividad al reconstituir con IF1 mitocondrial. Las evidencias genómicas y proteómicas demostraron una relación entre las subunidades e y g y la dimerización (Arselin *et al.*, 2003; Giraud *et al.*, 2002; Patrick *et al.*, 2002). Así mismo, se sugirió la actividad enzimática de los oligómeros y al realizar una simulación de campo electrónico se observó un incremento de 3.5 veces la densidad de carga, por lo que propuso que la oligomerización de la enzima provocaría una curvatura de las crestas mitocondrias favoreciendo así un efecto de trampa de protones (Strauss *et al.*, 2008).

Posteriormente se reportó la unión de las subunidades e y g para el ensamble de intermediarios de mayor peso molecular y se sugirió su participación como intermediarios hacia el ensamble del V_2 en *S. cerevisiae* (Wagner *et al.*, 2010).

5.1.2.2 Elucidación de composición de la F_1F_0 ATP sintasa en otros organismos eucariotes.

Niu y sus colaboradores realizaron un análisis de presencia/ausencia de subunidades de la ATP sintasa de tipo F. Para ello, utilizaron secuencias de ATP sintasa identificadas en humanos. Sobrepusieron sus resultados a un árbol filogenético que concatenaba secuencias de ADNr 16S. El muestreo del estudio incluye 759 especies, solamente 63 eran eucariotas. A pesar de esto, los resultados obtenidos nos permitieron identificar la conservación de algunas de las subunidades de la ATP sintasa (véase **Figura 9**). Es importante señalar que este no fue el primer estudio bioinformático relacionado a las subunidades de nuestro interés, como se mencionará más adelante.

En mamíferos, específicamente usando la línea celular HAP1, se encontró por medio de un análisis de Western Blot, la pérdida del V_2 y otros oligómeros al remover la subunidad g, e, f, 6.8pl y DAPIT. Este efecto de la subunidad 6.8pl y DAPIT, junto con alineamientos y la localización topológica similar, condujeron a He y colaboradores (He *et al.*, 2018) a proponer que dichas subunidades corresponden a ortólogos funcionales de las subunidades j y k de levaduras respectivamente.

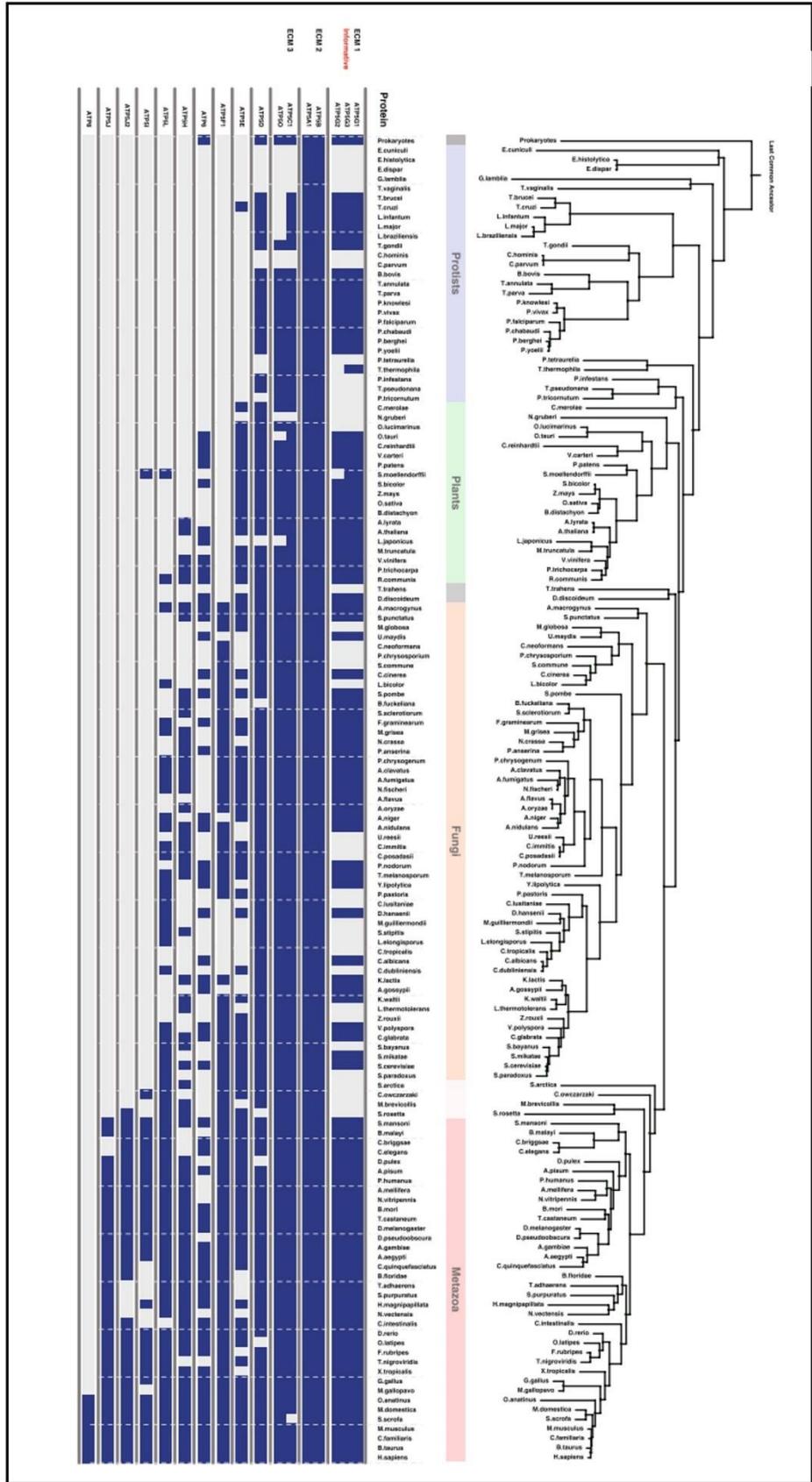


Figura 9. Conservación de las subunidades de la F_1F_0 ATP sintasa dentro de 759 especies (63 especies eucariotes). Azul presencia. Gris/Ausencia. Árbol filogenético obtenido realizando la concatenación de secuencias de ADNr 16S en cada clase o phylum. (Niu y col 2017)

En 2017, a través de criomicroscopía electrónica fue obtenida la estructura del V_2 a una resolución de 3.6 Å. Esta estructura incluyó la porción F_0 lo cual ayudó a comprender las interacciones necesarias para la dimerización incluyendo la participación de las subunidades e, g, b y k. Además de encontrar un punto de interacción dado por la subunidad i/j y a. Sin embargo, la subunidad k se encontraba incompleta, y a partir de la densidad se construyó un modelo de polialanina de la subunidad e y g (Guo *et al.*, 2017).

Gu y colaboradores (Gu *et al.*, 2019) también pudieron obtener un modelo del tetramero de la ATP sintasa de tipo F (V_4) en *Sus scrofa* (Gu *et al.*, 2019), en donde también se elaboraron modelos de polialanina en las subunidades d, e, g y 6.8; sin embargo, dicho modelo ha sido cuestionado por Spikes *et al* (2020) y Pinke y cols (Pinke *et al.*, 2020) quienes señalan que posee algunas malinterpretaciones; por ejemplo, confundir la subunidad j con la k, y la k con una subunidad hipotética. Además de construir un modelo de polialanina en el centro del anillo c, espacio que probablemente corresponda a alguna cadena lipídica.

Otros dos modelos han sido obtenidos por crio-microscopia electrónica. El modelo del V_2 y V_4 de Ovino (Pinke *et al.*, 2020) y uno del V_2 de bovino (Spikes *et al.*, 2020). En comparación con los mencionados anteriormente, en estos modelos si se determinaron todas las cadenas polipeptídicas.

De acuerdo con el modelo de Pinke *et al* (2020) las subunidades de la porción F_0 se organizan en dos grupos principales: 1) El grupo traslocador de protones que incluye a la subunidad a y su cercanía con las subunidades DAPIT, 6.8pL y ATP8 en forma paralela. 2) El segundo grupo de subunidades corresponde a las subunidades e, f y g con una interacción más cercana a la subunidad b en una hélice triple compactada. Esta triple hélice está conformada por la segunda hélice de la subunidad b (H2b), la tercera hélice de la subunidad g (H3g) y la subunidad e. Las interacciones entre la subunidad e y g se da a través del motivo GXXXG (zipper de glicina ó cremallera de glicina) de ambas y aparentemente un puente salino R15e-E82g. Mientras que la interacción entre H2b y H3g es a través de los puentes salinos E91g-K48b y E72g-K28b (Ver **Figura 10**). Por su parte H2b y H3b forman un giro en U ya que H3b interactúa con H5-H6a. Al compararla con modelos anteriores, Pinke y colaboradores observaron que la triple hélice es una de las partes más conservadas. En la extracción original no encontraron uniformidad en los multímeros en bovino. Por ello,

sugirieron una formación artificial de multímeros a causa de la extracción del detergente y que parece ser corregida con la presencia de Mg^{+2} y la subunidad IF1 para estabilizar los V_4 . Por último, apuntan la presencia de múltiples puntos cercanos que quizá corresponderían a puntos de contacto dentro de los V_2 que conforman al V_4 siendo la información consistente con la participación de las subunidades e, f, g y 6.8pl en la formación del V_2 y que la ausencia de DAPIT provoque la pérdida de oligómeros (He *et al.*, 2018). Por su parte el V_2 de Spikes y colaboradores (Spikes *et al.*, 2020) muestra la misma triple hélice formando una cuña la cual posee un ángulo de 45° con respecto a H3b que refuerza la curvatura. Además, es sellado y estabilizado un vacío proteico mediante 3 cardiolipinas y dos fosfolípidos en cada cuña (Ver **Figura 10**) (Spikes *et al.*, 2020).

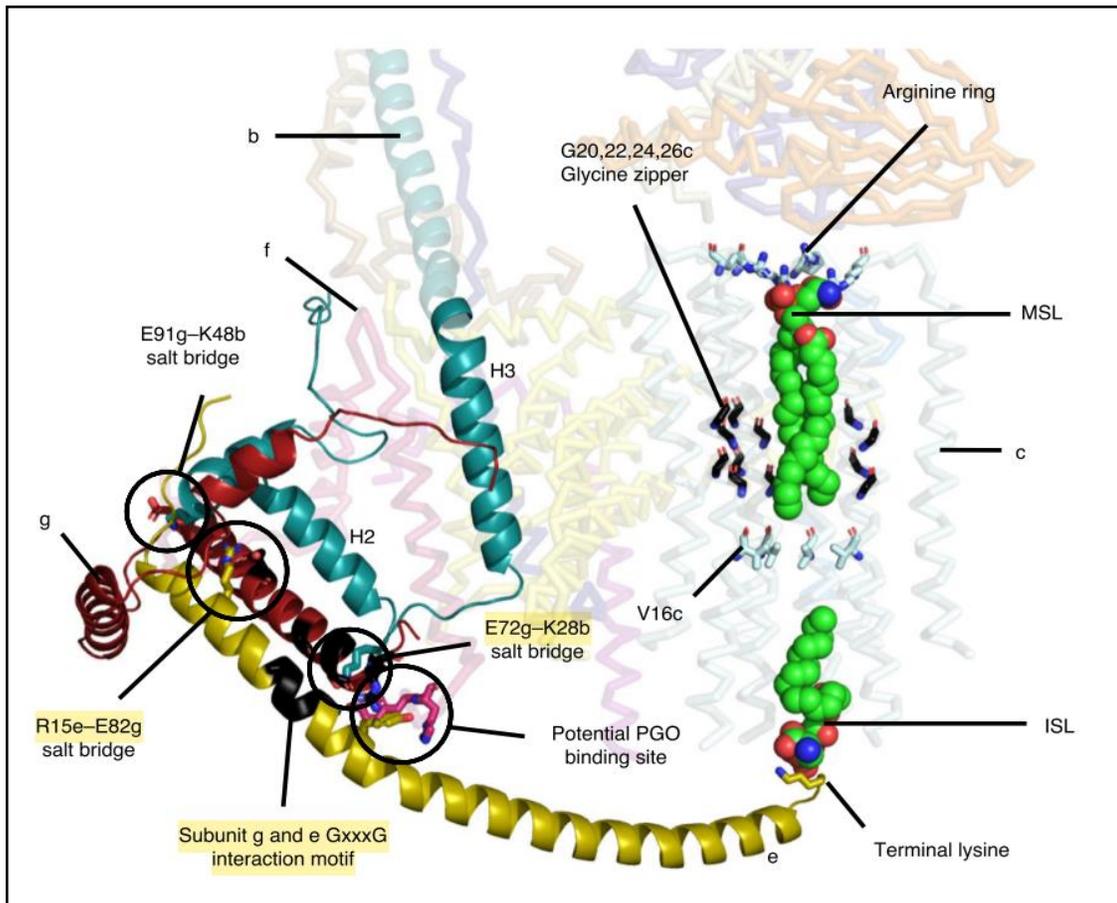


Figura 10. Visualización de la triple hélice en forma de cuña del dímero tipo I entre las subunidades e, g y b. Para la interacción participan algunas de las posiciones más conservadas que se han relacionado a la estabilidad del dímero. Tomada de Pinke *et al* (2020).

Adicionalmente, Spikes (Spikes *et al.*, 2021) mostró que el V_2 de bovino posee movimientos tanto dependientes de la catálisis como independientes de la catálisis. De acuerdo con sus resultados, el ángulo de curvatura es modificado entre 76° - 95° debido a la presencia de múltiples puntos de contacto en la interfaz de contacto dada por la subunidad i/j (6.8pl).

Actualmente, se conoce la estructura del V_2 presente en *S. cerevisiae* y en distintos mamíferos, lo que nos permite comparar la disposición de las subunidades que conforman la interfaz de contacto entre los monómeros de la ATP sintasa, en dos organismos que pertenecen a reinos diferentes, y que, sin embargo, a pesar de presentar una alta divergencia a nivel de secuencia, la topología general y disposición de las subunidades puede observarse altamente conservada (Ver **Figura 11**).

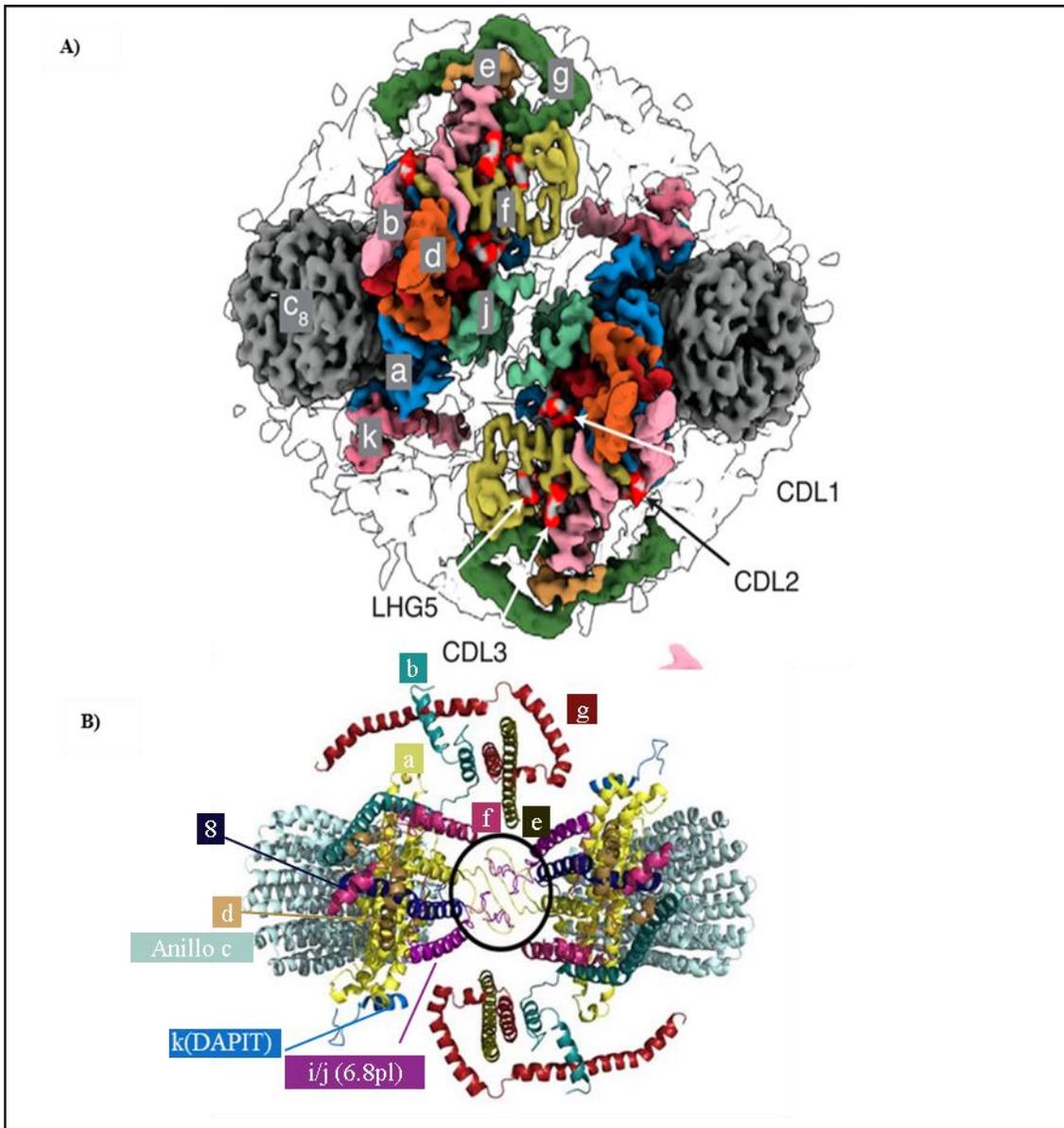


Figura 11. Visualización del modelo del V₂ obtenido por crio-EM de **A)** bovino (Visto desde el lado N) en comparación con el V₂ de **B)** *S. cerevisiae* y su interfaz entre subunidad ij y subunidad a. Tomada de Spikes et al (2020) y Guo et al (2017) respectivamente (Subunidades de la porción F₁ eliminadas para facilitar visualización).

La distribución filética de las subunidades de la ATP sintasa mostrada por Lapaille (Lapaille *et al.*, 2010) involucra la presencia de 8 subunidades presentes en *E. coli* (α , β , γ , ϵ^b (homóloga a la δ mitocondrial), a, b, c y δ^b (homóloga a OSCP mitocondrial). Con el surgimiento de los eucariotes las subunidades ϵ^m , d, f, g, IF1 y A6L fueron adquiridas.

Además de haber una adquisición de la subunidad e y h en ophistokonta. Adicionalmente de una adquisición linaje-específica de la subunidad i, k STF1 y STF2 en hongos y la subunidad w en mamíferos también conocida como Factor B. (**Figura 12**).

Recientemente, se estudió la composición de la de la ATP sintasa mitocondrial de *A thaliana*. Se analizó por espectrometría de masas la composición del monómero de la enzima aislada por BN-PAGE y se propusieron homólogos proteínas que presentaron similitudes a la subunidad i/j, e y la subunidad ATP Fad (homóloga a ASA4 de algas) como una subunidad análoga de la subunidad h. De ser correcto, lo anterior podría sugerir que en plantas hay una mayor similitud en la composición de la enzima con su contraparte en ophistokontas. (Röhricht *et al.*, 2021).

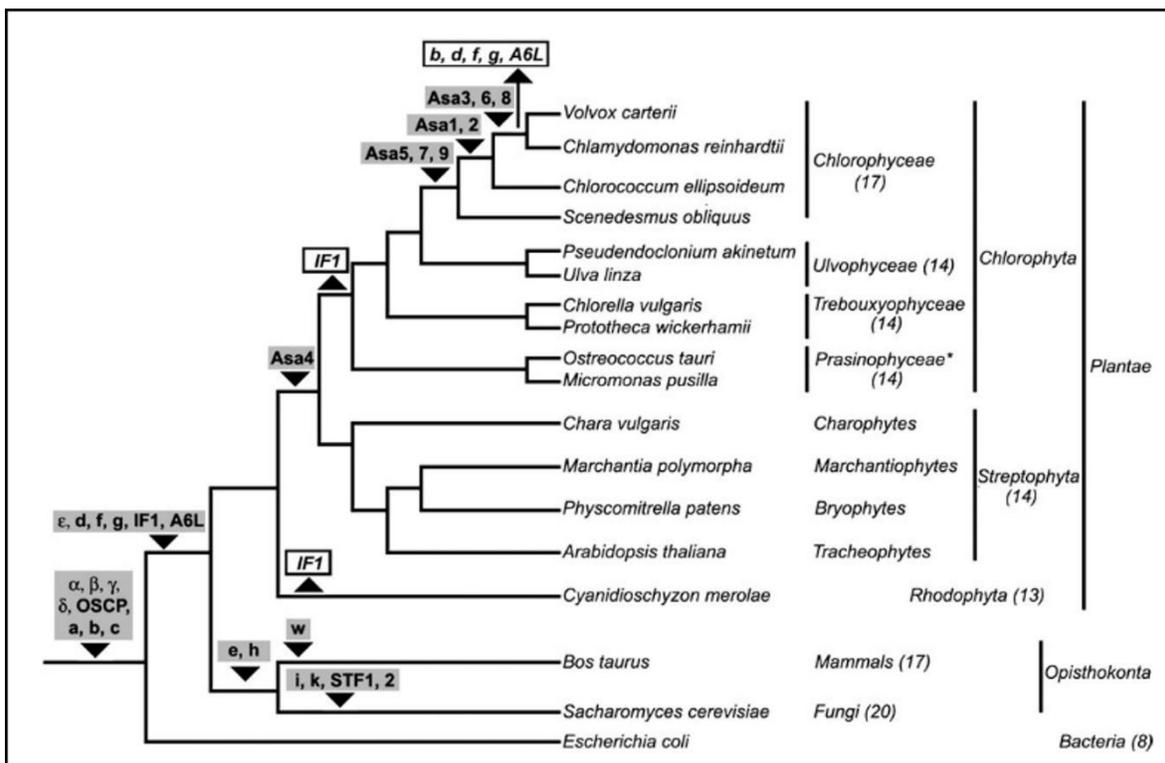


Figura 12. Presencia de genes de subunidades involucradas en la formación del tallo periférico y la dimerización en eucariotes. A partir de la búsqueda por blast se realizó una representación por parsimonia no ponderada. Las cajas negras muestran ganancia de genes y la caja blanca indica pérdida de genes. Obtenida de Lapaille *et al* (2010).

5.1.2.3 Evidencias del V_2 tipo II

La composición atípica hallada en *C reinhardtii*, llevo a Vázquez-Acevedo y colaboradores (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006) a investigar la composición de la ATP sintasa en *Polytomella* sp. Y otras 6 algas. Así hallaron la presencia de las subunidades α , β , γ , δ , ϵ , OSCP, a y c. Además, hallaron ASA1-ASA9 en chlamydomonas. Al analizar estas nuevas subunidades, encontraron que los genes que codifican para estas subunidades se encuentran en el genoma nuclear.

Para entender mejor la composición del V_2 dentro de las algas verdes Lapaille y colaboradores (Marie Lapaille *et al.*, 2010) utilizaron la disponibilidad de datos genómicos para hacer búsquedas por BLAST de las subunidades de la F_1F_0 ATP sintasa. Así, encontraron que las subunidades ASA estaban presentes exclusivamente en chlamydomonales. Por otro lado, streptophytas, rhodophytas y chlorophytas al igual que animales y hongos, tienen la composición más similar a la canónica con excepción de la presencia de la subunidad ASA4. Por parsimonia de Dollo¹ mostraron la pérdida y ganancia de genes y sugirieron que la pérdida de los componentes canónicos fue acompañada del reclutamiento de nuevos polipéptidos (Ver **Figura 12**) (Lapaille *et al.*, 2010).

Ya en 2019, (Murphy *et al.*, 2019), mediante crio-microscopía electrónica obtuvieron la estructura del V_2 de *Polytomella* sp a una resolución de 2.7 a 2.8 Å, gracias a lo cual identifican que el punto de interacción entre monómeros está determinado por el extremo C terminal de la subunidad ASA10, una subunidad ASA que no había sido previamente identificada.

5.1.2.4 V_2 en forma de U presente en el V_2 tipo III encontrado en *Tetrahymena thermophila* y en *Paramecium tetraurelia*.

En *T. thermophila* fue descrito hace una década la existencia del dímero de la ATP sintasa tipo F (Balabaskaran Nina *et al.*, 2010), el cual corresponde a un tipo de V_2 diferente a los previamente conocidos. La ausencia de varias de las subunidades canónicas condujo a Balabaskaran y colaboradores a identificar mediante BN-PAGE un nuevo V_2 del cual obtuvieron imágenes mediante microscopía electrónica. En el estudio, la identificaron por MS solo 6 subunidades canónicas (α , β , γ , ϵ , c, OSCP) y dos hipotéticas (d y δ) (Balabaskaran

¹ Método de parsimonia que asume que un carácter perdido en evolución no puede regresar (Rogozin *et al.*, 2006).

Nina *et al.*, 2010). Además, identificaron 13 subunidades más que parecen encontrarse únicamente en los organismos ciliados (Ver **Tabla 2**). Posteriormente en *P. tetraurelia* se visualizó un arreglo en oligómeros en forma de hélices que sigue la misma dirección de la cresta. Esto último contrasta con los arreglos en línea recta encontrada en los otros organismos estudiados al momento. Otra diferencia es el ángulo formado por los V₂ teniendo una “forma en U” encontrándose cada monómero en paralelo en vez de la “forma en V” encontrada en los organismos anteriormente estudiados. Mientras que comparten una interfaz en la porción F_O que conecta los tallos periféricos (A. W. Mühleip *et al.*, 2016) (Ver **Figura 13**).

Un estudio más reciente, en *T. thermophila*, determinó mediante criomicroscopía electrónica la estructura completa de su V₂ a una resolución de 2.7 Å. El V₂ fue utilizado para el refinamiento del V₄ a 3.3 Å. El V₂ mostró distintas particularidades: i) Es el V₂ con la mayor región de interacción entre monómeros e incluye interacciones en la membrana, la matriz y el lumen; ii) El V₂ muestra una falsa simetría C₂ debida a la presencia de una sola copia de la subunidad ATPPT2. Esto favorece que algunos de los contactos entre monómeros sean heterotípicos. Además, la formación de la curvatura membranal es dada por la formación de ángulos de ~11° en conjunto con una torsión de 3° durante el ordenamiento en fila de cada V₂ para la oligomerización. Mientras que la interacción entre V₂ es dada por dos mecanismos: uno directo hecho por proteínas pertenecientes a la porción F_O de la enzima y otra mediada por lípidos (Flygaard *et al.*, 2020).

5.1.2.5 V₂ tipo IV: *Euglena gracilis* y *T. brucei* comparten otras subunidades atípicas en su V₂

El estudio de un V₂ en *T. brucei* fue realizado mediante BN-PAGE y la digestión e identificación por MS llevó a identificar 14 subunidades atípicas, de las cuales dos están posiblemente involucradas en la dimerización dado que solo estaban presentes en el V₂ (Zíková *et al.*, 2009). Más tarde, se obtuvieron imágenes mediante microscopía electrónica del V₂ de *E. gracilis*. Mediante MS también encontraron que 7 de las 14 subunidades atípicas de *T. brucei* eran compartidas con el V₂ de *E. gracilis* incluyendo a las subunidades ATPTB1, ATPTB3, ATPTB4, ATPTB6 y ATPTB12 (ver **Tabla 2**) (Yadav *et al.*, 2017). Recientemente también fue obtenida por criotomografía electrónica el arreglo del V₂ y la cresta de *T. brucei* y *E. gracilis* a una resolución de 32.5 y 27.5 Å respectivamente.

Encontraron una interacción más cercana entre cada V_1 en la porción F_0 . Se encontró que la curvatura se da en el ensamble de la fila de V_2 (A. W. Mühleip *et al.*, 2017).

5.1.2.6 Hexámeros de la ATP sintasa presente en *Toxoplasma gondii*

Recientemente, Muhleip y colaboradores (A. Mühleip *et al.*, 2021), obtuvieron hexámeros (V_6) cíclicos de la F_1F_0 ATP sintasa de *T. gondii*. La composición de la F_1F_0 ATP sintasa incluyó las subunidades α , β , γ , δ , ϵ , OSCP, IF1, a, b, c, d, f, k, 8, i/j y 17 subunidades no canónicas denominadas ATPTG1-17. Algunas de las subunidades no canónicas fueron encontradas en apicomplexa, Chromeridos y perkinsozoa. Otra característica es que la interfaz entre los monómeros que conformaban el V_6 comprende a 11 subunidades con interacción homotípica en cada monómero, ocupando 7000 \AA^2 de área de superficie de contacto.

Por último, también se relacionó los V_6 de la ATP sintasa con la morfología de la cresta mitocondrial ya que al eliminar a la subunidad ATPTG11 se alteró la organización de los V_6 , lo cual a su vez alteró la morfología de la cresta mitocondrial de *Toxoplasma gondii*.

Como hemos visto, la evidencia actual, apunta a distintos tipos de V_2 en eucariotes descritos hasta el momento, según lo recopilado y propuesto por Külbrandt, con base en los ángulos y la morfología de la cresta y las subunidades involucradas (Ver **Figura 13**) (Kühlbrandt, 2019). La **Tabla 2** resume la composición y estequiometría que forman la ATP sintasa dimérica en diversos eucariotes.

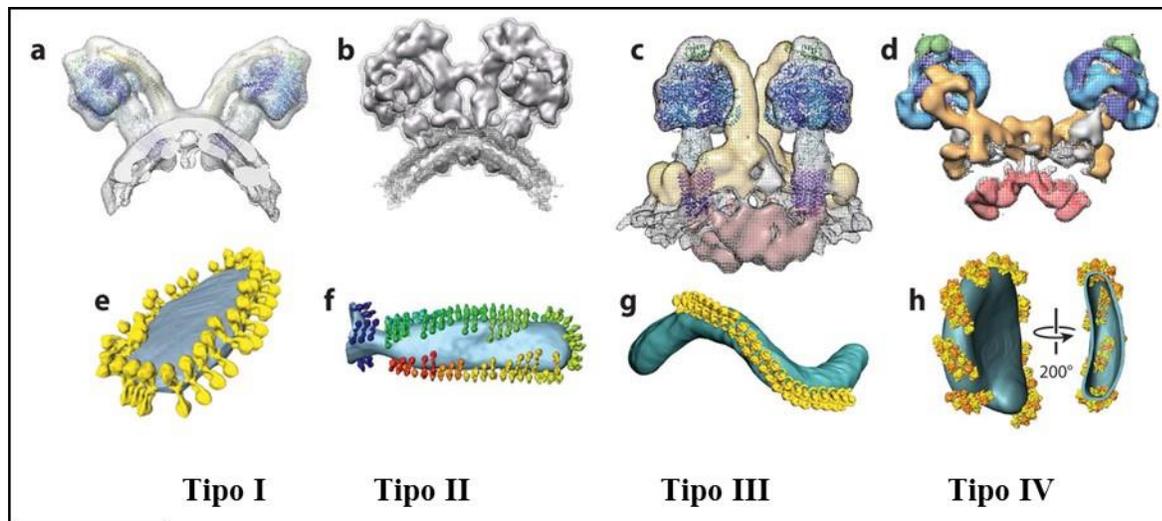


Figura 13. Crio ET de dimeros de la ATP sintasa y promedio de subtomogramas de la disposición 3D en las crestas respectivamente de: *S cerevisiae* (a y e), *Polytomella* sp (b y f), *P tetraurelia* (c y g) y *E gracilis* (d y h). Figura obtenida de Kühlbrandt y colaboradores (2019).

Tabla 2. Composición y estequiometría de las subunidades que conforman el V₂ de los organismos modelo más estudiados hasta el momento en eucariotes. El nombre del gen o locus está indicado entre paréntesis.

Tipo de V ₂ en eucariotes	Tipo I		Tipo I?	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
Organismo modelo más estudiado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ovino</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Polytomella</i> sp	<i>Tetrahymena thermophila</i>	<i>Euglena gracilis</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Subunidades de F ₁							
α	6 (ATP1)	6 (ATP5A1)	*(AtMg01190)	6 (CAI34836)	6 (TTHERM_00571860)	6 (GDJR01036292)	6(TGGT1_204400)
β	6 (ATP2)	6 (ATP5B)	*(At5g08670, At5g08680 y At5g08690)	6 (CAI34837)	6 (TTHERM_00585260)	6 (GDJR01048402)	6 (TGGT1_261950)
Subunidades del Tallo central							
δ	2 (ATP16)	2 (ATP5D)	*(At5g47030)	2 (ATP16)	2 (TTHERM_01094890)	2 (GDJR01108837)	2 (TGGT1_226000)
γ	2 (ATP3)	2 (ATP5C1)	*(At2g33040)	2 (AJ619759)	2 (TTHERM_00118610)	2 (GEFR01019235)	2 (TGGT1_231910)
ε	2 (ATP15)	2 (ATP5E)	*(At1g51650)	2 (ATP15)	2 (TTHERM_00682930)	2 (GDJR01100113)	2 (TGGT1_314820)
Subunidades del Tallo periférico							
b	2 (ATP4)	2 (ATP5F1)	*(AtMg00640)		2 (TTHERM_00127260)	2 (GDJR01108903)	2 (TGGT1_231410)
h (F6)	2 (ATP14)	2 (ATP5J)			2		
OSCP	2 (ATP5)	(ATP5O)	*(At5g13450)	2 (6RD4_P)	2 (TTHERM_00684790)	2 (GDJR01100117)	2 (TGGT1_284540)
d	2 (ATP7)	(ATP5H)	*(At3g52300)		2 (TTHERM_01188360)	(GDJR01017994);	2 (TGME49_268830)

Tipo de V ₂ en eucariotes	Tipo I		Tipo I?	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
Organismo modelo más estudiado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ovino</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Polytomella</i> sp	<i>Tetrahymena thermophila</i>	<i>Euglena gracilis</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
IF ₁	*	(ATPIF ₁)			2 (TTHERM_00145490)	2 (GEFR01049155)	2 (TGGT1_215350)
8 (A6L)	2 (ATP8)	2 (MT-ATP8)	*(AtMg00480)		2 (ymf56)	2 (KT732265)	2 (TGGT1_208440)
Subunidades del Motor (Fo)							
a	2 (ATP6)	2 (MT-ATP6)	(ATP6)	2(6RD4_M)	2 (ymf66)	2	2 (TGGT1_310360)
c	20 (ATP9)	16 (ATP5G1, ATP5G2, ATP5G3)	(ATP9)	20 (6RD4_A)	*(atp9)	20 (GEFR01045692)	20 (TGGT1_249720)
f	2 (ATP17)	2 (ATP5J2)	*(At4g30010)		2 (TTHERM_00571670)	2 (EC611052)	2 (TGGT1_215610)
Subunidades linaje-específicas							
e	2 (ATP21)	2 (ATP5I)	***((At3g01130 y At5g15320))				
g	2 (ATP20)	2 (ATP5L)	*(At4g29480, At2g19680 y At4g26210)				
i/j	2 (ATP18)	2	***((At3g46430 y At5g59613))		2 (TTHERM_00529760)	2 (GDJR01005239)	2(TGGT1_290030)
k	2 (ATP19)	2			2 (TTHERM_00823660)	2 (GEFR01055688)	2 (TGGT1_260180)
56noma. Fact. B		(DMAC2 L o ATP5S)					

Tipo de V ₂ en eucariotes	Tipo I		Tipo I?	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
Organismo modelo más estudiado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ovino</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Polytomella</i> sp	<i>Tetrahymena thermophila</i>	<i>Euglena gracilis</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
(Subunidades)							
Stf1	STF1						
Stf2	STF2						
Stl2	TMA10						
ASA1				2 (6RD4_1)			
ASA2				2 (6RD4_2)			
ASA3				2(6RD4_3)			
ASA4			Fad** (At2g21870)*	2 (6RD4_4)			
ASA5				2 (6RD4_5)			
ASA6				2 (6RD4_6)			
ASA7				2 (6RD4_7)			
ASA8				2 (6RD4_8)			
ASA9				2 (6RD4_9)			
ASA10				2 (6RD4_0)			
ATPT T1					2 (TTHERM_00137990)		
ATPT T2					1 (TTHERM_00145440)		

Tipo de V ₂ en eucariotes	Tipo I		Tipo I?	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
Organismo modelo más estudiado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ovino</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Polytomella</i> sp	<i>Tetrahymena thermophila</i>	<i>Euglena gracilis</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
ATPT T3					2 (TTHERM_00136220)		
ATPT T4					2 (TTHERM_00486310)		
ATPT T5					2 (TTHERM_01528510)		
ATPT T6					2 (TTHERM_00649060)		
ATPT T7					2 (TTHERM_00316290)		
ATPT T8					2 (TTHERM_00289380)		
ATPT T9					2 (TTHERM_01001220)		
ATPT T10					2 (TTHERM_00825290)		
ATPT T11					2 (TTHERM_00927010)		
ATPT T12					2 (TTHERM_00068120)		
ATPT T13					2 (TTHERM_00444800)		
ATPT B1						2 (GEFR01007572)	
ATPT B3						2 (GEFR01014423)	

Tipo de V ₂ en eucariotes	Tipo I		Tipo I?	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
Organismo modelo más estudiado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ovino</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Polytomella</i> sp	<i>Tetrahymena thermophila</i>	<i>Euglena gracilis</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
ATPT B4						2 (GDJR01108860)	
ATPT B6						2 (GEFR01028782)	
ATPT B12						2 (GDJR01005257)	
P18						6 (GDJR01100103)	
Atpeg1						2 (GDJR01005511)	
Atpeg2						2 (GEFR01033662)	
Atpeg3						2 (GDJR01012366)	
Atpeg4						2 (GEFR01049309)	
Atpeg5						2 (GEFR01071033)	
Atpeg6						2 (GDJR01049874)	
Atpeg7						2 (GDJR01108818)	
Atpeg8						2 (GDJR01108900)	
ATPT G1							2 (TGGT1_246540)

Tipo de V ₂ en eucariotes	Tipo I		Tipo I?	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
Organismo modelo más estudiado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ovino</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Polytomella</i> sp	<i>Tetrahymena thermophila</i>	<i>Euglena gracilis</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
ATPT G2							2 (TGGT1_282180)
ATPT G3							2 (TGGT1_218940)
ATPT G4							2 (TGGT1_201800)
ATPT G5							2 (TGGT1_270360)
ATPT G6							2 (TGGT1_223040)
ATPT G7							2 (TGGT1_290710)
ATPT G8							2 (TGGT1_258060)
ATPT G9							2 (TGGT1_285510)
ATPT G10							2 (TGGT1_214930)
ATPT G11							2 (TGGT1_263990)
ATPT G12							2 (TGGT1_245450)
ATPT G13							2 (TGGT1_225730)
ATPT G14							2 (TGGT1_263080)

Tipo de V ₂ en eucariotes	Tipo I		Tipo I?	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
Organismo modelo más estudiado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ovino</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Polytomella</i> sp	<i>Tetrahymena thermophila</i>	<i>Euglena gracilis</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
ATPT G15							2 (TGGT1_247410)
ATPT G16							2 (TGGT1_211060)
ATPT G17							2 (TGGT1_310180)
Fuente Entrada PDB	Guo <i>et al</i> 2017 6B8H	Spikes <i>et al</i> 2020 7AJB	Rohricht <i>et al</i> 2021	Kühlbrandt <i>et al</i> 2019, (Murphy <i>et al.</i> , 2019) 6RD4	Flygaard <i>et al</i> 2020 6YNX	Muhleip <i>et al</i> 2019 6TDU	Muhleip <i>et al</i> 2021 6TMK

* Estequiometría no identificada

** Probable homólogo de ASA4

*** Homología detectada sólo a través de HMMER

En amarillo subunidades involucradas en la dimerización de la enzima.

6 Resultados

6.1 Subunidad γ

La subunidad γ forma parte del tallo central de la ATP sintasa. Se decidió estudiar esta proteína porque corresponde a una subunidad esencial que está presente en todas las especies que poseen una F₁F₀-ATP sintasa (Niu *et al.*, 2017), y después de un análisis preliminar de diferentes subunidades esenciales, observamos que la subunidad γ corresponde a una proteína que en una gran mayoría de las especies es codificada por un gen de copia única (resultados no mostrados), lo cual permite utilizarla como un punto de referencia, ya que muy probablemente la historia evolutiva de esta proteína refleje la historia natural de los organismos eucariotas que heredaron la F₁F₀-ATP sintasa a partir del último ancestro común a todos los eucariotes.

La subunidad γ forma parte de la familia de proteínas PF00231 en la base de datos Pfam (<https://pfam.xfam.org/>). Se recuperaron del NCBI 5000 secuencias, así como 2622 secuencias de la base de datos Pfam, empleando un nivel de granularidad de 15% (RP15, que selecciona un proteoma representativo de cada conjunto (cluster) de proteomas que comparten al menos un 15% de secuencias (15% co-membership threshold) (Chen *et al.*, 2011). Puesto que se conoce la estructura tridimensional de la subunidad γ , se generó un alineamiento tridimensional de 14 estructuras mediante la herramienta VAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/VAST/vast.shtm>), el cual se utilizó como guía para alinear el resto de las secuencias. De esta forma, se obtuvo un alineamiento inicial conformado por un total de 7636 secuencias. Posteriormente, el alineamiento se revisó en forma manual y se eliminaron todas aquellas secuencias que estaban duplicadas o que correspondían a múltiples isoformas de un mismo gen (en este caso se conservó la isoforma que conservó mayor similitud con relación al resto de las especies). Por otra parte, las secuencias con un identificador obsoleto se reemplazaron por una más reciente, o se eliminó en caso de no estar conservada en la versión más reciente del GenBank del NCBI.

Después de la depuración manual, se eliminaron 1044 secuencias, por lo que el alineamiento final se construyó considerando un total de 6592 secuencias. El alineamiento se hizo utilizando CLUSTAL X para la obtención del árbol guía o dendrograma (Véase **Figura 14**).

Si bien, este no es aún un árbol filogenético, puede observarse que la distribución de las secuencias en las diferentes ramas corresponde a la distribución esperada de acuerdo a la historia natural de los diferentes grupos de seres vivos.

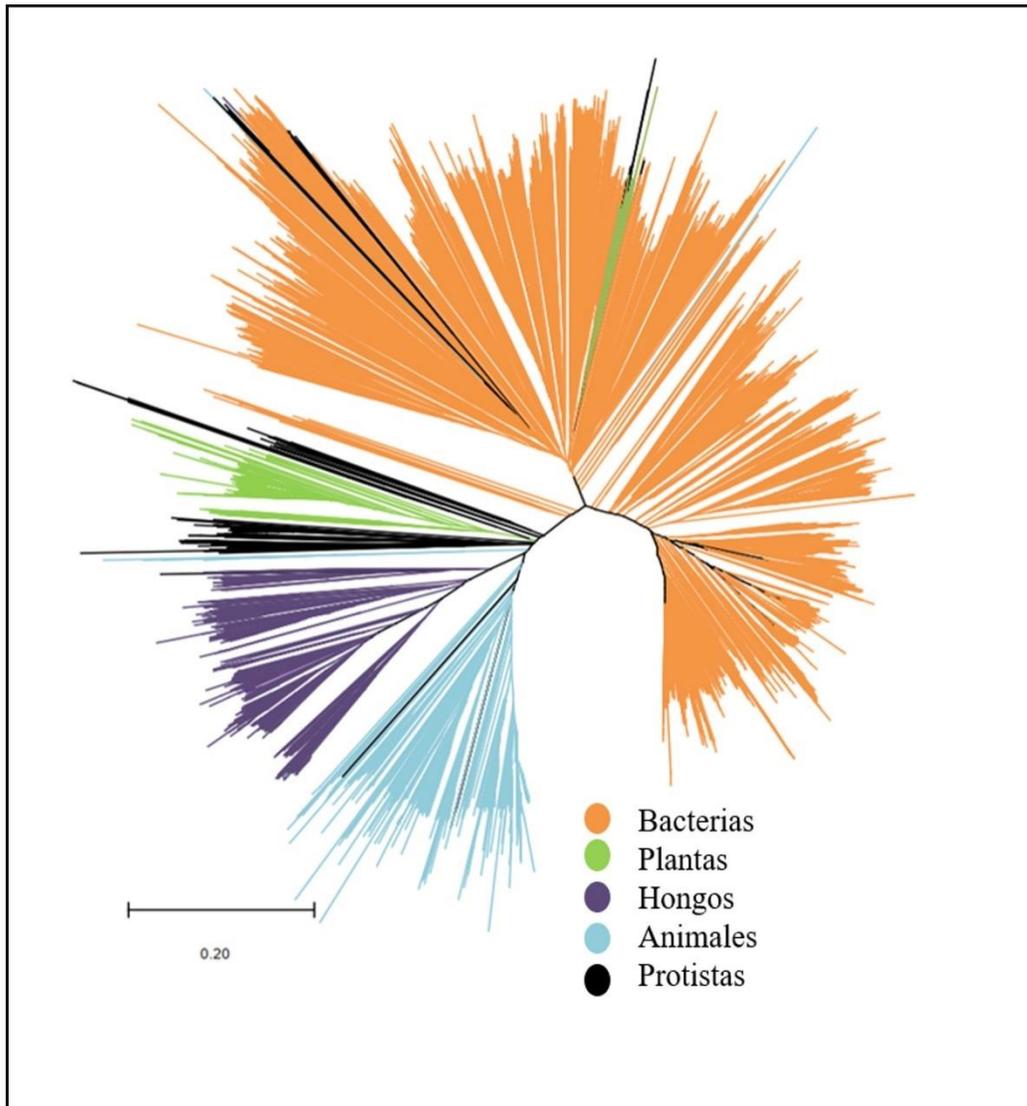


Figura 14. Árbol guía sin enraizar de 6592 secuencias homólogas de la subunidad γ .

6.2 Subunidad g

Como se ha indicado previamente, la subunidad g, ha sido identificada como una de las subunidades responsable de la formación de dímeros en *Saccharomyces cerevisiae* (Arnold *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2017; Wagner *et al.*, 2009). Esta proteína tiene un tamaño poco mayor a 100 aminoácidos. Posee características reminiscentes de un dominio BAR (del inglés Bin/amphiphysin/Rvs c), y se ha reportado que su función llega a ser de unión membranal, señalización y dimerización entre otras (Guo *et al.*, 2017).

En hongos y mamíferos la estructura secundaria de la subunidad g consta de 3 hélices conectadas por dos asas que presentan una alta divergencia. Una de las porciones más conservadas es un motivo GXXXG que ha sido asociado a la función estructural (Bustos & Velours, 2005). El motivo GXXXG permite la interacción en una triple hélice con la subunidad e y la H2b (Pinke *et al.*, 2020; Spikes *et al.*, 2020) lo cual estabiliza el V₂ y promueve la curvatura mitocondrial (Véase la sección **Evidencias experimentales**). La subunidad g pertenece a la familia PF04718 de la base de datos Pfam.

Se recuperó el total de secuencias identificadas en pfam (1160 secuencias). Mediante BlastP se obtuvieron 664 secuencias homólogas a la subunidad g en animales, 620 en hongos, 466 en plantas, y 17 en protistas (estos últimos definidos como aquellos eucariotes que no corresponden a ninguno de los reinos anteriores). De esta forma, el análisis se inició con un total de 2927 secuencias. Los criterios de depuración de secuencias fueron los mismos utilizados para la subunidad γ . Así, se eliminó un total de 968 secuencias, por lo que posterior a la depuración manual se conservó un conjunto total de 1959 secuencias. Cabe señalar que no se detectó la presencia de homólogos de la subunidad g ni en bacterias ni en arqueas. Con las secuencias se construyó un árbol filogenético por el método de máxima verosimilitud con 200 repeticiones de usando MEGA X (Ver **Figura 15**). (Le & Gascuel, 2008)

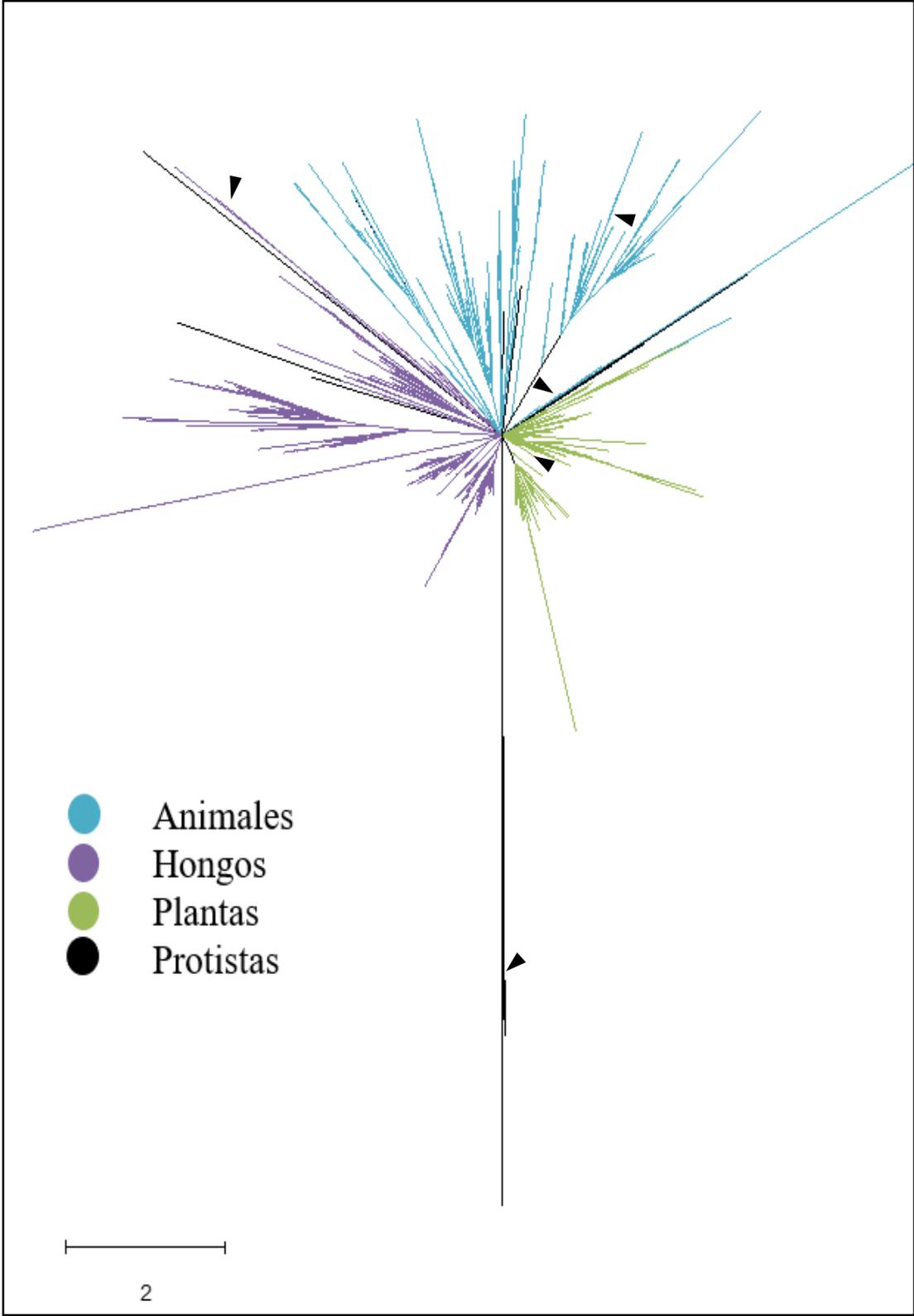
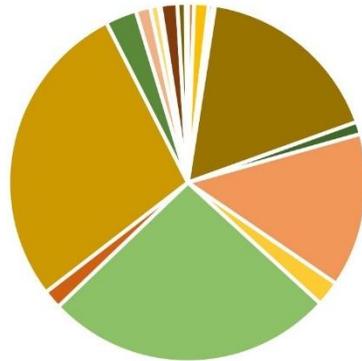


Figura 15. Análisis filogenético de la subunidad g de la ATP sintasa. El árbol fue construido empleando el método de máxima verosimilitud y el modelo de sustitución de Le & Gascuel (2008). El árbol no enraizado, con el más alto log de verosimilitud (-1116858.72) es mostrado. Una distribución gama discreta fue utilizada para modelar las diferencias entre las tasas de evolución entre sitios (5 categorías, +G = 1.3241). El análisis involucró 1959 secuencias y 585 posiciones en el alineamiento final. El árbol está dibujado a escala, y la barra de distancia indica el número de sustituciones por sitio. ▲ Cebadores.

Presencia de homólogos de la subunidad g en 533 de los 561 genomas analizados (Animales)



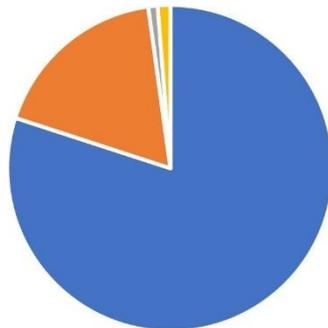
- Otros Animales
- Otros Cordados
- Cefalocordados
- Hemicordados
- Peces
- Anfibios
- Aves
- Lepidosauria
- Mamíferos
- Cnidarios
- Insectos
- Otros Artropodos
- Nematodos
- Echinodermos
- Anhelidos
- Moluscos
- Plathelminthes
- Porifera

Presencia de homólogos de la subunidad g en 11 de los 93 genomas analizados (Protistas)



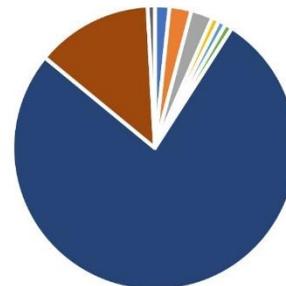
- Mycetozoa
- Apusozoa
- Choanoflagellida
- Capsaspora'
- Fonticula'
- Ichthyosporea

Presencia de homólogos de la subunidad g en 320 de los 333 genomas analizados (Hongos).



- Ascomycota
- Basidiomycota
- Chytridiomycota
- Mucoromycota

Presencia de homólogos de la subunidad g en 121 de los 124 genomas analizados (Plantas)



- Mamiellophyceae
- Prasinophytes
- Trebouxiophyceae
- Bryophyta
- Selaginellales
- Magnoliophyta
- Dicotiledóneas
- Liliopsida
- Nymphaeales

Figura 16. Presencia de homólogos de la subunidad g en 985 de los 1110 genomas analizados.

De manera paralela, se realizó la búsqueda de la subunidad g en 1110 especies de eucariotes cuyo genoma esta secuenciado y depositado en la base de datos de genomas de referencia del NCBI. De estos, 561 son animales, 332 son hongos, 124 son plantas y 93 son protistas. En los casos donde no se encontraron genes reportados, se realizó una búsqueda manual usando TBLASTn. Los resultados obtenidos en este caso permiten tener la distribución filética obteniendo homólogos a la subunidad g en 985 de los 1110 genomas analizados (Véase **Figura 16**). Una vez obtenida la distribución filética obtenida y corregida manualmente se usó la herramienta Timetree (<http://www.timetree.org/>) (Kumar *et al.*, 2022), una plataforma que compila datos publicados sobre tiempos de divergencia entre especies, así obtuvimos un dendrograma que considera la cantidad de genes diferentes que codifican para homólogos de esta subunidad en nuestras 1110 especies de estudio (Ver **Figura 17**). Los resultados también nos brindan con mayor certeza sobre la presencia/ausencia de la subunidad g en cada organismo.

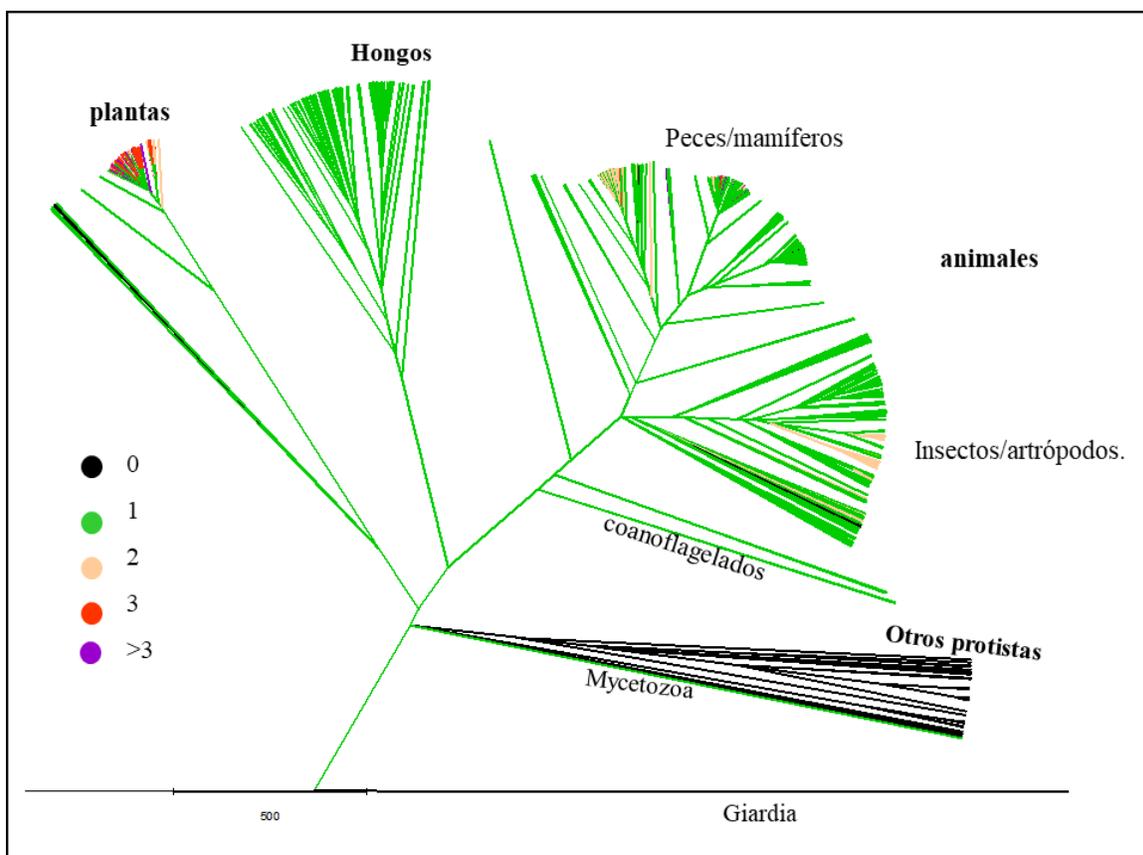


Figura 17. Dendrograma que considera la cantidad de homólogos de la subunidad g halladas a través de la búsqueda vía blast en 1110 genomas secuenciados.

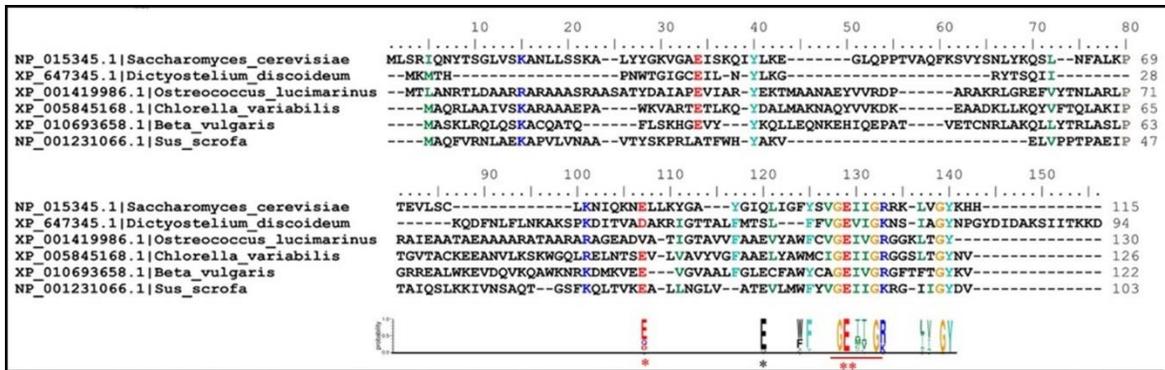


Figura 18. Arriba. Alineamiento por MAFFT de homólogos de la subunidad g utilizando organismos representativos de distintos grupos taxonómicos. **Abajo.** Logo generado con 1959 secuencias utilizadas en la construcción del árbol filogenético. Se muestran en el logo las posiciones más conservadas. Interacciones descritas por Pinke et al 2020 *E72g-K28b. *R15e-E82g y **E91g-K48b. Motivo GXXXG subrayado con color rojo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la gran mayoría de los genomas de animales, plantas y hongos poseen al menos una copia del gen que codifica para la subunidad g (Ver **Figura 17**). Es posible que algunas de las especies que carecen de este gen en nuestros resultados, se deba simplemente a que no se ha identificado/reportado aún el gen, o éste presente una alta divergencia a nivel de secuencia. Destaca también el hecho de que en diversas especies de plantas se encuentran numerosas copias de genes que codifican para la subunidad g, lo cual no es de extrañar debido a la poliploidía. *Brassica napus* (canola) por ejemplo, presenta 12 copias del gen. Un alto número de copias abre la posibilidad de que estos genes pudieran llegar a ser reclutados para desarrollar funciones adicionales.

En hongos, la gran mayoría de las especies presentan solo una copia del gen, aunque en los diez genomas de microsporidia secuenciados (refseq), se encuentra ausente en todos. Por lo que se refiere a protistas, en choanoflagellados y fonticula se encontraron genes que codifican para una proteína homóloga a la subunidad g. En amoebozoa, por su parte encontramos resultados contrastantes. En mycetozoa también encontramos presencia de la subunidad g. Sin embargo, tanto en discosea (género *Entamoeba*) así como en archamoebae (género *Acanthamoeba*) no fue posible identificar homólogos de la subunidad g. (Las ausencias en dichos grupos muy probablemente se expliquen por el hecho de que las ausencias coinciden con que dichos organismos carecen de mitocondrias y posean en su lugar

mitosomas (organelos que pertenecen a los denominados organelos relacionados a la mitocondria o MROs) al igual que en microsporidia (Aiman *et al.*, 2021)

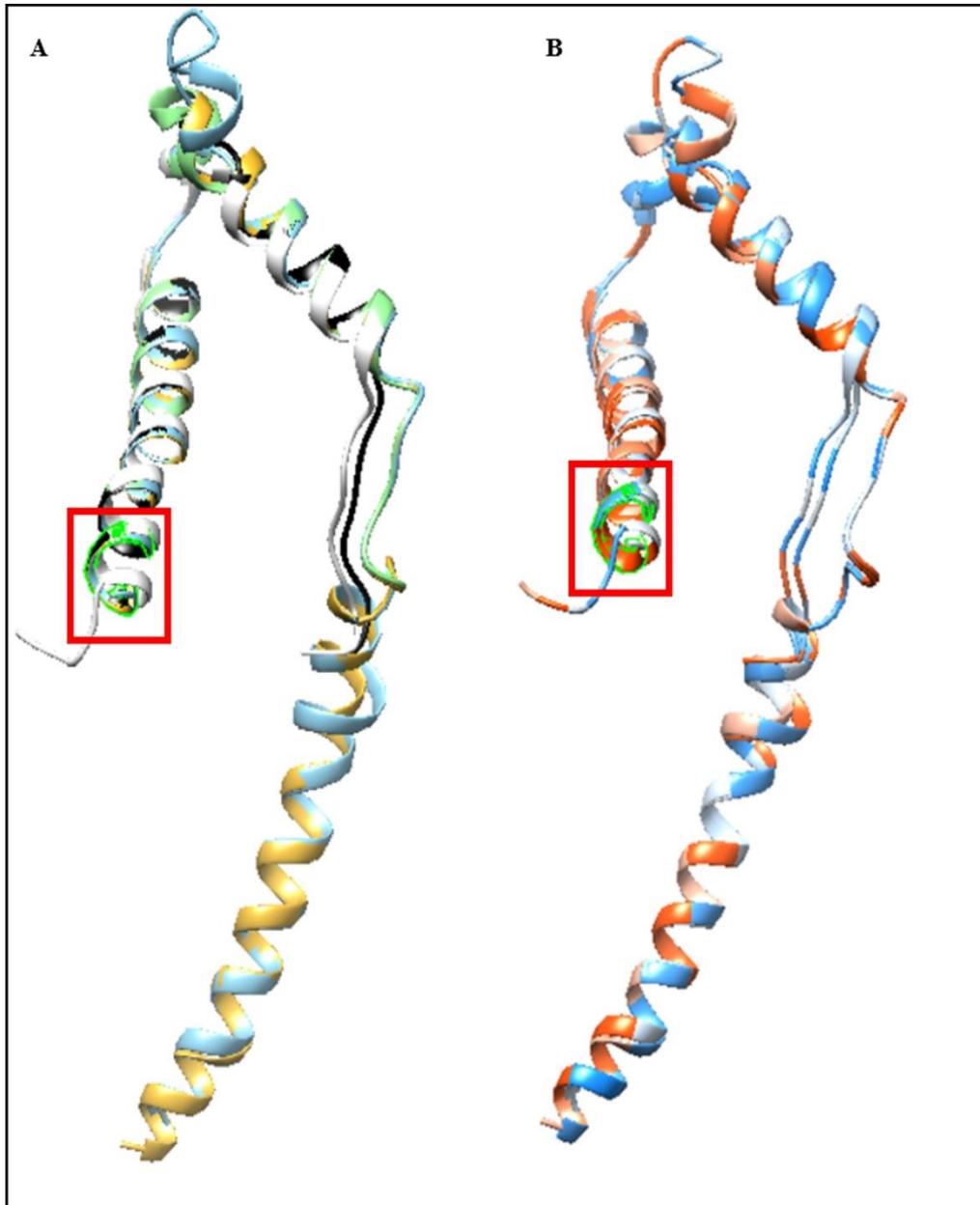


Figura 19. Alineamientos en Chimera de secuencias de subunidades g modeladas por homología (Swiss-model) utilizando organismos representativos de distintos grupos taxonómicos coloreados por cadenas (A) (Verde-*Chlorella variabilis*, Amarillo-*Sus scrofa*, Azul-*Saccharomyces cerevisiae* y negro *Dictyostellium discoideum*) y coloreadas por hidrofobicidad Kyte Doolittle (B). Motivo GXXXG en recuadro rojo.

Las secuencias usadas para la construcción del árbol filogenético (**Figura 15**) fueron utilizadas para la generación de logos (Ver **Figura 18**). Encontramos una amplia conservación del motivo GXXXG en los homólogos de la subunidad g pertenecientes a distintos taxa. Otras posiciones clave que se ha sugerido que participan en su interacción con la subunidad e y la subunidad b en los modelos de mamíferos también se encontraron altamente conservadas (Pinke *et al.*, 2020).

También las subunidades g mostradas en el alineamiento de la **Figura 18**, fueron modeladas por homología y alineadas en Chimera. Se observó un gran parecido en las propiedades estructurales y de hidrofobicidad de las cadenas, a pesar de poseer una gran divergencia a nivel de secuencia (Ver **Figura 19**).

Por último, analizamos los contextos genómicos de las secuencias homólogas a la subunidad g en animales (**Figura 20**), encontrando en líneas generales que el contexto genómico de una de las copias de la subunidad g es bastante parecido en *Latimeria chalumnae*, reptiles, aves y mamíferos. Mientras que la otra copia, en líneas generales, es menos conservada en su contexto genómico. Esto nos permite distinguir sin ambigüedades, cuál de los dos genes corresponde al original, y cuál es resultado de un evento de duplicación.

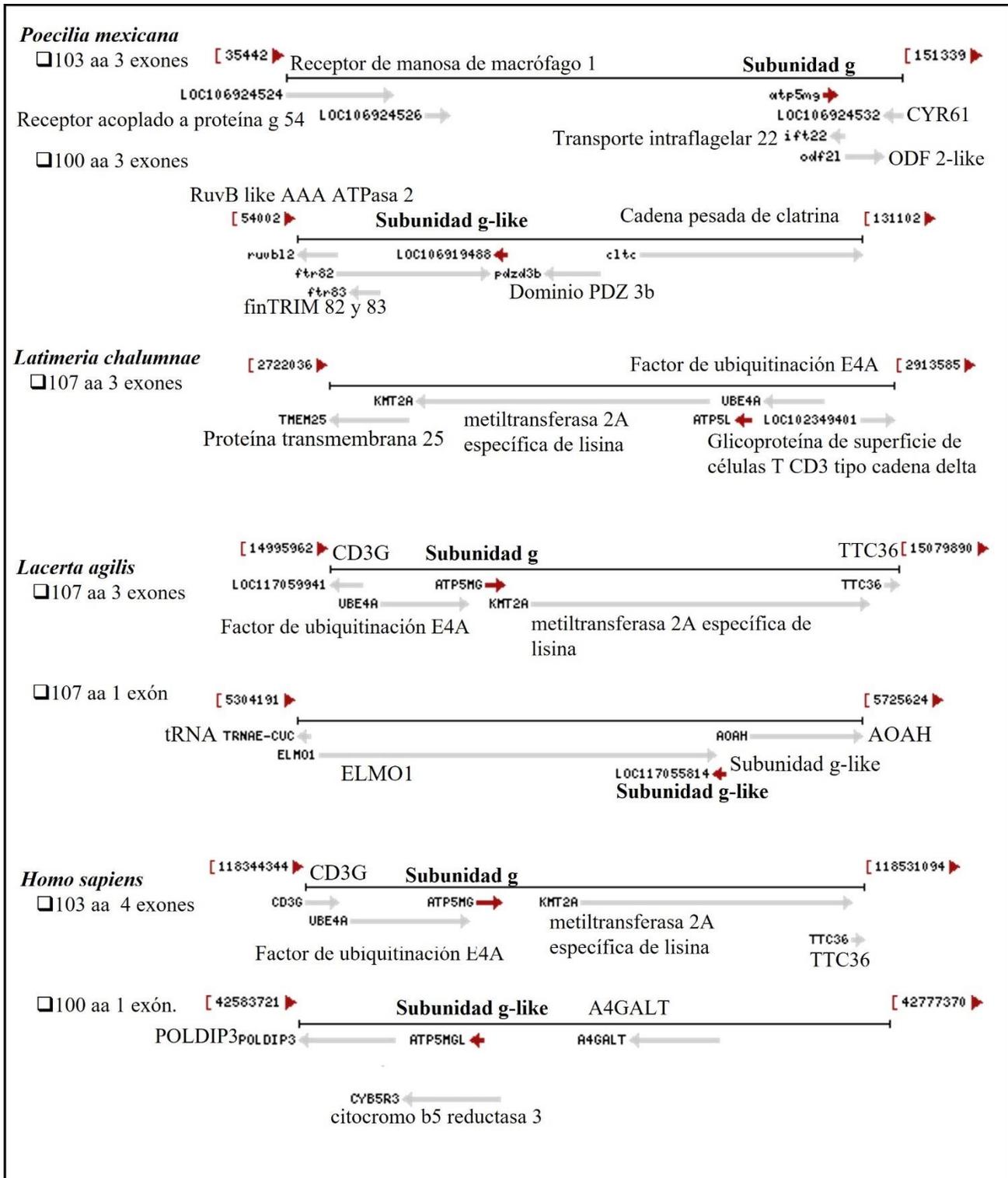


Figura 20. Contextos genómicos de la subunidad g en animales. Contexto similar de una copia de la subunidad g en *L. chalumnae*, reptiles, aves, y mamíferos.

6.3 Subunidad e

La subunidad e es codificada por el gen TIM11. Pertenece a la familia PF05680 de la base de datos de Pfam que comprende (al momento de realizar el análisis) un total de 1067 secuencias. Por su parte, la búsqueda en BLASTP se hizo usando como cebo (bait o query) la secuencia correspondiente de *Homo sapiens* (cuyo número de acceso es NP_009031). Mientras que de las secuencias recuperadas a través de la búsqueda por BLASTP se obtuvo un total de 650 secuencias de animales, 4 de arqueas, 8 de bacterias, 27 de hongos y 7 de plantas. Al realizar una nueva búsqueda con la última secuencia obtenida por BLASTP obtuvimos 821 secuencias de hongos adicionales y 4 de otros eucariotes. Eliminando las secuencias repetidas obtuvimos 2592 secuencias iniciales. Una vez aplicados los criterios de eliminación obtuvimos 1774 secuencias más 83 secuencias de plantas que excluimos para analizar a detalle y confirmar o descartar homología.

Para corroborar si las secuencias encontradas en plantas son también homólogas al resto de las subunidades e de hongos y animales, se decidió utilizar HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>), que es una herramienta de búsqueda de secuencias con mayor sensibilidad en comparación con BLAST (Potter *et al.*, 2018). Así, se seleccionaron primero 23 secuencias pertenecientes a diferentes ramas del árbol de la **Figura 15** para utilizarlas como cebo (seed sequences) en la búsqueda de secuencias homólogas en plantas. Se recuperaron 91 secuencias homólogas en plantas; de ellas, se descartó la secuencia KAB8356413 de *Carpinus fangiana* porque resultó ser una secuencia anormalmente grande (810aa) resultado de contaminación (datos no mostrados). A partir del alineamiento de las secuencias restantes de plantas, se repitió la búsqueda en HMMER, recuperando un total de 237 secuencias, de las cuales 232 pertenecen a plantas superiores (traqueofitas). De manera paralela se utilizaron las secuencias semillas para buscar secuencias homólogas en la base de datos de genomas de referencia del NCBI (RefSeq Genoma database) que contiene 124 genomas completos de plantas, así como en UNIPROT. Después de descartar las secuencias duplicadas, 324 secuencias de plantas se alinearon junto con las 1774 secuencias de subunidad e obtenidas previamente para generar el árbol filogenético mostrado en la **Figura 21**. (Whelan *et al.*, 2001)

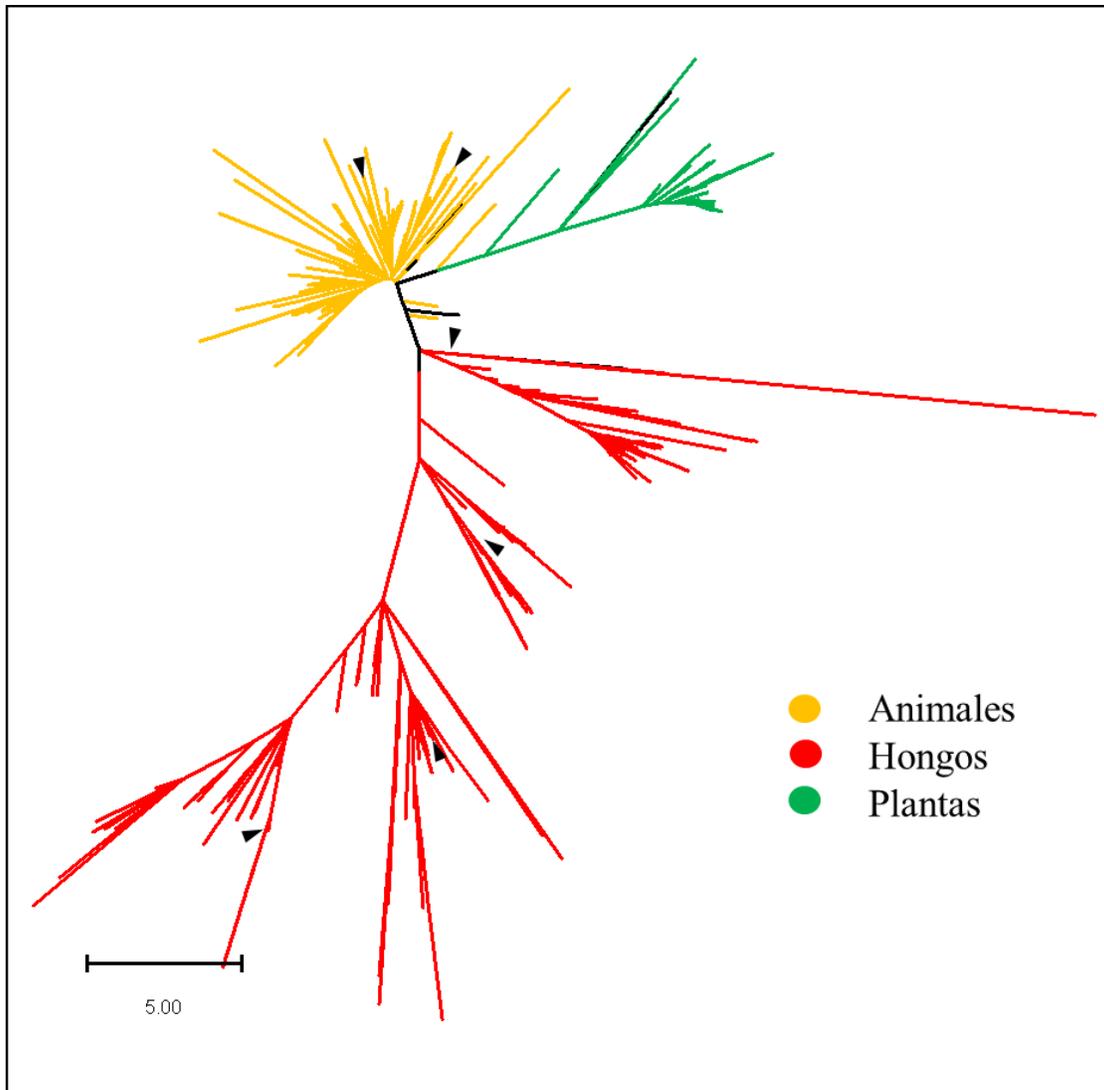


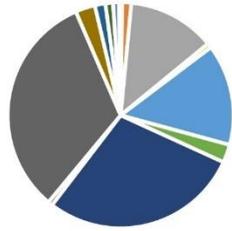
Figura 21. Análisis filogenético de la subunidad e de la ATP sintasa. El árbol fue construido empleando el método de máxima verosimilitud y el modelo de sustitución de Whelan & Goldman (2001). El árbol no enraizado, con el más alto log de verosimilitud (0.00) es mostrado. Una distribución gama discreta fue utilizada para modelar las diferencias entre las tasas de evolución entre sitios (5 categorías, +G = 2.6499). El análisis involucró 2098 secuencias y 235 posiciones en el alineamiento final. El árbol esta dibujado a escala, y la barra de distancia indica el número de sustituciones por sitio.

▲ Cebador

Las secuencias de plantas que fueron detectadas en la búsqueda inicial concordaron con las secuencias propuestas como subunidad e por Helene (Röhricht *et al.*, 2021).

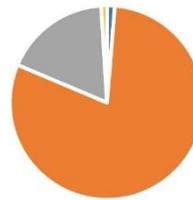
De acuerdo a los resultados que obtuvimos, podemos observar una amplia distribución de la subunidad e dentro de animales, hongos, algunos otros ophistokonta y plantas (Ver **Figura 22**). Al igual que la subunidad g, no fue hallada dentro de microsporidia.

Presencia de homólogos de la subunidad e en 462 de los 561 genomas analizados (Animales)



- Otros Animales
- Aves
- Insectos
- Plathelminthes
- Otros Cordados
- Lepidosauria
- Otros Artropodos
- Porifera
- Peces
- Mamíferos
- Nematodos
- Anfibios
- Cnidarios
- Moluscos

Presencia de homólogos de la subunidad e en 311 de los 333 genomas analizados (Hongos).



Presencia de homólogos de la subunidad e en 103 de los 124 genomas analizados (Plantas)



- Mucoromycota
- Ascomycota
- Basidiomycota
- Chytridiomycota

- Liliopsida
- Eudicotiledoneas
- Mamiellophyceae
- Trebouxiophyceae

Presencia de homólogos de la subunidad e en 4 de los 93 genomas analizados (Protistas)



- Choanoflagellida
- Filasterea
- Fonticula
- Ichthyosporea

Figura 22. Presencia de homólogos de la subunidad e en 880 de los 1110 genomas analizados.

En el caso de la subunidad e se encontraron duplicaciones en una cantidad muy limitada (Ver **Figura 23**). También llamó nuestra atención que en la búsqueda automática la subunidad e no se presentaba en algunos taxos basales de animales: principalmente cnidarios y peces. Al realizar la búsqueda manual si fueron identificadas secuencias homólogas, pero eran registradas recurrentemente como secuencias de ncRNA en el NCBI (resultados no mostrados). Probablemente se trata de un error durante el proceso automatizado de anotación de los genomas de peces (este tipo de errores se presentan también con cierta frecuencia en otros genes y/o genomas y suelen ser corregidos posteriormente en las diferentes rondas de revisión de las anotaciones de los genomas). Por su parte, algunos protistas en los cuales se identificaron homólogos de la subunidad e son organismos que divergieron previo a la diversificación de hongos y animales.

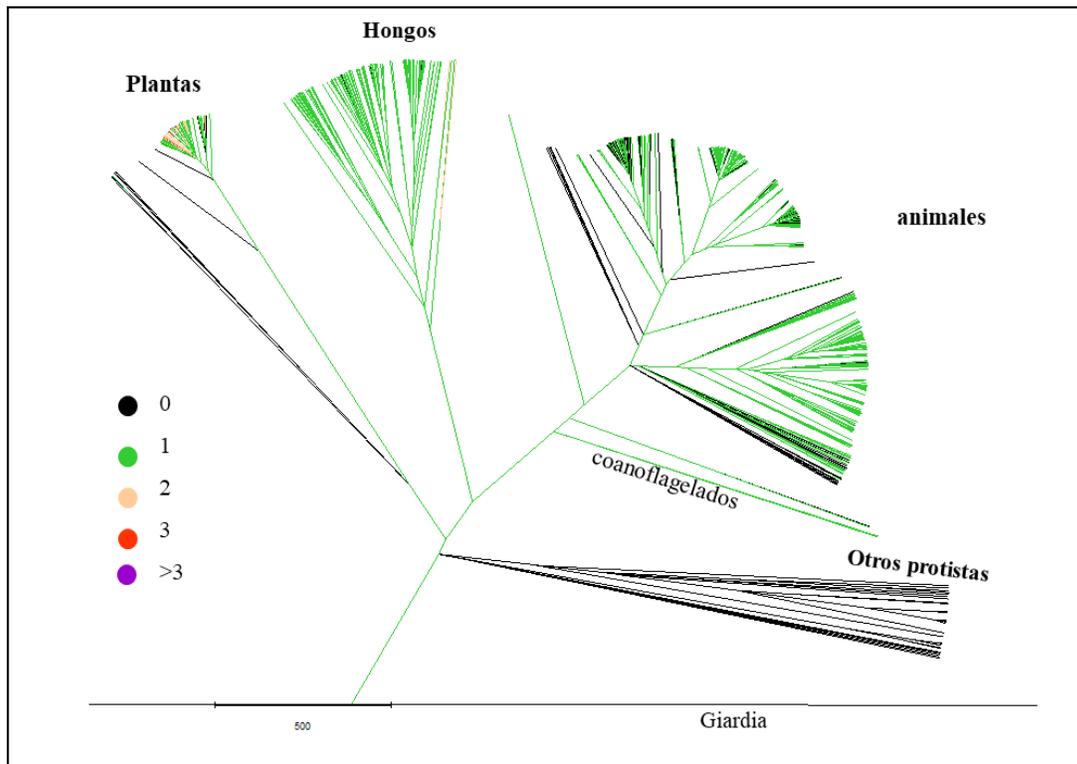


Figura 23. Dendrograma que considera la cantidad de homólogos de la subunidad e halladas a través de la búsqueda vía blast en 1110 genomas secuenciados.

También, haciendo uso de Chimera comparamos distintos modelados por homología de la subunidad e de representantes de distintos grupos taxonómicos (Ver **Figura 24**) y observamos en todas las secuencias propiedades similares de hidrofobicidad a pesar de la alta divergencia observada. De hecho, en el alineamiento constatamos la presencia del motivo GXXXG, la arginina y algunos aminoácidos más como la porción más conservada de la subunidad e, encontrándose incluso en las secuencias de plantas, por lo que corresponde a la región que está presente prácticamente en todas las secuencias (Ver **Figura 25**).

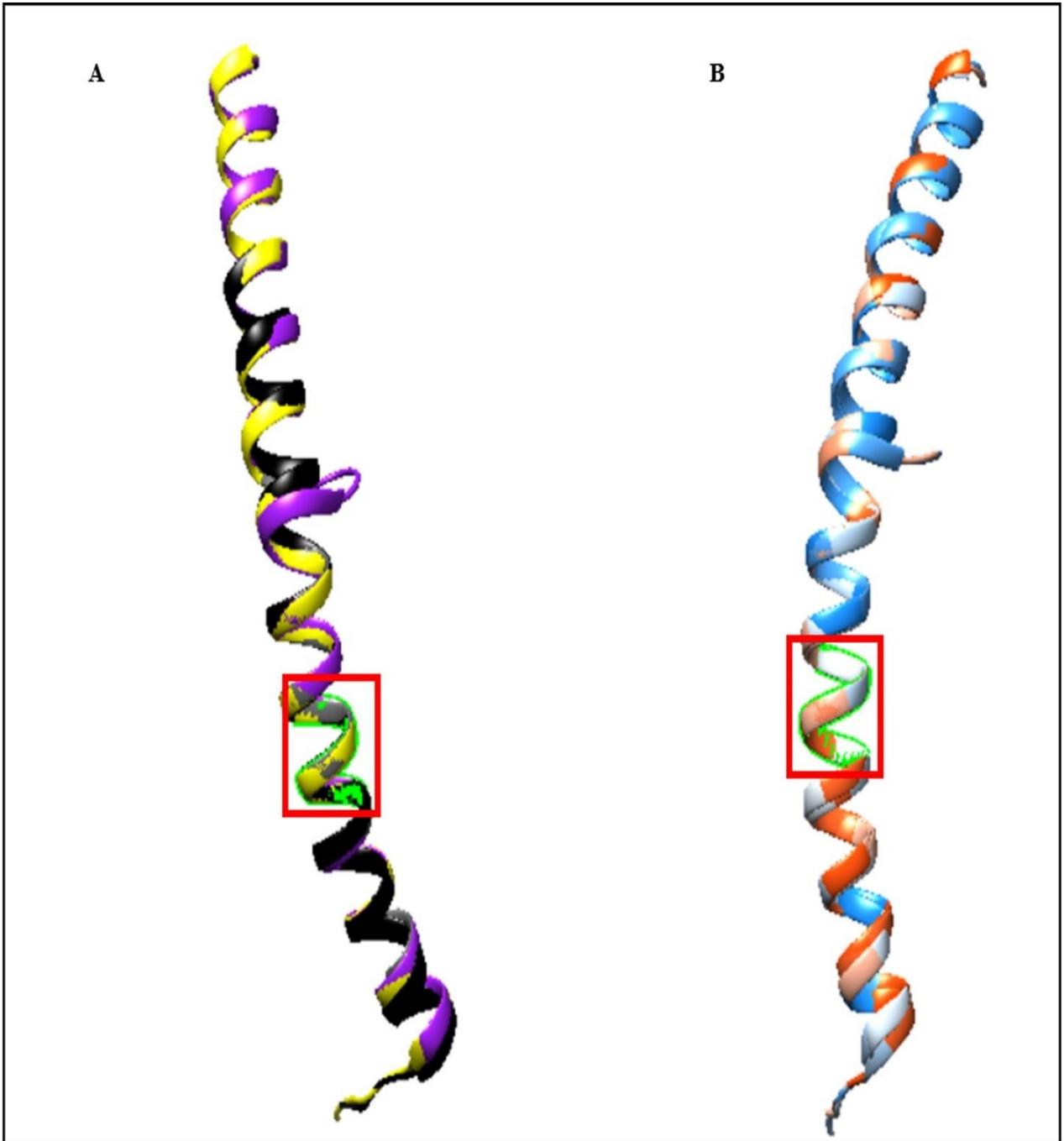


Figura 24. Alineamiento (Chimera) de modelado por homología de la subunidad e utilizando organismos respresentativos de distintos grupos taxonómicos coloreados por cadenas (A) Amarillo *Sus scrofa*, Morado *Saccharomyces cerevisiae*, Café *Fonticula alba* y negro *Capsaspora Owzarzaki* por hidrofobicidad Kyte Dolittle(Motivo GXXXG en recuadro rojo)

6.4 Subunidad i/j

Es una proteína codificada por el gen ATP18. En la base de datos de Pfam, estas proteínas pertenecen a la familia PF04911. Fue identificada por encontrarse en la interfaz que une cada monómero dentro del V₂ en *S. cerevisiae*. El árbol filogenético obtenido comprende 583 secuencias (Ver **Figura 26**). En nuestros resultados no hallamos secuencias homólogas en otros tipos de eucariotes, así como bacterias y arqueas. Esta subunidad fue encontrada en Fungi (**Figura 27**), posee una amplia distribución excluyendo nuevamente microsporidia. Los organismos que la poseen mayoritariamente presentan una sola copia dentro de los 1110 genomas analizados (**Figura 28**). El logo al igual que el árbol filogenético comprende 583 secuencias (**Figura 29**)

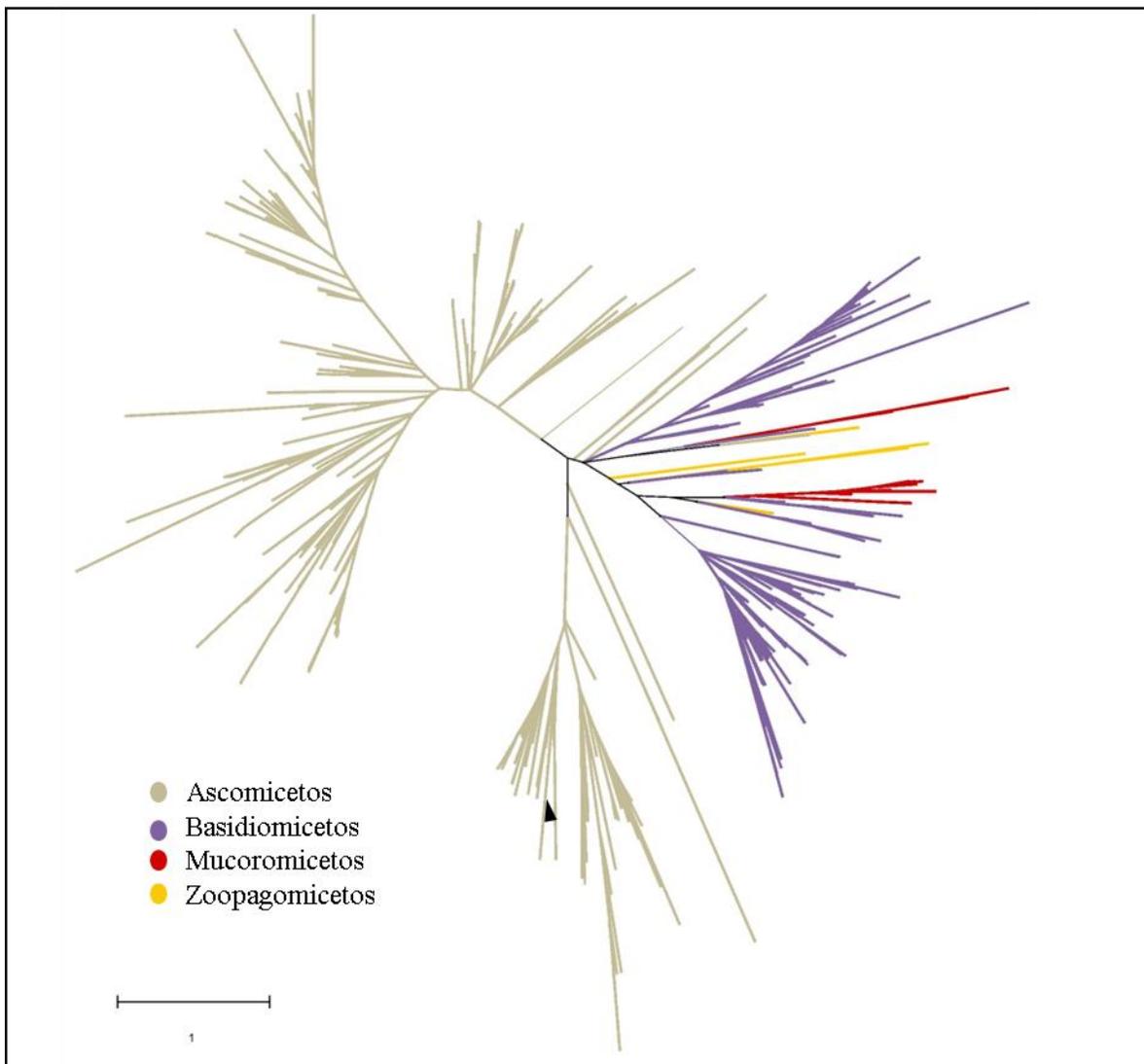


Figura 26. Análisis filogenético de la subunidad i/j de la ATP sintasa. El árbol fue construido empleando el método de máxima verosimilitud y el modelo de sustitución de Le & Gascuel (2008). El árbol no enraizado, con el más alto log de verosimilitud (-27900.66) es mostrado. Una distribución gama discreta fue utilizada para modelar las diferencias entre las tasas de evolución entre sitios (5 categorías, +G =1.1444). El análisis involucró 583 secuencias y 299 posiciones en el alineamiento final. El árbol está dibujado a escala, y la barra de distancia indica el número de sustituciones por sitio.

▲ Cebador.

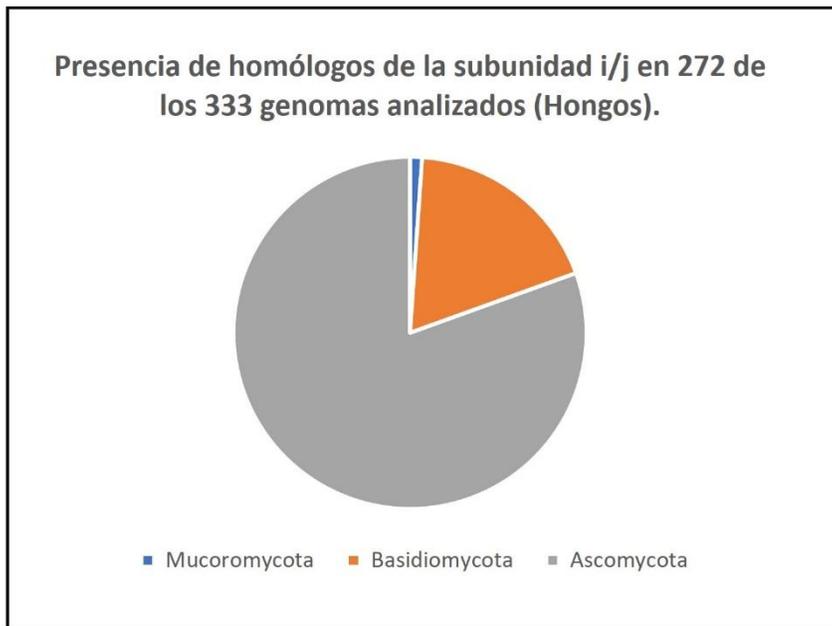


Figura 27. Presencia de homólogos de la subunidad i/j en 272 de los 1110 genomas analizados

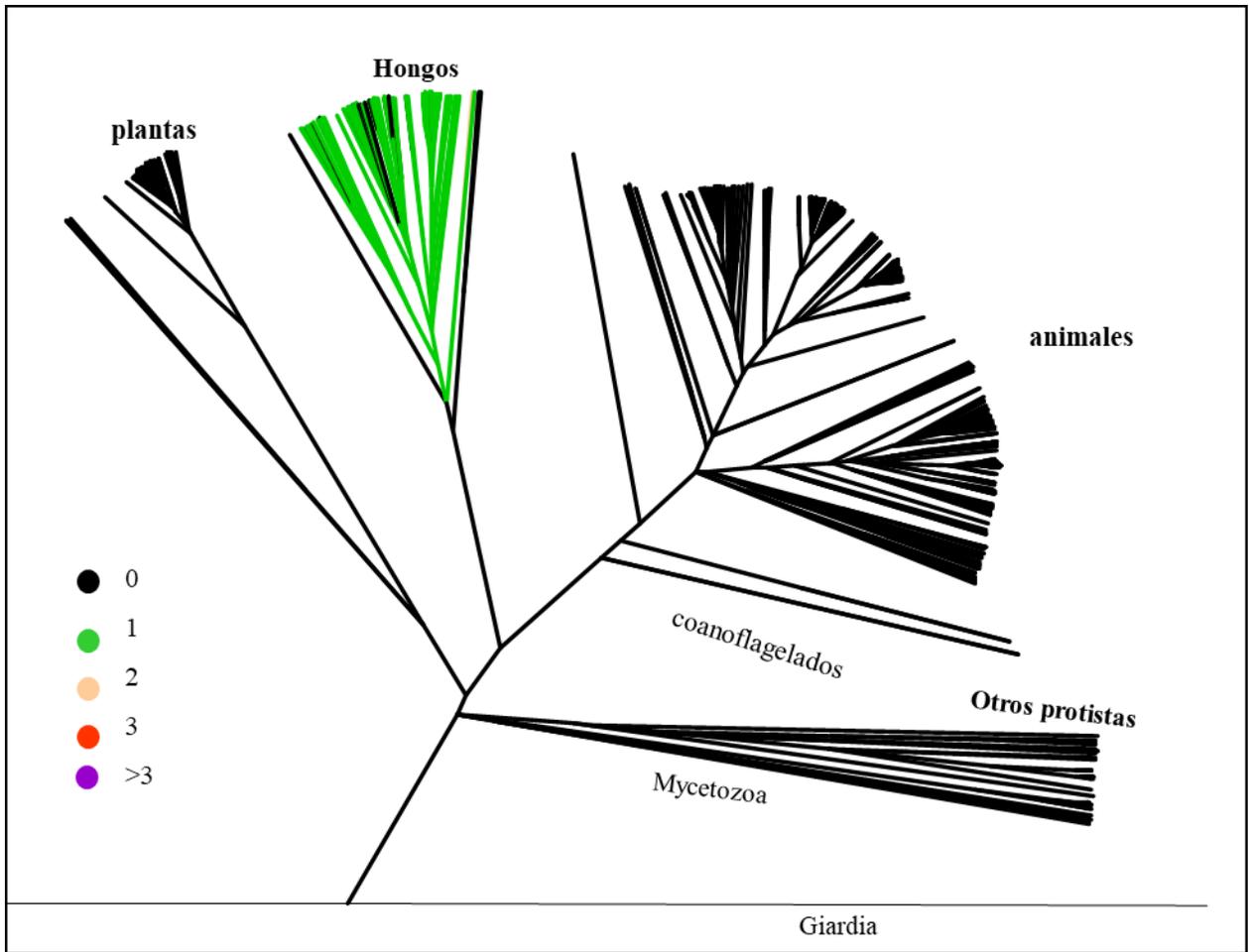


Figura 28. Dendrograma que considera la cantidad de homólogos de la subunidad i/j halladas a través de la búsqueda vía blast en 1110 genomas secuenciados.

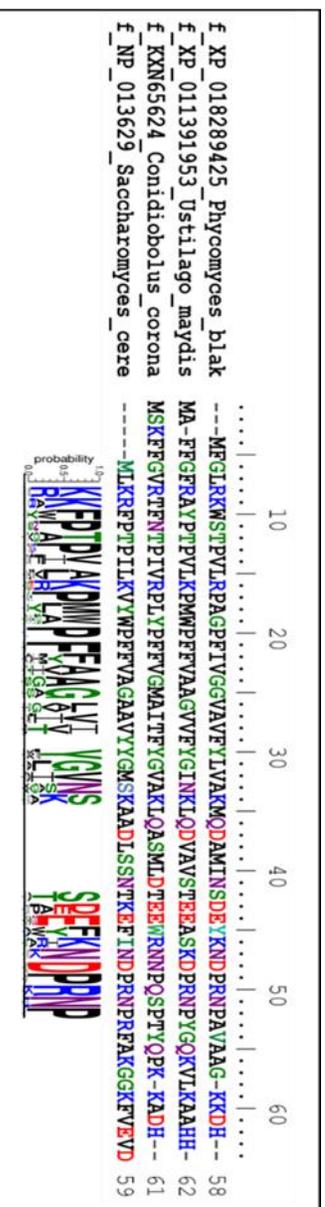


Figura 29. Arriba. Alineamiento por MAFFT de subunidad *i/j* utilizando organismos representativos de distintos grupos taxonómicos. **Abajo.** Logo generado con 583 secuencias analizadas en la construcción del árbol filogenético. Se muestran las posiciones más conservadas.

6.5 Subunidad k.

Es una proteína codificada por el gen ATP19. En la base de datos de Pfam, estas proteínas pertenecen a la familia PF11022, que comprende 636 secuencias distribuidas en 573 especies. Posterior a la depuración nos quedamos con 493 secuencias. Todas ellas pertenecientes al reino Fungi (**Figura 30**) con una amplia distribución dentro del reino, con excepción de microsporidia (Ver **Figura 31**). En el análisis del número de genes encontramos que mayoritariamente poseen una sola copia del gen (**Figura 32**), aunque también identificamos dos copias, principalmente dentro del orden saccharomycetales y en algunos otros grupos.

En el alineamiento para la construcción del logo (Ver **Figura 33**) y el árbol filogenético (Ver **Figura 30**) utilizamos 493 secuencias. El árbol filogenético fue construido por Máxima verosimilitud con 200 repeticiones de Bootstrap. Con un LL=-29315.45. Al igual que en el caso de la subunidad i/j, están ausentes en otros tipos de eucariotes, como microsporidia así como bacterias y arqueas.

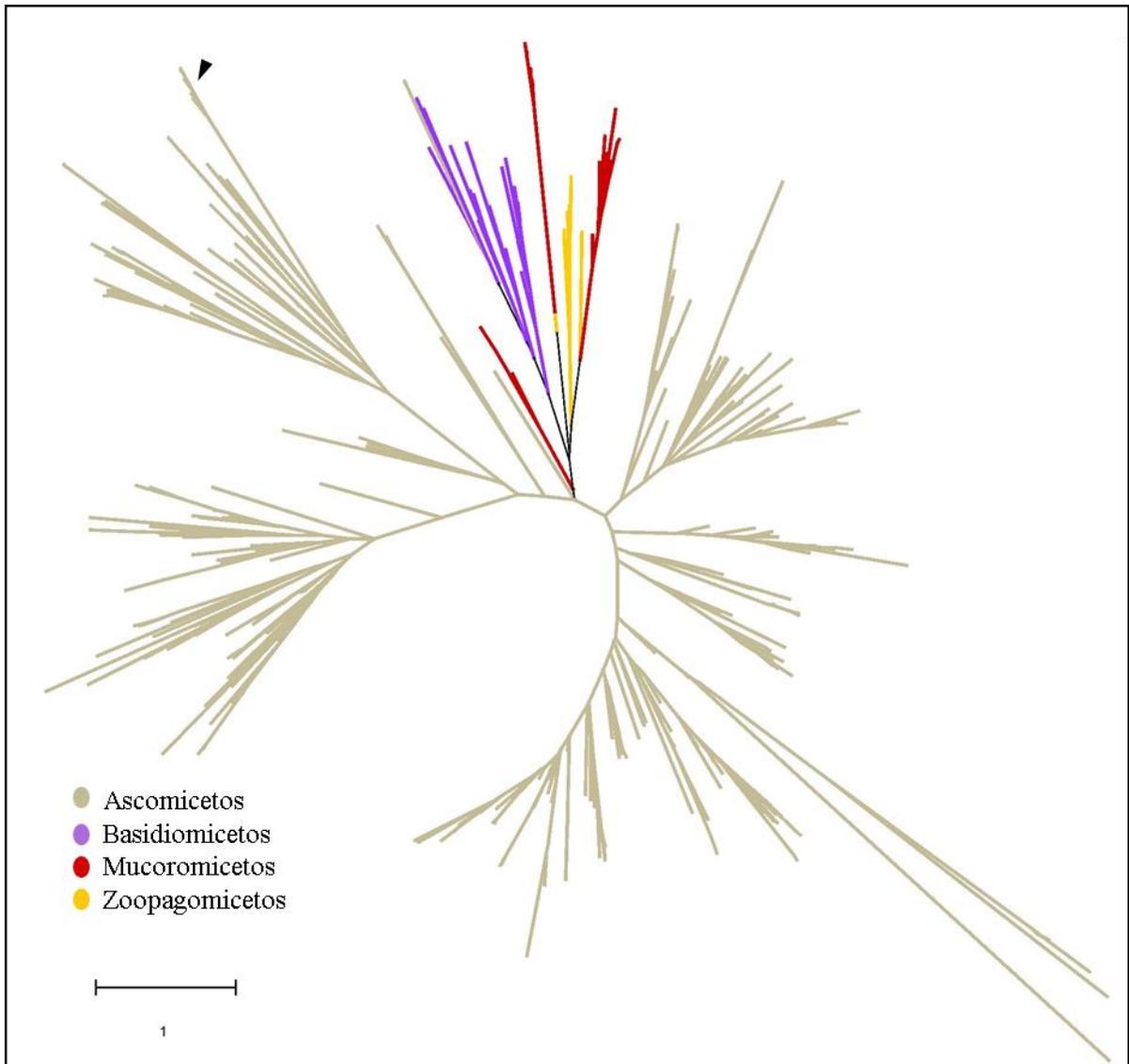


Figura 30. Análisis filogenético de la subunidad k de la ATP sintasa. El árbol fue construido empleando el método de máxima verosimilitud y el modelo de sustitución de Le & Gascuel (2008). El árbol no enraizado, con el más alto log de verosimilitud (-29315.46) es mostrado. Una distribución gama discreta fue utilizada para modelar las diferencias entre las tasas de evolución entre sitios (5 categorías, +G=1.2135). El análisis involucró 493 secuencias y 266 posiciones en el alineamiento final. El árbol esta dibujado a escala, y la barra de distancia indica el número de sustituciones por sitio. ▲ Cebador.

Presencia de homólogos de la subunidad k en 292 de los 333 genomas analizados (Hongos).

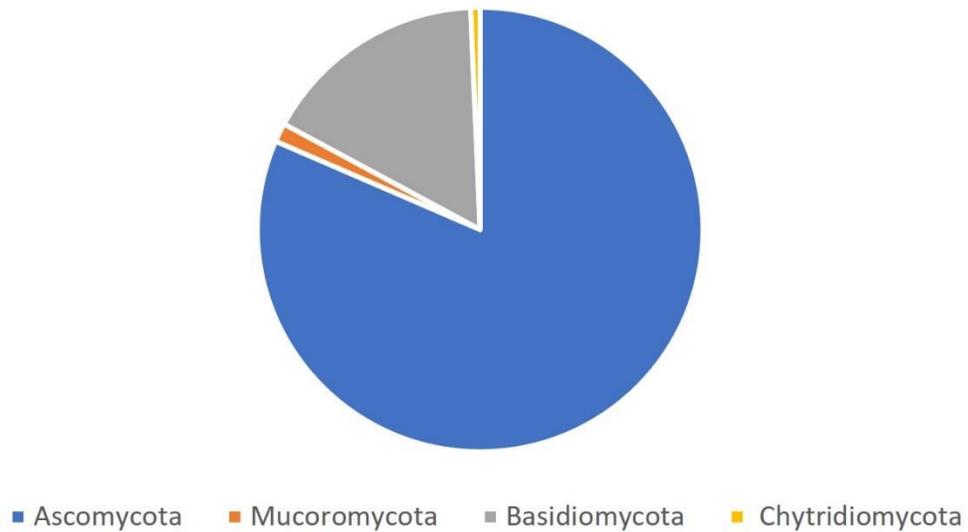


Figura 31. Distribución filética de la subunidad k en 1110 genomas analizados.

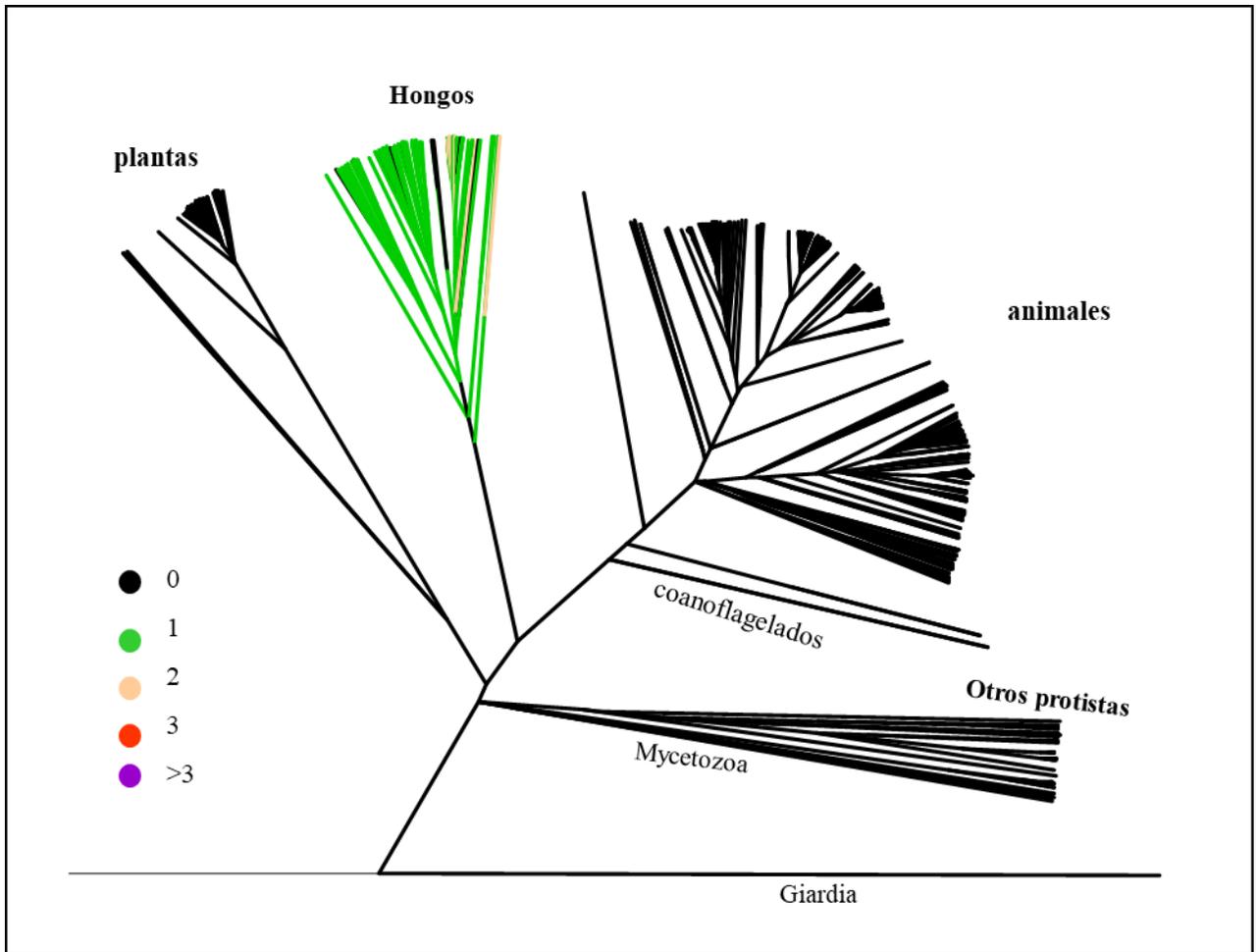


Figura 32. Dendrograma que considera la cantidad de homólogos de la subunidad k halladas a través de la búsqueda vía blast en 1110 genomas secuenciados.

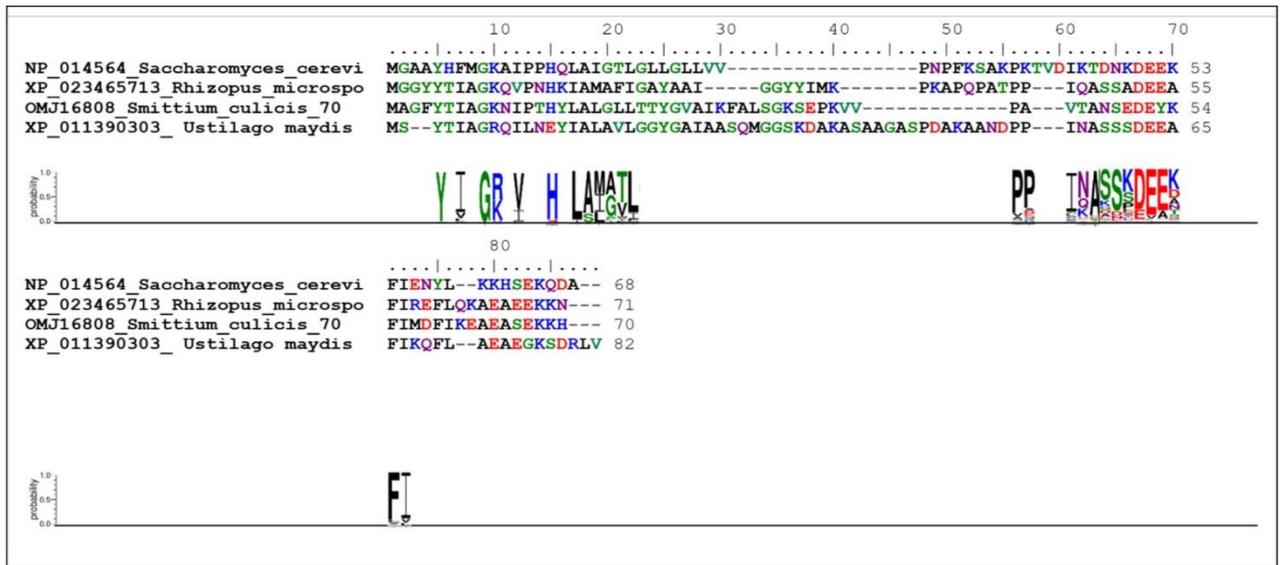


Figura 33. Arriba. Alineamiento por MAFFT de subunidad k utilizando organismos representativos de distintos grupos taxonómicos. **Abajo.** Logo generado con 493 secuencias utilizadas en la construcción del árbol filogenético. Se muestran las posiciones más conservadas.

7 Discusión

En este trabajo se llevó a cabo un análisis filogenético que incluyó un estudio detallado de la distribución filética de las subunidades e, g i/j y k de la ATP sintasa asociadas a la dímerización/oligomerización de la ATP sintasa de acuerdo con la evidencia experimental (Véase Evidencias experimentales). La subunidad g ha sido hallada en Ophistokonta y en plantas con excepción de Chlorophyceae donde fueron reclutadas las subunidades ASA (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006) (Véase sección de **Evidencias experimentales**). Mientras que la subunidad e, i, k se mantenían limitadas a ophistokontas. Sin embargo, Röhrlich ha sugerido la presencia de la subunidad e, y i/j en plantas (Röhrlich *et al.*, 2021).

Aunque en los modelos más recientes, se han realizado superposiciones topológicas para localizar e identificar a las subunidades que mantengan una localización topológica similar a las subunidades de los modelos ya conocidos (Flygaard *et al.*, 2020; Gahura *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2020) por posición topológica en las estructuras resueltas por crió-EM se ha señalado que habría una contraparte de la subunidad i/j y k en mamíferos, *T thermophila*, *T gondii* e incluso en *T brucei*.

Evidentemente, es posible el hecho de que en el presente estudio se encuentren falsos negativos por ser secuencias no reportadas o porque por la alta divergencia de las secuencias no hayan sido detectadas en su correspondiente proceso de anotación ó en nuestra búsqueda automatizada, por lo que recurrimos a una posterior búsqueda manual en las secuencias de ADN genómico. Las ausencias que consideramos con especial énfasis son las que persistían dentro de varios organismos de un mismo taxa en los genomas de referencia completamente secuenciados refseq. Así logramos hallar una amplia distribución de las subunidades involucradas en la dímerización/oligomerización dentro de los organismos eucariotes, lo que apoya una amplia presencia casi universal del dímero en eucariotes.

El que la subunidad g esté distribuida en todos los reinos de eucariotes, pero no presenten homología con bacterias o arqueas resulta poco esperado, ya que la inmensa mayoría de las proteínas de eucariotes tienen su origen a partir de un ancestro bacteriano o de arqueas (Jain *et al.*, 1999). Esto sugiere un origen *de novo* asociado al origen mismo del ancestro común a todos los eucariotes.

En esta misma línea, un reciente estudio en *T. brucei* (Gahura *et al.*, 2022), un organismo tempranamente divergente perteneciente al superfilo Discoba, miembro del supergrupo Excavata, el cual posee un dímero del tipo IV, mostró la presencia de subunidades altamente conservadas como la subunidad b, d, f, 8, i/j y k, así como la presencia de la subunidad e-g lo que sugiere una interacción ancestral bastante similar a la descrita en los modelos de mamíferos. No solo esto, el silenciamiento por RNA de interferencia de la subunidad g en *T. brucei* dio como resultado la pérdida de V₂, pero no de la actividad catalítica de la enzima, así como la alteración de la morfología mitocondrial y disminución en el crecimiento en condiciones de crecimiento dependientes de la fosforilación oxidativa. Resultados bastante similares a lo ya reportado en levaduras y más recientemente en mamíferos (Bustos & Velours, 2005; Guo *et al.*, 2017; Paumard *et al.*, 2002; Pinke *et al.*, 2020; Spikes *et al.*, 2020). Sin embargo, la interacción entre dímeros en *T. brucei* de acuerdo a sus resultados en esta ocasión sería dada entre subunidades que corresponderían al dímero transversal en las subunidades del dímero tipo I.

Los resultados obtenidos nos permiten proponer hipótesis relativas del reclutamiento de las subunidades involucradas en la dimerización/oligomerización. La subunidad g, por ejemplo, se encontraría ampliamente distribuida en animales, hongos, plantas y una buena cantidad de otros taxos eucariotes (**Figura 34**). Seguido encontramos la presencia de subunidad e después de la separación de *Dictiostelium*. El surgimiento de las subunidades i/j y k en cambio, parece que ocurrió en un evento posterior al desarrollo del último ancestro común a todos los hongos, puesto que con herramientas de búsqueda de similitud de secuencias como BLAST o HMMER, no se encontraron homólogos a las subunidades i/j y k fuera del reino fungi

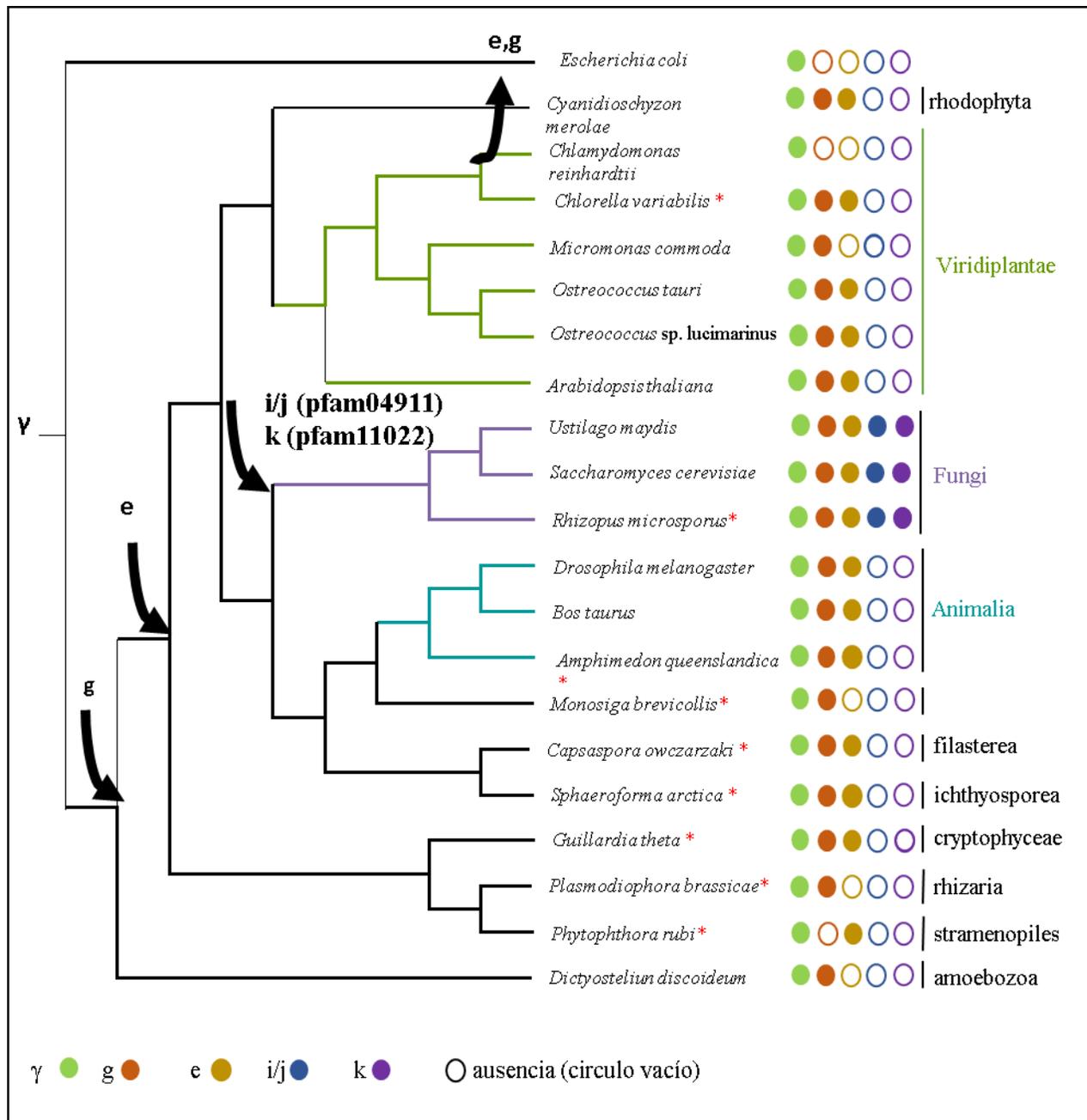


Figura 34. Resultados que muestran el probable reclutamiento de las subunidades e, g, i/j, k involucradas en la oligomerización de la ATP sintasa. **Ramas en color:** Verde. Plantas. Morado. Hongos. Azul. Animales. **Flechas.** Hacia abajo. Adquisición de subunidades. Hacia arriba. Pérdida de subunidades. Dendograma generado a partir de timetree usando a la subunidad γ como punto de referencia. * El ensamblado de genoma aún no es completo.

El hecho de que se trate de proteínas muy pequeñas, cuyo papel sea estructural formando mayoritariamente hélices α en enormes complejos moleculares, da la posibilidad de ser altamente divergentes y es un factor que complica su análisis evolutivo. Mencionando por ejemplo el hecho de que se ha sugerido una ortología entre las subunidades i/j y k de hongos con las subunidades 6.8pl y DAPIT respectivamente. (He *et al.*, 2018). Sin embargo, estas últimas secuencias son muy divergentes y no es posible confirmar o descartar homología mediante análisis de Blast (resultados no mostrados).

Queda pendiente conocer el papel de las múltiples copias de la subunidad g presentes principalmente en animales y plantas, ya que, al contar con un gran número de copias, abre la posibilidad del desarrollo de funciones adicionales. Especialmente donde encontremos copias altamente divergentes. Como se ha indicado, el carácter estructural más importante de la subunidad e y g está constituido por el sitio de unión conformado por el motivo GXXXG, que es la porción más conservada de ambas subunidades. El motivo GXXXG y algunos de los aminoácidos más conservados de la subunidad g (Bustos & Velours, 2005) se mantienen, incluso en organismos muy divergentes como plantas y amebozoa. En *A. thaliana* Rohricht y cols. (2021) identifican una buena cantidad de subunidades que podríamos encontrar en el V₂ tipo I. Estos resultados parecen sugerir que la estructura del V₂ en plantas es similar a la que encontramos en modelos de hongos y mamíferos. Sin embargo, es importante señalar que la subunidad e identificada por Rohricht, codificada por el gen At3g01130, fue descrita previamente por Molesini y cols (2012), como una miniproteína que denominaron AtAUCSIA-1, la cual interacciona físicamente con proteínas relacionadas con la kinesina, modulando el transporte polar de auxinas por un mecanismo aún no definido. En concordancia con lo anterior, Kalladan y col (2017) demostraron que AT3G01130 también afecta la acumulación del ácido abscísico (ABA), que funciona en plantas como una hormona de estrés. Con estos antecedentes, no se puede dejar de señalar las observaciones de Zancani y cols (Zancani *et al.*, 2020) quienes señalan que la presencia de la subunidad e (ATP21) en *A. thaliana* aún no está confirmada porque la proteína At5g15320 identificada por espectrometría de masas, no se agrupa con el resto de las subunidades de la F₁F₀-ATP sintasa. Por otra parte, para estudiar las múltiples copias presentes de las subunidades, en *Arabidopsis thaliana*, Rohricht y colaboradores (Röhricht *et al.*, 2021) obtuvieron mutantes de dos genes funcionalmente análogos de la subunidad e, y no encontraron alteraciones en la enzima, por

lo que sugieren que se tratan de genes redundantes. De este modo, si termina por confirmarse plenamente que AT3G01130 y AT5G15320 corresponden al homólogo en plantas de la subunidad e; es claro que se trata de una proteína multifuncional y que desempeñan más de una función en *A. thaliana*.

Por otra parte, la ausencia de subunidades en microsporidia podría explicarse por el hecho de que este grupo carezca de crestas mitocondriales y pertenezca a los linajes que poseen organelos relacionados a la mitocondria (MROs, del inglés Mitochondrion Related Organelles) incluyendo mitosomas o hidrogenosomas. Los MROs se encuentran presentes en distintos linajes independientes y hay consenso que son resultado de una evolución convergente (Aiman *et al.*, 2021). Algunos otros ejemplos son: *Giardia lamblia* (que pertenece a la clase fornicata), *Entamoeba histolytica* (que pertenece al filo amoebozoa), y *Trichomona vaginalis* (que pertenece a la clase parabasalia). Estos organismos se caracterizan por encontrarse adaptados a vivir en condiciones de hipoxia o anaerobias además de carecer de crestas mitocondriales. Los MROs suelen poseer modificaciones metabólicas importantes. Retienen algunas funciones como biogénesis de grupos hierro-azufre y cofactores enzimáticos. En cambio, algunas funciones que generalmente pierden son: la fosforilación oxidativa, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, y la beta oxidación (Aiman *et al.*, 2021).

Se han descrito otros complejos multiproteicos localizados en la CJ denominados MICOS que mantienen la unión de cresta en eucariotes, su alteración provoca importantes efectos en la morfología de la cresta mitocondrial. En humanos las subunidades del complejo MICOS son: Mic60 (Mitofilina), Mic27(APOOL), Mic26 (APOO), Mic25 (CHCHD6), Mic19 (CHCHD3), Mic13 (Qil1) y Mic10 (anteriormente conocido como MINOS1) (Muñoz-Gómez *et al.*, 2015). En células HeLa, se estudió la ausencia de las subunidades del complejo MICOS a través de microscopía confocal. En este estudio, la pérdida de Mic60 lleva a una disminución muy fuerte de los niveles de expresión del resto de proteínas del complejo MICOS. Por su parte, al eliminar a Mic10, Mic13 y Mic19 llevan a una pérdida del 70% de las CJ. Mientras que la ausencia de Mic60 ocurre una pérdida total de las CJ. Por su parte, si se rescata la expresión de Mic60 se recupera la formación de CJ (Stephan *et al.*, 2020).

En concordancia con nuestros resultados, homólogos de los complejos MICOS tampoco fueron encontrados en microsporidia y otros pequeños grupos de eucariotes adaptados a vivir en concentraciones bajas de oxígeno (Muñoz-Gómez *et al.*, 2015). En cambio, sí fueron encontradas las dos principales subunidades del complejo MICOS, mic60 y mic10 dentro de los mayores linajes de eucariotes: fungi, animales, amebozoa, excavados, SAR, plantas y arqueoplástidos, entre otros. Cabe mencionar que en el caso del complejo MICOS, si se identificó su origen como proveniente de α -proteobacterias, apoyado por similitudes de secuencia y estructurales con alfaMICOS, proteína responsable de la formación de la unión de la membrana citoplasmática (IntraCytoplasmic Membrane Junctions ICMJs) (Muñoz-Gómez *et al.*, 2017). Por otra parte, se ha reportado que OPA1 es un complejo proteico que también está involucrado en el correcto plegamiento de la cresta mitocondrial (Stephan *et al.*, 2020). La GTPasa relacionada con dinamina OPA1 (Optical Atrophy 1) participa en la fusión mitocondrial y es requerida para mantener la cresta mitocondrial (Meeusen *et al.*, 2006). Al eliminar OPA1 en células HeLa y observarlas por TEM y ET, se muestra un fenotipo con un número menor de crestas que además resultaron ser más cortas y desordenadas (Stephan *et al.*, 2020). Se han mostrado interacciones físicas y genéticas entre estos complejos, sin embargo, los mecanismos exactos sobre su participación aún no han sido elucidados (Eydt *et al.*, 2017).

Los resultados y el conocimiento actual sugieren fuertemente que la estructura del dímero es ubicua en eucariotes. Sin embargo, la forma de las crestas es altamente dinámica (Quintana-Cabrera *et al.*, 2018) y está sujeta a cambios dependiendo de las condiciones fisiológicas de las células y es muy probable que estén involucrados otros componentes aún no identificados, pues se trata de un proceso extraordinariamente dinámico.

8 Conclusiones

No se identificaron homólogos de ninguna subunidad en bacterias y arqueas. Mientras que la subunidad g mostró una presencia en gran diversidad de protistas sugiriendo un origen asociado al último ancestro común de los eucariotes. La subunidad e, por su parte fue hallada en ophistokonta, plantas y algunos otros protistas. Mientras que homólogos a la subunidad i/j y k fueron limitadas en hongos. Todas las subunidades accesorias mostraron una amplia distribución de al menos una copia de las subunidades accesorias dentro de los linajes

hallados (excluyendo a microsporidia, *Acanthamoeba* y *Entamoeba*: Grupos de organismos eucariotes que carecen de crestas mitocondriales).

La gran mayoría de los homólogos de las subunidades g y e incluyen el motivo GXXXG y otros aminoácidos, con evidencias de su participación en la formación del V₂ en los modelos de mamíferos. Esto concuerda con la amplia distribución de arreglos dímero/oligoméricos dentro de animales, hongos, plantas y algunos otros protistas. Los resultados de este trabajo, así como los datos aportados por Rohricht (Röhricht *et al.*, 2021) sugiere una alta similitud estructural entre el V₂ encontrado en mamíferos y hongos con el de plantas. Por su parte, el no haber encontrado a la subunidad e pero sí a la subunidad g en amebozoa abre una interrogante sobre los arreglos de la ATP sintasas en dichos grupos. El gran número de especies de plantas y animales con múltiples copias del gen que codifica para la subunidad g, abre la posibilidad de que pudieran estar desarrollando funciones adicionales aún no elucidadas.

9 Referencias bibliográficas

- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., & Enriquez, J. A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Molecular Cell*, 32(4), 529–539. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.021>
- Adams, M. J., Buehner, M., Chandrasekhar, K., Ford, G. C., Hackert, M. L., Liljas, A., Rossmann, M. G., Smiley, I. E., Allison, W. S., Everse, J., Kaplan, N. O., & Taylor, S. S. (1973). Structure-function relationships in lactate dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(7), 1968–1972. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.7.1968>
- Aiman, A., Shahardar, R. A., & Wani, Z. A. (2021). Mitochondria and Mitochondrion related organelles in Parasitic Protozoa-An Overview. *Journal of Livestock Science*, 12(4), 233–240. <https://doi.org/10.33259/jlivestsci.2021.233-240>
- Allen, R. D., Schroeder, C. C., & Fok, A. K. (1989). An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques. *The Journal of Cell Biology*, 108(6), 2233–2240. <https://doi.org/10.1083/jcb.108.6.2233>
- Allewell, N. M., Narhi, L. O., & Rayment, I. (2013). Molecular biophysics for the life sciences. *Molecular Biophysics for the Life Sciences*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8548-3>

- Archibald, J. M. (2015). Evolution: Gene transfer in complex cells. *Nature*, 524(7566), 423–424. <https://doi.org/10.1038/nature15205>
- Archibald, J. M., & Keeling, P. J. (2002). Recycled plastids: A “green movement” in eukaryotic evolution. *Trends in Genetics* 18(11), 577–584. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)02777-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)02777-4)
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A., & Schägger, H. (1998). Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: Identification of three dimer-specific subunits. *EMBO Journal*, 17(24), 7170–7178. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7170>
- Arselin, G., Giraud, M.-F., Dautant, A., Vaillier, J., Brèthes, D., Couлары-Salin, B., Schaeffer, J., & Velours, J. (2003). The GxxxG motif of the transmembrane domain of subunit e is involved in the dimerization/oligomerization of the yeast ATP synthase complex in the mitochondrial membrane. *European Journal of Biochemistry*, 270(8), 1875–1884. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03557.x>
- Balabaskaran Nina, P., Dudkina, N. V., Kane, L. A., van Eyk, J. E., Boekema, E. J., Mather, M. W., & Vaidya, A. B. (2010). Highly Divergent Mitochondrial ATP Synthase Complexes in *Tetrahymena thermophila*. *PLoS Biology*, 8(7), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000418>
- Ball, S., Colleoni, C., Cenci, U., Raj, J. N., & Tirtiaux, C. (2011). The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 62(6), 1775–1801. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq411>
- Baradaran, R., Berrisford, J. M., Minhas, G. S., & Sazanov, L. A. (2013). Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature*, 494(7438), 443–448. <https://doi.org/10.1038/nature11871>
- Blair Hedges, S., & Kumar, S. (2009). *The Timetree of Life* (1st ed.). Oxford University Press.
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Biological Oxidations: Bioenergetics. In A. Blanco & G. Blanco (Eds.), *Medical Biochemistry* (177–204). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00009-4>
- 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>
- Boyer, P. D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E., & Slater, E. C. (1977). Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Annual Review of Biochemistry*, 46(1), 955–966. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.46.070177.004515>
- Bücher, Th., & Klingenberg, M. (1958). Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation. *Angewandte Chemie*, 70(17–18), 552–570. <https://doi.org/10.1002/ange.19580701707>

- Bustos, D. M., & Velours, J. (2005). The Modification of the Conserved G XXX G Motif of the Membrane-spanning Segment of Subunit g Destabilizes the Supramolecular Species of Yeast ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(32), 29004–29010. <https://doi.org/10.1074/jbc.m502140200>
- Butterfield, N. J. (2000). Bangiomorpha pubescens n. Gen., n. sp.: Implications for the Evolution of Sex, Multicellularity, and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic Radiation of Eukaryotes. *Paleobiology*, 26(3), 386–404.
- Ceccarelli, C., Grodsky, N. B., Ariyaratne, N., Colman, R. F., & Bahnsen, B. J. (2002). Crystal structure of porcine mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase complexed with Mn²⁺ and isocitrate: Insights into the enzyme mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), 43454–43462. <https://doi.org/10.1074/jbc.m207306200>
- Chance, B., Estabrook, R. W., & Lee, C. P. (1963). Electron Transport in the Oxysome. *Science (New York, N.Y.)*, 140(3565), 379–380. <https://doi.org/10.1126/science.140.3565.379-c>
- Chance, B., & Williams, G. R. (1955). A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature*, 175(4469), 1120–1121. <https://doi.org/10.1038/1751120a0>
- Chance, B., & Williams, G. R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*, 17, 65–134. <https://doi.org/10.1002/9780470122624.ch2>
- Chen, C., Natale, D. A., Finn, R. D., Huang, H., Zhang, J., Wu, C. H., & Mazumder, R. (2011). Representative Proteomes: A Stable, Scalable and Unbiased proteome set for sequence analysis and functional annotation. *PLoS ONE*, 6(4), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018910>
- Cogliati, S., Enriquez, J. A., & Scorrano, L. (2016). Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends in Biochemical Sciences* 41(3), 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.01.001>
- Colina-Tenorio, L., Dautant, A., Miranda-Astudillo, H., Giraud, M. F., & González-Halphen, D. (2018). The peripheral stalk of rotary ATPases. *Frontiers in Physiology* 9, 1243. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01243>
- Couoh-Cardel, S. J., Uribe-Carvajal, S., Wilkens, S., & García-Trejo, J. J. (2010). Structure of Dimeric F₁F₀-ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 285(47), 36447–36455. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.144907>
- Davies, K. M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gomez, J. D., & Kuhlbrandt, W. (2012). Structure of the yeast F₁F_o-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34), 13602–13607. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204593109>
- Davies, K. M., Strauss, M., Daum, B., Kief, J. H., Osiewacz, H. D., Rycovska, A., Zickermann, V., & Kuhlbrandt, 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>
- de Vries, S., & Grivell, L. A. (1988). Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 176(2), 377–384. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14292.x>
- Dudkina, N. V., Heinemeyer, J., Keegstra, W., Boekema, E. J., & Braun, H. P. (2005). Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: An angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS Letters*, 579(25), 5769–5772. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.065>
- Duncan, T. M., Bulygin, V. V., Zhou, Y., Hutcheon, M. L., & Cross, R. L. (1995). Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli* F1-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(24), 10964–10968. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.10964>
- Edgar, R. C. (2004a). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Edgar, R. C. (2004b). MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5(113), 1–19. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- Edman, J. C., Kovacs, J. A., Masur, H., Santi, D. V., Elwood, H. J., & Sogin, M. L. (1988). Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the Fungi. *Nature*, 334(6182), 519–522. <https://doi.org/10.1038/334519a0>
- Embden, G., Deuticke, H., & Kraft, G. (1933). Über das Vorkommen einer optisch aktiven Phosphoglycerinsäure bei der Glykolyse in der Muskulatur. *Z. Physiol. Chem*, 230, 12–28.
- Enríquez, J. A. (2016). Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annual Review of Physiology*, 78(1), 533–561. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105031>
- Ercolani, L., Florence, B., Denaro, M., & Alexander, M. (1988). Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 263(30), 15335–15341. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)37593-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)37593-3)
- Eubel, H., Jänsch, L., & Braun, H. P. (2003). New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiology*, 133(1), 274–286. <https://doi.org/10.1104/pp.103.024620>
- Eydt, K., Davis, K. M., Behrendt, C., Wittig, I., & Reichert, A. S. (2017). Cristae architecture is determined by an interplay of the MICOS complex and the F1Fo ATP synthase via Mic27 and Mic10. *Microbial Cell*, 4(8), 259–272. <https://doi.org/10.15698/mic2017.08.585>

- Farfari, S., Schulz, V., Corkey, B., & Prentki, M. (2000). Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes*, *49*(5), 718–726. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.5.718>
- Flamholz, A., Noor, E., Bar-Even, A., Liebermeister, W., & Milo, R. (2013). Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(24), 10039–10044. https://doi.org/10.1073/pnas.1215283110/suppl_file/sd02.xlsx
- 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*(5342), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18993-6>
- Fothergill-Gilmore, L. A., & Michels, P. A. M. (1993). Evolution of glycolysis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* *59*(2), 105–235. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(93\)90001-Z](https://doi.org/10.1016/0079-6107(93)90001-Z)
- Gahura, O., Mühleip, A., Hierro-Yap, C., Panicucci, B., Jain, M., Hollaus, D., Slapničková, M., Zíková, A., & Amunts, A. (2022). An ancestral interaction module promotes oligomerization in divergent mitochondrial ATP synthases. *Nature Communications*, *13*(5989), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33588-z>
- García, J. J., Morales-Ríos, E., Cortés-Hernández, P., & Rodríguez-Zavala, J. S. (2006). The inhibitor protein (IF1) promotes dimerization of the mitochondrial F1FO-ATP synthase. *Biochemistry*, *45*(42), 12695–12703. <https://doi.org/10.1021/bi060339j>
- Gilkerson, R. W., Selker, J. M. L., & Capaldi, R. A. (2003). The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Letters*, *546*(2–3), 355–358. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00633-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00633-1)
- Giraud, M.-F., Paumard, P., Soubannier, V., Vaillier, J., Arselin, G., Salin, B., Schaeffer, J., Brèthes, D., di Rago, J.-P., & Velours, J. (2002). Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1555*(1–3), 174–180. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(02\)00274-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(02)00274-8)
- Gogarten, J. P., Kibak, H., Dittrich, P., Taiz, L., Bowman, E. J., Bowman, B. J., Manolson, M. F., Poole, R. J., Date, T., & Oshima, T. (1989). Evolution of the vacuolar H⁺-ATPase: implications for the origin of eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(17), 6661–6665. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.17.6661>
- 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., Bueler, S. A., & Rubinstein, J. L. (2017). Atomic model for the dimeric FO region of mitochondrial ATP synthase. *Science*, *358*(6365), 936–940. <https://doi.org/10.1126/science.aao4815>

- Hackenbrock, C. R. (1966). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, 30(2), 269–297. <https://doi.org/10.1083/JCB.30.2.269>
- Hackenbrock, C. R. (1977). Molecular Organization and the Fluid Nature of the Mitochondrial Energy Transducing Membrane. *Structure of Biological Membranes*, 199–234. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8127-3_12
- Hatefi, Y., Haavik, A G, Eowler, L R, & Griffiths, A. D. E. (1962). Studies on the Electron Transfer System XLII. Reconstitution of the electron transfer system*. *Journal of Biological Chemistry*, 237(8), 2661–2669. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)73804-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)73804-6)
- He, J., Ford, H. C., Carroll, J., Douglas, C., Gonzales, E., Ding, S., Fearnley, I. M., & Walker, J. E. (2018). Assembly of the membrane domain of ATP synthase in human mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(12), 2988–2993. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722086115>
- Hernansanz-Agustín, P., & Enríquez, J. A. (2023). Alternative respiratory oxidases to study the animal electron transport chain. *Biochimica et Biophysica Acta. Bioenergetics*, 1864(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2022.148936>
- Hirata, T., Nakamura, N., Omote, H., Wada, Y., & Futai, M. (2000). Regulation and reversibility of vacuolar H(+)-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(1), 386–389. <https://doi.org/10.1074/JBC.275.1.386>
- Horvath, S. E., & Daum, G. (2013). Lipids of mitochondria. *Progress in Lipid Research* 52(4), 590–614. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.07.002>
- Huynen, M. A., Dandekar, T., & Bork, P. (1999). Variation and evolution of the citric-acid cycle: A genomic perspective. *Trends in Microbiology* 7(7) 281–291. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01539-5](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01539-5)
- Jain, R., Rivera, M. C., & Lake, J. A. (1999). Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), 3801–3806. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3801>
- Jayashankar, V., Mueller, I. A., & Rafelski, S. M. (2016). Shaping the multi-scale architecture of mitochondria. *Current Opinion in Cell Biology*, 38, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.02.006>
- Keeling, P. J., Burger, G., Durnford, D. G., Lang, B. F., Lee, R. W., Pearlman, R. E., Roger, A. J., & Gray, M. W. (2005). The tree of eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(12), 670–676. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.09.005>
- Keilin, D., & Hartree, E. F. (1947). Activity of the cytochrome system in heart muscle preparations. *The Biochemical Journal*, 41(4), 500–502. <https://doi.org/10.1042/BJ0410500>
- Kim, B. H., & Gadd, G. M. (2008). Bacterial physiology and metabolism. *Bacterial Physiology and Metabolism*, 1–529. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511790461>

- Krause, F., Reifschneider, N. H., Vocke, D., Seelert, H., Rexroth, S., & Dencher, N. A. (2004). “Respirasome”-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach. *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), 48369–48375. <https://doi.org/10.1074/jbc.m406085200>
- Ku, C., Nelson-Sathi, S., Roettger, M., Sousa, F. L., Lockhart, P. J., Bryant, D., Hazkani-Covo, E., McInerney, J. O., Landan, G., & Martin, W. F. (2015). Endosymbiotic origin and differential loss of eukaryotic genes. *Nature*, 524(7566), 427–432. <https://doi.org/10.1038/nature14963>
- Kühlbrandt, W. (2019). Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases. *Annual Review of Biochemistry*, 88(1), 515–549. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-110903>
- Kumar, S., Suleski, M., Craig, J. M., Kasprówicz, A. E., Sanderford, M., Li, M., Stecher, G., & Hedges, S. B. (2022). TimeTree 5: An Expanded Resource for Species Divergence Times. *Molecular Biology and Evolution*, 39(8), 1–6. <https://doi.org/10.1093/molbev/msac174>
- LaNoue, K. F., WaÅajtyś, bieta I., & Williamson, J. R. (1973). Regulation of Glutamate Metabolism and Interactions with the Citric Acid Cycle in Rat Heart Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 248, 7171–7183. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)43375-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)43375-9)
- Lauble, H., Kennedy, M. C., Beinert, H., & Stout, C. D. (1994). Crystal structures of aconitase with trans-aconitate and nitrocitrate bound. *Journal of Molecular Biology*, 237(4), 437–451. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1994.1246>
- Le, S. Q., & Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1307–1320. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>
- Lee, J. K., Belogradov, G. I., & Stroud, R. M. (2008). Crystal structure of bovine mitochondrial factor B at 0.96-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), 13379–13384. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805689105>
- Lott, M. T., Leipzig, J. N., Derbeneva, O., Michael Xie, H., Chalkia, D., Sarmady, M., Procaccio, V., & Wallace, D. C. (2013). mtDNA Variation and Analysis Using Mitomap and Mitomaster. *Current Protocols in Bioinformatics*, 44(123). <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0123s44>
- Ma, W. X., Li, C. Y., Tao, R., Wang, X. P., & Yan, L. J. (2020). Reductive Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction and Cardiomyopathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020(5136957), 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/5136957>
- Mandel, M., Moriyama, Y., Hulmes, J. D., Pan, Y. C. E., Nelson, H., & Nelson, N. (1988). cDNA sequence encoding the 16-kDa proteolipid of chromaffin granules implies gene duplication in the evolution of H⁺-ATPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(15), 5521–5524. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.15.5521>

- Margulis, L., & Chapman, M. J. (1998). Endosymbioses: Cyclical and permanent in evolution. *Trends in Microbiology*, 6(9), 342–345. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(98\)01325-0](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(98)01325-0)
- Marie Lapaille, Adelma Escobar-Ramírez, Herve´Degand, Denis Baurain, Elizabeth Rodríguez-Salinas, Nadine Coosemans, Marc Boutry, Diego Gonzalez-Halphen, Claire Remacle, and P. C. (2010). Atypical Subunit Composition of the Chlorophycean Mitochondrial F1FO-ATP Synthase and Role of Asa7 Protein in Stability and Oligomycin Resistance of the Enzyme. *Mol. Biol. Evol.*, 27(7), 1630–1644.
- Martijn, J., Vosseberg, J., Guy, L., Offre, P., & Ettema, T. J. G. (2018). Deep mitochondrial origin outside the sampled alphaproteobacteria. *Nature*, 557(7703), 101–105. <https://doi.org/10.1038/S41586-018-0059-5>
- Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J. M., & Nunnari, J. (2006). Mitochondrial Inner-Membrane Fusion and Crista Maintenance Requires the Dynamin-Related GTPase Mgm1. *Cell*, 127(2), 383–395. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.021>
- Mendoza-Hoffmann, F., Pérez-Oseguera, Á., Cevallos, M. Á., Zarco-Zavala, M., Ortega, R., Peña-Segura, C., Espinoza-Simón, E., Uribe-Carvajal, S., & García-Trejo, J. J. (2018). The Biological Role of the ζ Subunit as Unidirectional Inhibitor of the 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 ϵ , ζ , and IF1 Subunits of the F1FO-ATPase as Related to the Endosymbiotic Origin of Mitochondria. *Microorganisms*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071372>
- Mendoza-Hoffmann, F., Zarco-Zavala, M., Ortega, R., & García-Trejo, J. J. (2018). Control of rotation of the F1FO-ATP synthase nanomotor by an inhibitory α -helix from unfolded ϵ or intrinsically disordered ζ and IF1 proteins. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 50(5), 403–424. <https://doi.org/10.1007/s10863-018-9773-9>
- Mereschkowsky C. (1910). Theorie der zwei Plasmaarten als Grundlage der Symbiogenesis, einer neuen Lehre von der Entstehung der Organismen. *Biol. Centralbl*, 30, 278–288. 289–303; 321–347; 353–367.
- Merz, S., Hammermeister, M., Altmann, K., Dürr, M., & Westermann, B. (2007). Molecular machinery of mitochondrial dynamics in yeast. *Biological Chemistry*, 388(9), 917–926. <https://doi.org/10.1515/bc.2007.110>
- Meyerhof, O. (1927). Über die enzymatische Milchsäurebildung im Muskelextrakt. III. Mitteilung: die Milchsäurebildung aus den gärfähigen Hexosen. *Biochem. Zeit*, 183, 176–215.
- Meyerhof, O., & Beck, L. V. (1944). Triose phosphate isomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 156(1), 109–120. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)41680-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)41680-2)

- Mierke, C. T. (2020). *Cellular Mechanics and Biophysics*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-58532-7>
- Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S., & Garcia, J. J. (2005). Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: Novel F₀ bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(35), 12356–12358. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503893102>
- Mitchell, P. (1961). Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* *191*(4784), 144–148. <https://doi.org/10.1038/191144a0>
- Mitchell, P. (1975). The protonmotive Q cycle: A general formulation. *FEBS Letters*, *59*(2), 137–139. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(75\)80359-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80359-0)
- Morales-Ríos, E., De la Rosa-Morales, F., Mendoza-Hernández, G., Rodríguez-Zavala, J. S., Celis, H., Zarco-Zavala, M., & García-Trejo, J. J. (2010). A novel 11-kDa inhibitory subunit in the F₁F₀ ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related alpha-proteobacteria. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *24*(2), 599–608. <https://doi.org/10.1096/fj.09-137356>
- Muench, S. P., Trinick, J., & Harrison, M. A. (2011). Structural divergence of the rotary ATPases. *Quarterly Reviews of Biophysics*, *44*(3), 311–356. <https://doi.org/10.1017/S0033583510000338>
- Mühleip, A., Kock Flygaard, R., Ovciarikova, J., Lacombe, A., Fernandes, P., Sheiner, L., & Amunts, A. (2021). ATP synthase hexamer assemblies shape cristae of *Toxoplasma* mitochondria. *Nature Communications*, *12*(120), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20381-z>
- Mühleip, A. W., Dewar, C. E., Schnauffer, A., Kühlbrandt, W., & Davies, K. M. (2017). In situ structure of trypanosomal ATP synthase dimer reveals a unique arrangement of catalytic subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(5), 992–997. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612386114>
- Mühleip, A. W., Joos, F., Wigge, C., Frangakis, A. S., Kühlbrandt, W., & Davies, K. M. (2016). Helical arrays of U-shaped ATP synthase dimers form tubular cristae in ciliate mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(30), 8442–8447. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525430113>
- Müller, V., & Grüber, G. (2003). ATP synthases: Structure, function and evolution of unique energy converters. *Cellular and Molecular Life Sciences* *60*(3), 474–494.. <https://doi.org/10.1007/s000180300040>
- Muñoz-Gómez, S. A., Slamovits, C. H., Dacks, J. B., Baier, K. A., Spencer, K. D., & Wideman, J. G. (2015). Ancient Homology of the Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System Points to an Endosymbiotic Origin of Mitochondrial Cristae. *Current Biology*, *25*(11), 1489–1495. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.006>

- Muñoz-Gómez, S. A., Wideman, J. G., Roger, A. J., & Slamovits, C. H. (2017). The origin of mitochondrial cristae from alphaproteobacteria. *Molecular Biology and Evolution*, *34*(4), 943–956. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw298>
- 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. *Science* *364*(eaaw9128), 1–10. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9128>
- Nelson, D. L., Cox, M. M., & Lehninger, A. L. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry* (7th ed.). W. H. Freeman.
- Niu, Y., Moghimiyyar, S., Safaie, S., Yang, Y., Jonas, E. A., & Alavian, K. N. (2017). Phylogenetic Profiling of Mitochondrial Proteins and Integration Analysis of Bacterial Transcription Units Suggest Evolution of F1Fo ATP Synthase from Multiple Modules. *Journal of Molecular Evolution*, *85*(5–6), 219–233. <https://doi.org/10.1007/s00239-017-9819-3>
- Parnas, J. K., Ostern, P., & Mann, T. (1934). Über der Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. *Biochem. Zeit*, *272*, 64–70.
- Patrick Paumard, Jacques Vaillier, Bénédicte Couлары, Jacques Schaeffer, Vincent Soubannier, David M. Mueller, Daniel Brèthes, Jean-Paul di Rago, J. V. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *Biochemistry*, *41*, 10390–10396.
- Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brèthes, D., di Rago, J.-P., & Velours, J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *The EMBO Journal*, *21*(3), 221–230. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.221>
- Perham, R. N. (2003). Swinging Arms and Swinging Domains in Multifunctional Enzymes: Catalytic Machines for Multistep Reactions, *69*, 961–1004. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.961>
- Pinke, G., Zhou, L., & Sazanov, L. A. (2020). Cryo-EM structure of the entire mammalian F-type ATP synthase. *Nature Structural and Molecular Biology*, *27*, 1077–1085. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0503-8>
- Potter, S. C., Luciani, A., Eddy, S. R., Park, Y., Lopez, R., & Finn, R. D. (2018). HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W200–W204. <https://doi.org/10.1093/nar/gky448>
- Pullman, M. E., & Monroy, G. C. (1963). A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *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*, 3322–3329.

- Quintana-Cabrera, R., Mehrotra, A., Rigoni, G., & Soriano, M. E. (2018). Who and how in the regulation of mitochondrial cristae shape and function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 500(1), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.088>
- Racker, E. (1963). A mitochondrial factor conferring oligomycin sensitivity on soluble mitochondrial ATPase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 10(6), 435–439. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(63\)90375-9](https://doi.org/10.1016/0006-291x(63)90375-9)
- Regmi, S. G., Rolland, S. G., & Conradt, B. (2014). Age-dependent changes in mitochondrial morphology and volume are not predictors of lifespan. *Aging*, 6(2), 118–130. <https://doi.org/10.18632/aging.100639>
- Ris, H., & Plaut, W. (1962). Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of chlamydomonas. *Journal of Cell Biology*, 13(3), 383–391. <https://doi.org/10.1083/jcb.13.3.383>
- Robison, R. (1932). Hexosemonophosphoric esters: mannosemonophosphate. *The Biochemical Journal*, 26(6), 2191–2202. <https://doi.org/10.1042/BJ0262191>
- Rodríguez-Ezpeleta, N., Brinkmann, H., Burey, S. C., Roure, B., Burger, G., Löffelhardt, W., Bohnert, H. J., Philippe, H., & Lang, B. F. (2005). Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Current Biology*, 15(14), 1325–1330. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.06.040>
- Roger, A. J., Muñoz-Gómez, S. A., & Kamikawa, R. (2017). The Origin and Diversification of Mitochondria. *Current Biology*, 27(21), R1177–R1192. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.015>
- Röhrich, H., Schwartzmann, J., & Meyer, E. H. (2021). Complexome profiling reveals novel insights into the composition and assembly of the mitochondrial ATP synthase of *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1862(7), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2021.148425>
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. 1967. *Journal of Theoretical Biology*, 14(3), 225–274. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3)
- Schägger, H., Brandt, U., Gencic, S., & von Jagow, G. (1995). [7] Ubiquinol-cytochrome-c reductase from human and bovine mitochondria. *Methods in Enzymology*, 260(C), 82–96. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)60132-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)60132-5)
- Schagger, H., & Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, 19(8), 1777–1783. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1777>
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry*, 199(2), 223–231. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90094-A](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90094-A)
- Semenza G. (2012). *Stories of Success - Personal Recollections*. X (Semenza G, Ed.). Elsevier Science.

- Shaw, J. M., & Nunnari, J. (2002). Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends in Cell Biology*, *12*(4), 178–184. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02246-2](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02246-2)
- Spikes, T. E., Montgomery, M. G., & Walker, J. E. (2020). Structure of the dimeric ATP synthase from bovine mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(38), 23519–23526. <https://doi.org/10.1073/pnas.2013998117>
- Spikes, T. E., Montgomery, M. G., & Walker, J. E. (2021). Interface mobility between monomers in dimeric bovine ATP synthase participates in the ultrastructure of inner mitochondrial membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(8), 1–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021012118>
- Stairs, C. W., Leger, M. M., & Roger, A. J. (2015). Diversity and origins of anaerobic metabolism in mitochondria and related organelles. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1678). <https://doi.org/10.1098/RSTB.2014.0326>
- Stephan, T., Brüser, C., Deckers, M., Steyer, A. M., Balzarotti, F., Barbot, M., Behr, T. S., Heim, G., Hübner, W., Ilgen, P., Lange, F., Pacheu-Grau, D., Pape, J. K., Stoldt, S., Huser, T., Hell, S. W., Möbius, W., Rehling, P., Riedel, D., & Jakobs, S. (2020). MICOS assembly controls mitochondrial inner membrane remodeling and crista junction redistribution to mediate cristae formation. *The EMBO Journal*, *39*(14), 1–24. <https://doi.org/10.15252/emboj.2019104105>
- 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>
- Strauss, M., Hofhaus, G., Schröder, R. R., & Kühlbrandt, W. (2008). Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO Journal*, *27*(7), 1154–1160. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.35>
- Van Der Blik, A. M., Sedensky, M. M., & Morgan, P. G. (2017). Cell biology of the mitochondrion. *Genetics*, *207*(3), 843–871. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300262>
- Vasanthakumar, T., & Rubinstein, J. L. (2020). Structure and Roles of V-type ATPases. *Trends in Biochemical Sciences*, *45*(4), 295–307. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2019.12.007>
- Vázquez-Acevedo, M., Cardol, P., Cano-Estrada, A., Lapaille, M., Remacle, C., & González-Halphen, D. (2006). The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *38*(5–6), 271–282. <https://doi.org/10.1007/s10863-006-9046-x>
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2016). *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level* (Fifth). Wiley.

- Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W., & Reichert, A. S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *Journal of Cell Biology*, *175*(2), 237–247. <https://doi.org/10.1083/JCB.200605138>
- Wagner, K., Perschil, I., Fichter, C. D., & van der Laan, M. (2010). Stepwise assembly of dimeric F(1)F(o)-ATP synthase in mitochondria involves the small F(o)-subunits k and i. *Molecular Biology of the Cell*, *21*(9), 1494–1504. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-12-1023>
- Wagner, K., Rehling, P., Sanjuán Szklarz, L. K., Taylor, R. D., Pfanner, N., & van der Laan, M. (2009). Mitochondrial F1Fo-ATP Synthase: The Small Subunits e and g Associate with Monomeric Complexes to Trigger Dimerization. *Journal of Molecular Biology*, *392*(4), 855–861. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.07.059>
- Walker, J. E. (2013). The ATP synthase: The understood, the uncertain and the unknown. *Biochemical Society Transactions*, *41*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1042/BST20110773>
- Walker, J. E., Lutter, R., Dupuis, A., & Runswick, M. J. (1991). Identification of the subunits of F1F0-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochemistry*, *30*(22), 5369–5378. <https://doi.org/10.1021/BI00236A007>
- Warburg, O., & Walter, C. (1939). Isolierung und kristallisation des gärungsferments enolase. *Biochem. Zeit*, *303*, 40–68.
- Whelan, S., Liò, P., & Goldman, N. (2001). Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. *Trends in Genetics: TIG*, *17*(5), 262–272. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02272-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02272-7)
- Wiedemann, N., Frazier, A. E., & Pfanner, N. (2004). The Protein Import Machinery of Mitochondria. In *Journal of Biological Chemistry* *279*(15), 14473–14476. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400003200>
- Wiegand, G., & Remington, S. J. (1986). Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, *15*, 97–117. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.15.060186.000525>
- Wirth, C., Brandt, U., Hunte, C., & Zickermann, V. (2016). Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1857*(7), 902–914. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.013>
- Wittig, I., Velours, J., Stuart, R., & Schägger, H. (2008). Characterization of domain interfaces in monomeric and dimeric ATP synthase. *Molecular and Cellular Proteomics*, *7*(5), 995–1004. <https://doi.org/10.1074/mcp.m700465-mcp200>
- Wolodko, W. T., Fraser, M. E., James, M. N. G., & Bridger, W. A. (1994). The crystal structure of succinyl-CoA synthetase from *Escherichia coli* at 2.5-Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(14), 10883–10890. <https://doi.org/10.2210/pdb1scu/pdb>
- Wurm, C. A., & Jakobs, S. (2006). Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. *FEBS Letters*, *580*(24), 5628–5634. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.012>

- Yadav, K. N. S., Miranda-Astudillo, H. V., Colina-Tenorio, L., Bouillenne, F., Degand, H., Morsomme, P., González-Halphen, D., Boekema, E. J., & Cardol, P. (2017). Atypical composition and structure of the mitochondrial dimeric ATP synthase from *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1858(4), 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.01.007>
- Zancani, M., Braidot, E., Filippi, A., & Lippe, G. (2020). Structural and functional properties of plant mitochondrial F-ATP synthase. *Mitochondrion* 53, 178–193. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.06.001>
- Zarco-Zavala, M., Morales-Ríos, E., Mendoza-Hernández, G., Ramírez-Silva, L., Pérez-Hernández, G., & García-Trejo, J. J. (2014). The ζ subunit of the F1FO-ATP synthase of α -proteobacteria controls rotation of the nanomotor with a different structure. *FASEB Journal*, 28(5), 2146–2157. <https://doi.org/10.1096/FJ.13-241430>
- Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E. F., Saw, J. H., Bäckström, Di., Juzokaite, L., Vancaester, E., Seitz, K. W., Anantharaman, K., Starnawski, P., Kjeldsen, K. U., Stott, M. B., Nunoura, T., Banfield, J. F., Schramm, A., Baker, B. J., Spang, A., & Ettema, T. J. G. (2017). Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*, 541(7637), 353–358. <https://doi.org/10.1038/nature21031>
- Zhang, J., Myerst, M., & Forgacq, M. (1992). Characterization of the Vo Domain of the Coated Vesicle (H⁺)-ATPase*. *The journal*, 8(14), 9773–9778. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50159-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50159-4)
- Zick, M., Rabl, R., & Reichert, A. S. (2009). Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1793(1), 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.06.013>
- Zíková, A., Schnauffer, A., Dalley, R. A., Panigrahi, A. K., & Stuart, K. D. (2009). The F0F1-ATP Synthase Complex Contains Novel Subunits and Is Essential for Procyclic *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathogens*, 5(5), e1000436. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000436>
- 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 (Moscow)* 85(12–13), 1613–1630. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3)