

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**“Estudios estructurales de ATP sintasa de *Paracoccus  
denitrificans*”**

**Tesis que presenta**

**I.B.Q. SERGIO AARON TINAJERO VARGAS**

Para Obtener el Grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

En la Especialidad de  
BIOQUÍMICA

Director de la Tesis:  
Dr. Edgar Morales Ríos

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CINVESTAV, al Departamento de Bioquímica y al Colegio de Profesores, por permitirme desarrollar mis estudios de Posgrado, por el apoyo brindado y los conocimientos adquiridos a lo largo de este proceso.

A SEP-CONACYT por el fondo y beca otorgado para el desarrollo de este proyecto.

A SEP-CINVESTAV por el financiamiento conferido para el desarrollo del proyecto.

Al Instituto de Bebidas de la Industria Mexicana Coca-Cola por el premio económico brindado para financiar el presente proyecto.

A los Drs. Carlos Gómez Lojero, Jaime Ortega López y Ricardo Mondragón Flores por el apoyo brindado en sus respectivos laboratorios para desarrollar algunos de los experimentos propuestos en este trabajo.

A cada uno de los doctores pertenecientes al departamento de bioquímica del Cinvestav por su noble e increíble labor como docentes en las diferentes asignaturas impartidas.

Al Dr. Diego Gonzales Halphen por admitirme como alumno en su clase de Biología de proteínas membranales impartida en el Instituto de Fisiología de la UNAM, así como por su gran apoyo en la suministración de algunos reactivos utilizados.

Al Dr. Edgar Morales Ríos por admitirme desde mi servicio social en su laboratorio y permitirme adentrarme en el increíble mundo de la biología estructural, así como por su incesante ayuda y motivación en la realización de este fascinante proyecto. Proyecto que fue un orgullo poder desarrollar dada la fascinante historia que involucra la dilucidación de la estructura de una de las proteínas más representativas en el campo de la bioquímica.

A mis compañeros de laboratorio Jessica, Dan, Saúl y Daniela por el apoyo incondicional y los amables consejos brindados desde mi ingreso al laboratorio en el año 2018 y aún en estos días.

A mis compañeros y amigos de generación Rodrigo Contreras, Karla Hernández y Manuel del Porte por su amistad y apoyo brindados a lo largo de esta travesía.

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>2</b>
<b>INDICE</b> .....	<b>3</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>I. INTRODUCCION</b> .....	<b>9</b>
1.1 <i>Paracoccus denitrificans</i> .....	9
1.2 Proceso de desnitrificación por <i>P. denitrificans</i> .....	12
1.3 Cadena respiratoria de <i>P. denitrificans</i> .....	14
1.4 Oxidasas alternativas presentes en <i>P. denitrificans</i> .....	21
1.5 La ATP sintasa .....	23
1.5.1 Arquitectura general de la ATP sintasa.....	24
1.5.2 Modelo de translocación de protones y síntesis de ATP.....	29
1.6 Inhibidores de ATP sintasa/ATPasa.....	33
1.6.1 Inhibidores peptídicos helicoidales .....	34
1.6.2 Inhibidores de policétidos .....	36
1.6.3 Inhibidores catiónicos .....	37
1.6.4 Modificadores de aminoácidos .....	38
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	<b>40</b>
<b>III. JUSTIFICACION</b> .....	<b>50</b>
<b>IV. HIPOTESIS</b> .....	<b>50</b>
<b>V. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>51</b>
5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	51
<b>VI. MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>52</b>
6.1 Cultivo de <i>Paracoccus denitrificans</i> cepa PD1222 .....	52
6.1.1 Determinación de medio de cultivo.....	52
6.1.2 Cultivo de <i>P. denitrificans</i> en incubadora.....	52
6.1.3 Cultivo de <i>P. denitrificans</i> en biorreactor .....	52
6.2 Determinación de las condiciones de lisis enzimática por Tinción de Gram .....	53
6.3 Determinación de proteína.....	53
6.3.1 Determinación de proteína por método de Bradford .....	53
6.3.2 Determinación de proteína por método de Bradford modificado .....	54
6.4 Geles desnaturalizantes SDS-Page .....	54
6.5 Geles azules nativos de 1D (BN-Page).....	55
6.6 Geles desnaturalizantes de 2D .....	55
6.7 Aislamiento de vesículas invertidas de <i>P. denitrificans</i> .....	56
6.8 Solubilización de membranas aisladas .....	56
6.9 Purificación de F <sub>1</sub> F <sub>o</sub> -ATP sintasa por cromatografía de Intercambio Aniónico.....	57
6.10 Purificación de F <sub>1</sub> F <sub>o</sub> -ATP sintasa por cromatografía de Exclusión Molecular .....	58
6.11 Determinación de actividad de ATPasa <i>in vitro</i> .....	58
6.12 Determinación de actividad de ATPasa <i>in gel</i> .....	59
6.13 Visualización estructural de F <sub>1</sub> F <sub>o</sub> -ATP sintasa por ME de transmisión .....	59
6.14 Cristalización de F <sub>1</sub> F <sub>o</sub> -ATP sintasa de <i>P. denitrificans</i> .....	59

6.15 Análisis estructural mediante Crio-ME .....	60
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
7.1 Determinación de condiciones para cultivo de <i>P. denitrificans</i> .....	61
7.1.1 Selección de medio de cultivo para crecimiento de <i>P. denitrificans</i> .....	61
7.1.2 Cultivo y cinética de crecimiento de <i>P. denitrificans</i> .....	62
7.2 Determinación de condiciones óptimas para aislamiento de VI.....	65
7.3 Determinación de la concentración optima de detergente para solubilización.....	68
7.4 Identificación de las subunidades de F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPasa mediante geles de 2D.....	69
7.5 Purificación de F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPasa de <i>P. denitrificans</i> .....	71
7.5.1 Purificación de <i>P. denitrificans</i> mediante cromatografía de intercambio aniónico .....	71
7.5.2 Purificación de <i>P. denitrificans</i> mediante cromatografía de exclusión molecular.....	73
7.6 Verificación de la integridad estructural y funcional de F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPasa de <i>P. denitrificans</i> .	76
7.6.1 Cuantificación de la actividad enzimática de F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPasa .....	76
7.6.2 Evaluación de la integridad funcional de F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPasa .....	77
7.6.3 Evaluación de la integridad estructural de F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPasa.....	78
7.7 Cristalización de F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPasa de <i>P. denitrificans</i> .....	80
<b>VIII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>82</b>
8.1 Determinación de condiciones para crecimiento y cultivo de <i>P. denitrificans</i> .....	82
8.2 Determinación de condiciones óptimas para aislamiento de VI.....	83
8.3 Determinación de concentración optima de detergente para solubilización.....	84
8.4 Identificación de las subunidades de F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPasa mediante geles de 2D.....	86
8.5 Purificación de F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPasa de <i>P. denitrificans</i> .....	86
8.6 Verificación de la integridad estructural y funcional de la F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPasa.....	89
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>92</b>
<b>X. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>93</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>94</b>

## ABREVIATURAS

$\Delta\mu$  – Fuerza proto-motriz

Å – Amstrongs, unidad de distancia

ADP – Adenosín difosfato

ATP – Adenosín trifosfato

ATPh – Moléculas de Adenosín trifosfato hidrolizado

Bis-Tris – 2-bis(2-hidroxietil) amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol

BN-PAGE – Electroforesis azul nativa en geles de poliacrilamida

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

Crio-ME – Criomicroscopia electrónica

CTE – Cadena transportadora de electrones

DCCD – dicitlohexilcarbodiimida

DOC – Desoxicolato de sodio

e<sup>-</sup> - Electrón, electrones

EDTA – Ácido Etileno-amino-tetracético

FADH<sub>2</sub> – Flavín adenín dinucleótido reducido

FMN – Flavín mononucleótido

H<sup>+</sup> - Protón, protones

H<sub>2</sub>O - Agua

KDa – Kilodaltones

LDAO – Oxido de Dimetil-dodecil amina

Mb<sub>s</sub> – Membranas de *Paracoccus denitrificans* solubilizadas con detergente

M<sub>r</sub> – Peso molecular aparente

mUA – mili unidades de absorbancia (280nm)

N<sub>2</sub> – Nitrógeno elemental (gaseoso)

NADH – Nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NAD<sup>+</sup> - Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado

NCCD - *N*-(2,2,6,6-tetrametilpeperidil-1-oxil)-*N*-(ciclohexil) carbodiimida

NH<sub>3</sub> – Amoniac

NO<sup>-</sup> - Óxido nitroso

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - Nitrito, nitritos

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - Nitrato, nitratos

O<sub>2</sub> – Oxígeno molecular (gaseoso)

PEP – Fosfoenolpiruvato

Pi – Fosfato inorgánico

PSA – Persulfato de amonio

SBP – Partículas Subbacterianas

SDS-PAGE - Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida

TCA – Ácido tricloroacético

TEMED – N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamina

UQ – Ubiquinona

UQH<sub>2</sub> – Ubiquinol

VC – Volumen de columna, medida de volumen

VI – Vesículas invertidas de *Paracoccus denitrificans*

## RESUMEN

El estudio y caracterización bioquímica previa de *P. denitrificans* permitió el establecimiento de las condiciones de cultivo óptimo para su crecimiento bajo los parámetros establecidos en el laboratorio. Con el desarrollo de una cinética de crecimiento se logró determinar el tiempo estimado de las fases *lag* y *log* del proceso. Se registro un valor de OD =  $2.174 \pm 0.157$  al final del desarrollo de la cinética, obteniéndose una biomasa aproximada de 8.023g/L. También, determinamos la concentración optima del detergente DDM/UDM a utilizar para la solubilización de las membranas con el propósito principal de obtener la mayor cantidad de ATP sintasa con sus correspondientes lípidos asociados. Se obtuvo como relación optima de solubilización a 0.50 mg DDM/mg Prot. Verificamos el contenido de F-ATPasa obtenida mediante el análisis en geles de 2D para demostrar la eficiencia del procedimiento.

El proceso de purificación del complejo enzimático se llevó a cabo en dos procesos de cromatografía, posteriores al proceso para la obtención de las membranas solubilizadas. La primera etapa consistió en una cromatografía combinada de afinidad e intercambio iónico en tándem, implementando un gradiente creciente de NaCl para la elución. Identificamos la elución de la F-ATPasa en dos picos consecutivos de un gradiente discontinuo de NaCl con registros de mUA bastante similares. Al final del primer paso de cromatografía se obtuvo un rendimiento global de 25 mg de proteína por cada 100g de células (peso húmedo). El segundo paso de purificación involucró una cromatografía de exclusión molecular con el que se obtuvo un grado de pureza mayor al 95%, el cual fue demostrado al observar solo las bandas pertenecientes a las 8 subunidades constituyentes del complejo enzimático, llegándose inclusive a visualizar a la proteína inhibidora  $\zeta$  de 11 kDa. Todos los pasos de aislamiento y purificación fueron monitoreados y analizados mediante el análisis de geles nativos y desnaturalizantes, así como ensayos de actividad enzimática *in vitro* e *in gel*.

Las actividades específicas de ATPasa determinadas demostraron la eficiencia del proceso completo de purificación, al registrarse un aumento en los valores de actividad del complejo F-ATPasa. Se registró un valor de 0.39  $\mu\text{mol ATP}/\text{mg}/\text{min}$  en pruebas realizadas con vesículas invertidas. Estos valores se vieron aumentados ~3.2 veces en las muestras obtenidas en el último paso de purificación. El rendimiento total de proteína obtenida fue de aproximadamente 200  $\mu\text{g}$  de F-ATPasa por cada 100g de biomasa cosechada (peso húmedo). La integridad estructural y funcional de la proteína se comprobó mediante un gel de actividad de ATPasa, así como por su identificación por microscopía electrónica de transmisión. El grado de pureza e integridad estructural alcanzado en las muestras purificadas demuestran ser aptas para ser utilizadas en técnicas de cristalización y Crio-ME en aras de resolver su estructura a alta resolución. Ensayos preliminares de cristalización con muestras tratadas con DDM evidenciaron el efecto negativo que tiene este detergente en el proceso, ya que no se logró observar la formación de ningún cristal. Continuaremos con el proceso de optimización de la cristalización para lograr la obtención de cristales de F-ATPasa óptimos.

## ABSTRACT

The previous study and biochemical characterization of *P. denitrificans* allowed the establishment of optimal culture conditions for its growth under the parameters established in the laboratory. With the development of a growth kinetics it was possible to determine the estimated time of the lag and log phases of the process. A value of  $OD = 2.174 \pm 0.157$  was registered at the end of the development of the kinetics, obtaining an approximate biomass of 8.023g/L. Also, we determined the optimal concentration of the DDM/UDM detergent to be used for the solubilization of the membranes with the main purpose of obtaining the highest amount of ATP synthase with its corresponding associated lipids. The optimum solubilization ratio was obtained at 0.50 mg DDM/mg Prot. We verified the F-ATPase content obtained through analysis in 2D gels to demonstrate the efficiency of the procedure.

The purification process of the enzyme complex was carried out in two chromatography processes, after the process to obtain the solubilized membranes. The first stage consisted of a combined affinity and ion exchange chromatography in tandem, implementing an increasing NaCl gradient for elution. We identified the elution of the F-ATPase in two consecutive peaks of a discontinuous NaCl gradient with fairly similar mUA records. At the end of the first chromatography step, an overall yield of 25 mg of protein per 100g of cells (wet weight) was obtained. The second step of purification involved molecular exclusion chromatography with which a degree of purity greater than 95% was obtained, which was demonstrated by observing only the bands belonging to the 8 subunits that make up the enzymatic complex, even visualizing the 11 kDa inhibitory protein  $\zeta$ . All the isolation and purification steps were monitored and analyzed through the analysis of native gels and denaturants, as well as in vitro and in gel enzymatic activity assays.

The specific ATPase activities identified demonstrated the efficiency of the entire purification process, with an increase in the activity values of the F-ATPase complex. A value of 0.39  $\mu\text{mol ATP}/\text{mg}/\text{min}$  was recorded in tests performed with inverted vesicles. These values were increased  $\sim 3.2$  times in samples obtained in the last purification step. The total protein yield obtained was approximately 200  $\mu\text{g}$  F-ATPase per 100g of biomass harvested (wet weight). The structural and functional integrity of the protein was checked by an ATPase activity gel, as well as by transmission electron microscopy identification. The degree of purity and structural integrity achieved in the purified samples proved to be appropriate for use in crystallization and cryo-EM techniques in order to resolve its structure at high resolution. Preliminary crystallization tests with samples treated with DDM showed the negative effect that this detergent has on the process, since no crystal formation was observed. We will continue with the crystallization optimization process in order to obtain optimal F-ATPase crystals.

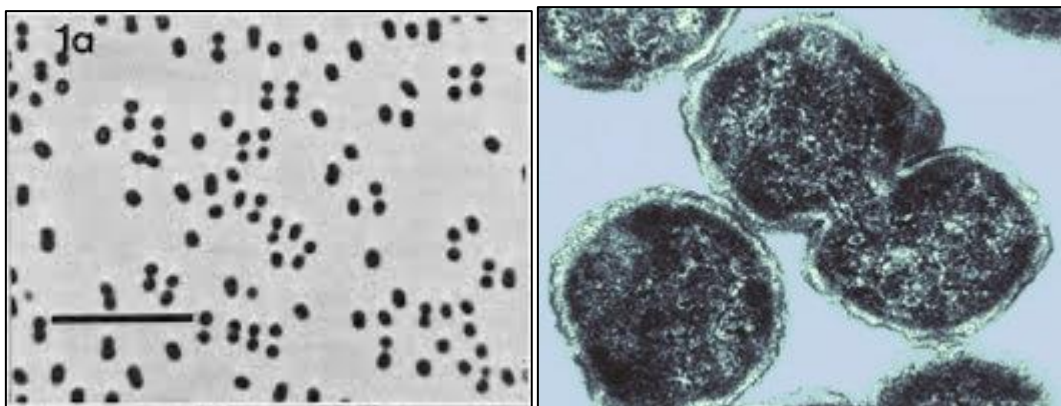


## I. INTRODUCCION

### 1.1 *Paracoccus denitrificans*

*Paracoccus denitrificans* es un microorganismo Gram negativo (G-) de morfología microscópica cocoide carente de motilidad y clasificado taxonómicamente dentro de la clase Alfa proteobacteria, familia Rhodobacteraceae y genero Paracoccus (Figura 1). Esta bacteria fue aislada del suelo por primera vez en 1910 por M. Beijerinck bajo el nombre de *Micrococcus denitrificans* (Beijerinck, 1910), y renombrado con el nombre actual por Davis en 1969 (Davis, 1969). Además, se sabe que esta bacteria es capaz de utilizar una amplia variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos para su crecimiento dentro los que se encuentran el metanol, metilamina, acetona, dimetilformamida, tiocinato e inclusive disulfuro de carbono (Baker y col., 1998).

Dada la estupenda capacidad de degradación de distintos compuestos contaminantes en efluentes se ha propuesto y utilizado a *P. denitrificans* como un microorganismo biorremediador en conjunto con algunos otros microorganismos como *Nitrosomonas europea* (Uemoto, 1996). Recientemente se ha logrado utilizar una nueva cepa denominada ISTOD1 aislada de aguas residuales en la india para optimizar el tratamiento de un lote de agua contaminada al disminuir las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NH}_3$ , demostrando con ello la estupenda versatilidad de este microorganismo (Medhi y Gupta, 2019).



**Figura 1.** Micrográficas en microscopio de campo claro y electrónico de una muestra de *P. denitrificans*. La barra denota una distancia de 10  $\mu\text{m}$ .

*P. denitrificans* puede crecer autotróficamente con hidrógeno y dióxido de carbono o de forma heterotrófica con una amplia variedad de compuestos de carbono. Puede crecer aeróbicamente o puede adaptarse para crecer anaeróbicamente si los iones  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  o  $\text{NO}^-$  están disponibles como receptores finales de electrones (Kluyver, 1956). Es también conocido que este microorganismo en ausencia de una fuente orgánica de carbono puede usar hidrógeno como componente reductor, así como fijar al  $\text{CO}_2$  mediante el ciclo reductor de las pentosas fosfato (Kornberg, 1960).

Ensayos enzimáticos con extractos celulares de *P. denitrificans* revelaron las rutas metabólicas principales por las cuales el microorganismo puede obtener la energía necesaria dependiendo de la fuente de carbono que se encuentre en el medio. La glucosa puede metabolizarse a través de la vía Entner-Duodoroff y/o por la vía de las hexosas monofosfato, mientras que en experimentos complementarios se demostró la ausencia de la vía glucolítica explicando con ello la nula capacidad fermentativa del microorganismo al no poder utilizar compuestos orgánicos como aceptores finales de electrones (Slabas, 1974). El piruvato, malato y succinato se oxidan hasta  $\text{CO}_2$  mediante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos que se ha demostrado funciona perfectamente en esta bacteria (Slabas, 1977).

De la misma manera, se ha observado que *P. denitrificans* puede considerarse también como un microorganismo quimiolitótrofo ya que puede utilizar distintas fuentes de energía inorgánica para su crecimiento. Este organismo ha sido estudiado por su capacidad de transformar compuestos derivados del azufre por mecanismos bioquímicos que, a la fecha, no se han logrado caracterizar adecuadamente. La plasticidad metabólica de esta bacteria se refleja en la flexibilidad inherente de los mecanismos reguladores de las distintas rutas posibles que actualmente solo se entienden parcialmente (Jhon, 1977).

Dentro de la clase de las  $\alpha$ -proteobacterias se ha estudiado minuciosamente también a *P. denitrificans* para intentar demostrar la cercanía evolutiva entre este tipo de bacterias y las mitocondrias que conocemos en la actualidad. Ensayos bioquímicos, estructurales y filogenéticos apoyan la teoría endosimbiótica propuesta por Lynn Margullis (1970), la cual propone como origen de las mitocondrias, la asimilación de

un protoendosimbionte aerobio por una bacteria fermentativa o un ameboide carente de plastidios. Algunos de los preceptos establecidos por esta misma teoría implican que la membrana externa de la mitocondria se deriva de la membrana plasmática del protoeucarionte, en tanto que la membrana mitocondrial interna y las crestas provienen de la membrana plasmática de la bacteria asimilada. A partir del proceso de asimilación que se habría llevado a cabo a lo largo de un extenso periodo de tiempo, la hipótesis establece que la proteobacteria habría sufrido una pérdida progresiva de su autonomía, la proliferación habría seguido el ritmo de la división celular de su huésped y varias de sus capacidades biosintéticas habrían sido perdidas o adoptadas por la célula hospedera (Jhon, 1975). Es debido a lo antes expuesto que se piensa que el protoeucarionte establecido a partir de la simbiosis asimilo con gran eficiencia la maquinaria bioquímica de la proteobacteria para satisfacer sus requerimientos energéticos en forma de ATP.

Algunas de las pruebas bioquímicas que avalan a la teoría endosimbiótica anteriormente descrita, son las características mitocondriales que posee *P. denitrificans*, entre las cuales se encuentran la presencia de los cuatro complejos que constituyen a la cadena respiratoria mitocondrial a diferencia de algunas eubacterias como *Escherichia coli* que carecen del complejo citocromo oxidasa (IV). Del mismo modo se ha corroborado que la cadena respiratoria de *P. denitrificans* es susceptible a varios inhibidores y desacoplantes de la cadena respiratoria mitocondrial, como son: antimicina A, rotenona, venturicidina y oligomicina (Jhon, 1977).

El genoma de *P. denitrificans* PD1222 consta de dos cromosomas circulares y un plásmido de gran longitud denominado megaplásmido. El primer cromosoma tiene 2 852 282 pares de bases en el cual se encuentran codificadas 2767 proteínas, mientras que el segundo cromosoma que se encuentra conformado por 1 730 097 pares de bases del cual logran transcribirse y traducirse hasta 1656 proteínas. Finalmente, el megaplásmido consta de 653 815 pares de bases y en él se codifican hasta 616 proteínas dentro de las cuales se encuentran algunas de vital importancia para llevar a cabo el metabolismo característico del microorganismo como son las ya nombradas capacidades desnitrificantes (Copeland y col., 2006).

## 1.2 Proceso de desnitrificación por *P. denitrificans*

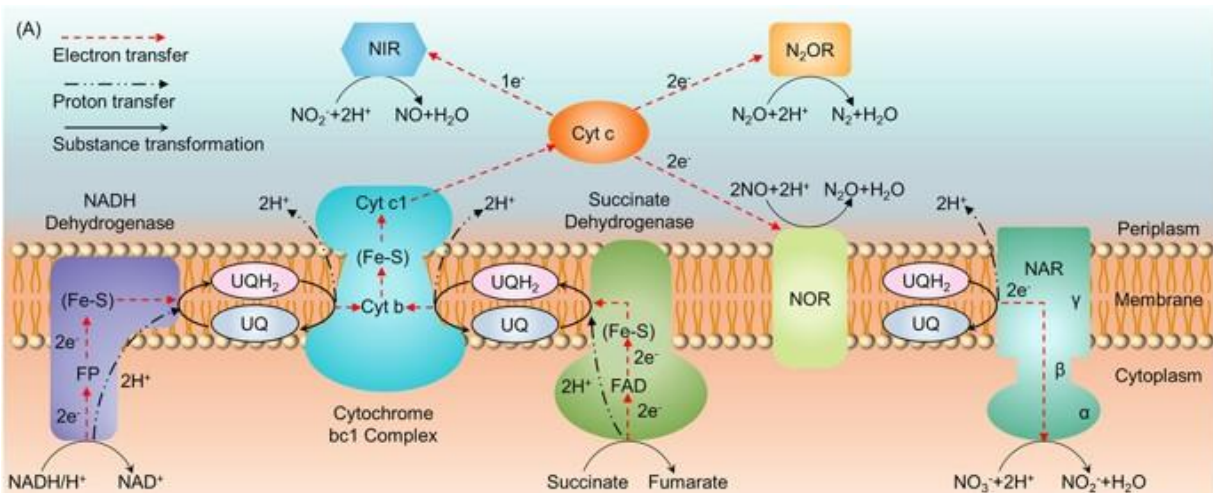
Dada la incapacidad fermentativa de *P. denitrificans*, el crecimiento anaeróbico es estrictamente dependiente de la presencia de compuestos inorgánicos como el  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  u  $\text{NO}^-$ , los cuales son convertidos hasta  $\text{N}_2$  a través de una serie de reducciones llevadas a cabo por una cadena respiratoria adaptativa del microorganismo (Kluyver, 1956). Del mismo modo, se ha demostrado en cultivos con una aeración adecuada la incapacidad de la bacteria para utilizar al  $\text{NO}_3^-$  como aceptor final de electrones. Ya que la cadena respiratoria de las nitrato reductasas es reprimida sustancialmente por la presencia de  $\text{O}_2$  en el medio. Sin embargo, se ha logrado observar también que la cepa es capaz de utilizar  $\text{O}_2$  como aceptor final de electrones en condiciones anaeróbicas dada la naturaleza constitutiva de los complejos respiratorios que utilizan al  $\text{O}_2$  con mayor afinidad (Fewson, 1961).

La desnitrificación como ya se ha mencionado es un proceso de respiración alternativo que es llevado a cabo por *P. denitrificans* bajo condiciones anaeróbicas. La cadena respiratoria que desarrollo el proceso se compone y complementa con los complejos NADH y succinato deshidrogenasas pertenecientes a la cadena transportadora de electrones que utilizan al  $\text{O}_2$  como aceptor final de electrones. Uno de los componentes más importantes en el mecanismo bioquímico desnitrificante es el sistema ubiquinona/ubiquinol, ya que es el principal proveedor electrónico de la cadena nitrato reductora (Figura 2). La reducción de la UQ a  $\text{UQH}_2$  es llevada a cabo gracias a la conducción de electrones procedentes del potencial reductor (NADH o succinato) derivado del metabolismo celular (Strohm, 2007).

Obtenido el potencial reductor necesario, el  $\text{UQH}_2$  es oxidado a UQ al ceder su par electrónico a la primera enzima de la cadena, es decir, la  $\text{NO}_3^-$  reductasa (NAR) que se encuentra unida a la membrana. En el proceso de oxidación del  $\text{QH}_2$  se transportan  $2\text{H}^+$  hacia el periplasma mediado por la misma reductasa, estableciéndose una estequiometría de  $2\text{H}^+/2\text{e}^-$ . Derivado de este proceso se logra presentar una fuerza protón motriz a través de la membrana. Ya que el sitio activo de la enzima donde se lleva a cabo la reducción del  $\text{NO}_3^-$  se aloja en la región citoplasmática, se requiere un sistema de transporte de  $\text{NO}_3^-$  el cual se cree es desarrollado por un antiportador

denominado NarK que logra transportar hacia el periplasma una molécula de  $\text{NO}_2^-$  para completar el transporte hacia el citoplasma del  $\text{NO}_3^-$  requerido para el comenzar la respiración; proceso de cotransporte que cabe mencionar, no disipa la fuerza protón motriz generada debido a la naturaleza de las cargas transportadas (Rob, 2007).

Habiendo llevado a cabo el cotransporte del  $\text{NO}_2^-$  es habilitada su utilización por la enzima  $\text{NO}_2^-$  reductasa (NIR) que fue caracterizada como un citocromo tipo  $cd_1$ ; caracterizándose como una proteína liposoluble que se aloja en la región periplásmica. La transferencia electrónica para llevar a cabo el proceso de reducción del  $\text{NO}_2^-$  hasta  $\text{NO}^-$  es realizado por el citocromo c550 o una proteína llamada pseudoazurina. Estas dos proteínas hidrosolubles se reducen mediante un complejo membranar denominado citocromo  $bc_1$ , complejo que a su vez es reducido por el  $\text{QH}_2$ . La enzima encargada de llevar a cabo el penúltimo paso de desnitrificación es la  $\text{NO}^-$  reductasa (NOR), la cual es una proteína integral de membrana con el sitio activo dispuesto hacia el lado periplásmico. El proceso de oxido reducción es producido por la transferencia de un par electrónico procedente de una molécula de citocromo c550 reducida por la enzima NOR. El último paso de la ruta desnitrificante de *P. denitrificans* para producir finalmente el  $\text{N}_2$  es catalizada por la enzima  $\text{N}_2\text{O}$  reductasa ( $\text{N}_2\text{OR}$ ), otra enzima periplásmica que utiliza nuevamente a la pseudoazurina o al citocromo c550 como donadores de electrones (Rob, 2007).



**Figura 2.** Esquema del proceso bioquímico de desnitrificación llevado a cabo por *P. denitrificans*. Tomado de Rob, 2007.

### 1.3 Cadena respiratoria de *P. denitrificans*

La cadena transportadora de electrones (CTE) constitutiva de *P. denitrificans* posee una gran similitud con la CTE mitocondrial, ya que puede utilizar componentes reductores procedentes de las distintas rutas metabólicas (NADH, FADH<sub>2</sub>) para llevar a cabo la fosforilación oxidativa, proceso biológico por el cual la bacteria utiliza a la fuerza protón-motriz ( $\Delta\mu$ ) establecida para producir ATP (Walker, 1977). La generación de la  $\Delta\mu$  es desarrollada por los complejos respiratorios que llevan a cabo los procesos de transporte electrónico y translocación de protones. La movilización de los protones a la región periplásmica promueve un ligero aumento en la concentración de partículas cargadas positivamente, resultando en la generación de una diferencia de carga en la membrana de aproximadamente -200 mV. El establecimiento de esta diferencia de carga también resulta en la formación de un gradiente electroquímico ( $\Delta\phi$ ), el cual en conjunto con el gradiente de concentración de protones ( $\Delta\text{pH}$ ) componen a la fuerza impulsora para la síntesis de ATP, función llevada a cabo por la ATP sintasa al movilizar a los protones de regreso al citoplasma (Stryer, 2013).

La razón por la cual la  $\alpha$ -proteobacteria es capaz de utilizar NADH y FADH<sub>2</sub> como donadores de electrones de alto potencial es debido a la presencia de los cuatro complejos respiratorios que se localizan del mismo modo en la membrana interna de las mitocondrias, aunque en una versión más simplificada de sus cadenas polipeptídicas. Los cuatro complejos respiratorios denominados propiamente como NADH-Q oxidorreductasa (complejo I), Succinato-Q oxidorreductasa (complejo II), Q-citocromo c oxidorreductasa (complejo III) y citocromo c oxidasa (complejo IV) se encuentran embebidos en la membrana plasmática de la bacteria y sus regiones catalíticas están situadas en el lado citoplasmático (Stryer, 2013).

Los complejos I, III y IV de *P. denitrificans* poseen un número sustancialmente menor de subunidades (14, 3 y 4, respectivamente) a comparación de las subunidades de los complejos respiratorios observados en las mitocondrias de bovino (46, 11 y 13), lo que ha facilitado el análisis estructural y funcional de cada uno de ellos. Bajo esta premisa diversos grupos de investigación han logrado aislar, purificar y caracterizar a los cuatro complejos respiratorios de *P. denitrificans* para determinar su composición estructural

y mecanismo de funcionamiento (Yagi, 1986; Pennoyer, 1988; Berry, 1985; Ludwig, 1980). En experimentos complementarios de caracterización de la cadena respiratoria se consiguió observar la asociación de los complejos I, III y IV en un supercomplejo denominado “respirosoma” con una estequiometría 1:4:4. Este supercomplejo fue descrito anteriormente en mitocondrias de mamíferos; y se piensa que la superestructura es formada para aumentar la eficiencia del transporte electrónico y evitar la fuga de compuestos derivados del oxígeno altamente reactivos (Stroh, 2004).

Se sabe que además de la canalización del sustrato, la estabilización estructural de un complejo de proteínas de membrana puede ser una de las principales funciones de los supercomplejos en la cadena respiratoria. Aunque se han informado interacciones estables de los complejos bacterianos III y IV para formar quinol-oxidasas, la participación del complejo I no se observó sino hasta el año 2003 cuando en experimentos utilizando el detergente digitonina se consiguió aislar al complejo junto con los complejos III y IV, así como con algunos citocromos c oxidados anclados (Stroh, 2004). La digitonina es ampliamente utilizada en experimentos de aislamiento y caracterización de proteínas membranales dado su carácter no iónico que no ejerce un efecto de disociación tan grande al momento de solubilizar las porciones lipídicas de dichas proteínas. Derivado de estos experimentos de caracterización fue posible la determinación de algunas de las características estructurales y funcionales más importantes de los cuatro complejos respiratorios aislados de *P. denitrificans*; siendo aquellas de mayor relevancia las que se describen a continuación:

#### *NADH Q-oxidoreductasa (NADH deshidrogenasa)*

La composición polipeptídica del complejo consta de 14 subunidades de las cuales 10 de ellas se han logrado observar directamente mediante geles de poliacrilamida. Seis de las subunidades mayoritarias poseen valores de peso molecular aparente ( $M_r$ ) de 73, 70, 66, 55, 48 y 25 KDa, lo que en conjunto resulta en un peso total de 337 KDa. Mientras que los valores de  $M_r$  de las cuatro subunidades minoritarias determinados también a partir geles de poliacrilamida son de 80, 41, 33 y 21 KDa (Yagi, 1986).

El contenido de FMN del complejo NADH deshidrogenasa aislado se estima en 2.2-2.5 nmol/mg de proteína, siendo este valor más alto que el contenido de FMN del

complejo I de las mitocondrias de corazón bovino (1.4-1.5 nmol/mg de proteína). Se estima que los contenidos de hierro no hemo y azufre componentes de los centros hierro-azufre son de 31.3 ng de Fe y 27.3 nmol de S<sup>2-</sup> por miligramo de proteína. Dichos valores son también ligeramente más altos que los cuantificados en el complejo I de corazón bovino (24-26 ng Fe y 23-26 nmol de S<sup>2-</sup> por miligramo de proteína). A partir de estos resultados se determinó que la proporción de FMN:Fe:S<sup>2-</sup> para el complejo NADH deshidrogenasa de *P. denitrificans* es de 1:13-14:11-12, mientras que la proporción de los mismos componentes del complejo I bovino se ha estimado en 1:22-24:22-24. A partir del cálculo de estas proporciones se ha propuesto que cierto segmento de la enzima bacteriana se encuentran cuatro centros hierro-azufre; dispuestos en un centro binuclear y tres centros tetranucleares (Yagi, 1986).

#### *Succinato-Q oxidorreductasa (Succinato deshidrogenasa)*

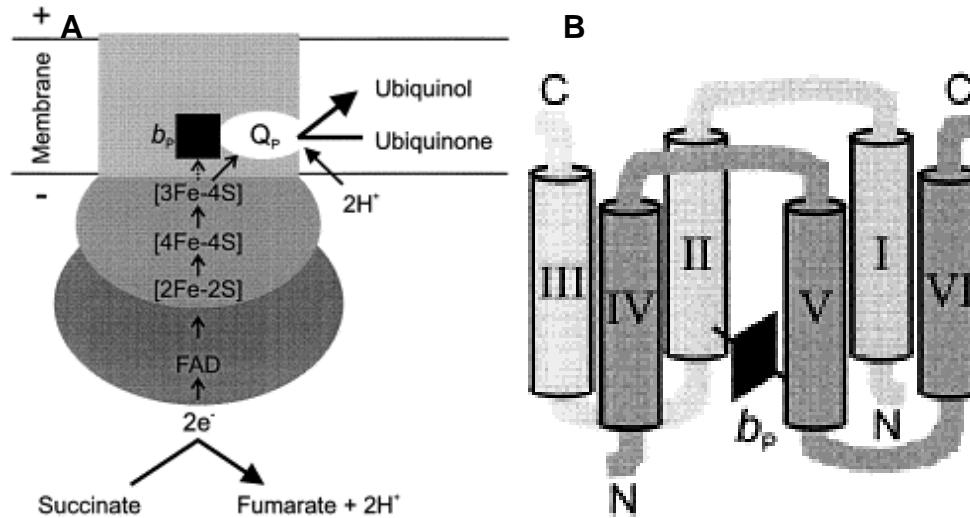
El complejo succinato deshidrogenasa de *P. denitrificans* consiste en una región periférica dispuesta en el lado citoplasmático y una porción transmembranal que no atraviesa completamente la membrana. La parte periférica es un heterodímero compuesto de una flavoproteína (SdhA) y una proteína hierro-azufre (SdhB) con un Mr de 64.9 y 28.9 KDa, respectivamente. SdhA contiene un FAD unido covalentemente al polipéptido y alberga un sitio de unión a dicarboxilato donde el succinato se oxida hasta fumarato. Por su parte, SdhB contiene tres centros diferentes hierro-azufre ([2Fe-2S], ([4Fe-4S] y ([3Fe-4S]) que constituyen una vía lineal de transferencia de electrones provenientes del FAD hasta la parte superior de la enzima (Figura 3A).

La parte anclada de la proteína consiste también de dos polipéptidos denominados SdhC y SdhD, con un Mr de 13.4 y 12.5 KDa respectivamente, así como un grupo hemo b. Esta región membranal de la enzima consta de seis pases transmembranales y es esencial para la unión del heterodímero encargado de la transferencia de los electrones desde los centros hierro-azufre hasta la UQ (Figura 3B).

En la actualidad no se ha reportado ninguna estructura cristalina del complejo succinato deshidrogenasa, sin embargo, las estructuras de los complejos de *E. coli* y *Wolinella succinogenes* junto con la secuencia de muchos otros organismos han respaldado los modelos propuestos para la estructura proteica de *P. denitrificans*. Se



ha observado mediante varios experimentos que el complejo II de *P. denitrificans* y el de las mitocondrias de corazón bovino tienen propiedades muy similares, incluida la sensibilidad a los mismos inhibidores. En experimentos adicionales se ha descubierto que los polipéptidos SdhA y SdhB de las dos enzimas muestran 63 y 68% de identidad, respectivamente. Como referencia, los polipéptidos SdhA y SdhB de *Bacillus subtilis* y *P. denitrificans* muestran tan solo un 30 y 32% de identidad (Hederstedt, 2002).



**Figura 3.** A) Ilustración del complejo succinato deshidrogenasa de *P. denitrificans* donde son representados los tres centros hierro-azufre. B) Región transmembranal del complejo en donde se muestran los seis pases transmembranales. Tomado de Hederstedt, 2002.

#### *Q-citocromo c oxidorreductasa (citocromo reductasa)*

El complejo citocromo oxidorreductasa o también denominado *citocromo bc<sub>1</sub>* de *P. denitrificans* consta de solo 3 subunidades proteicas. Con base en las movilidades electroforéticas relativas de cada una de las tres subunidades del complejo se establecieron los valores de M<sub>r</sub> en 62, 39 y 20 KDa. Ensayos de actividad enzimática de la subunidad de 39 KDa y de tinción de grupos hemo para la subunidad de 62 KDa, lograron identificar a dichas subunidades como los citocromos b y c<sub>1</sub>, respectivamente. De manera complementaria, experimentos de resonancia paramagnética (EPR) y de movilidad electroforética han proporcionado evidencia suficiente para proponer que la subunidad de 20 KDa se trata de la proteína hierro-azufre Rieske; dicha aseveración es respaldada también por el M<sub>r</sub> que se ha observado en otros organismos procariontas.

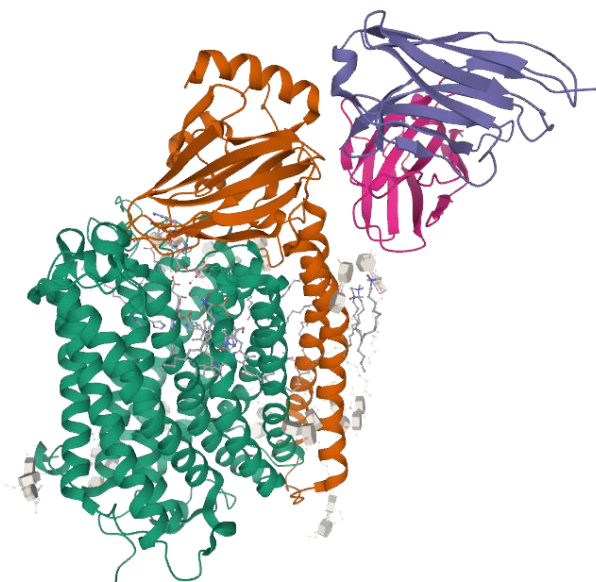
Como parte complementaria de los experimentos de caracterización del citocromo  $bc_1$  se evidenció que los citocromos b presentes son espectral y termodinámicamente distintos, verificados por los picos de absorción a 560 y 566 nm obtenidos. Estos citocromos b son denominados grupos hemo de alto y bajo potencial, y también pueden encontrarse en el complejo III mitocondrial (Yang y Trumpower, 1985).

El complejo  $bc_1$  de *P. denitrificans* cataliza la reducción del citocromo c mediante la oxidación del UQ<sub>2</sub> con una velocidad de 470 s<sup>-1</sup>, siendo esta una de las tasas de reacción más altas de entre muchos organismos aeróbicos. Aunado a las mediciones de actividad enzimática, se ha demostrado que la actividad oxido-reducción del citocromo reductasa es sensible a inhibidores como la antimicina, mixotiazol, estigmatellina y análogos de la hidroxiquinona; compuestos que también pueden inhibir la transferencia de electrones del complejo  $bc_1$  mitocondrial. La experimentación con estos inhibidores ha fungido como una prueba fundamental para establecer la relación estructura-función que pueden tener el complejo bacteriano y su contraparte mitocondrial. Consecuentemente, se sugiere que un pequeño número de péptidos cumplen los requisitos estructurales para la transferencia de electrones del UQH<sub>2</sub> al citocromo c, y que los péptidos adicionales que se encuentran en los complejos mitocondriales  $bc_1$  cumplen alguna otra función, posiblemente en la biogénesis o inserción del complejo en la membrana mitocondrial (Yang y Trumpower, 1986).

#### *Citocromo c oxidasa (citocromo oxidasa)*

La citocromo c oxidasa es la enzima terminal de la CTE en las mitocondrias y en muchos organismos procariotas aeróbicos como *P. denitrificans*. La enzima aislada proveniente de este organismo se ha logrado cristalizar en numerosas ocasiones por distintos equipos de investigación bajo diferentes condiciones de cristalización, pero siempre utilizando un anticuerpo monoclonal denominado F<sub>v</sub> como agente cocrystalizante (Iwata, 1995; Ostermeier, 1997; Koepke, 2007). La resolución estructural del complejo aislado en 1995 permitió dilucidar en primera instancia la presencia de cuatro subunidades que conforman en su totalidad a la enzima, sin embargo, las subunidades tres y cuatro aparentemente no desempeñan ninguna función clave en el proceso de reducción del O<sub>2</sub> o de la translocación de protones. El

modelo estructural refinado resultante a 2.7 Å muestra una composición polipeptídica con una longitud de 1 329 residuos. A partir del mismo modelo se logró determinar la longitud para cada una de las cuatro subunidades del complejo: SUI (554aa), SUII (252aa), SUIII (273aa) y SUIV (56aa). La composición mayoritaria del complejo proteico se encuentra embebido en la membrana, contando únicamente con una porción globular de la SUII alojada en el citoplasma. Una proyección lateral de la porción membranal del complejo muestra una figura trapezoidal con una longitud de la parte inferior ~90 Å correspondiente a la región citoplásmica, así como una longitud de ~75 Å de la parte superior, es decir, la región periplásmica (Figura 4).

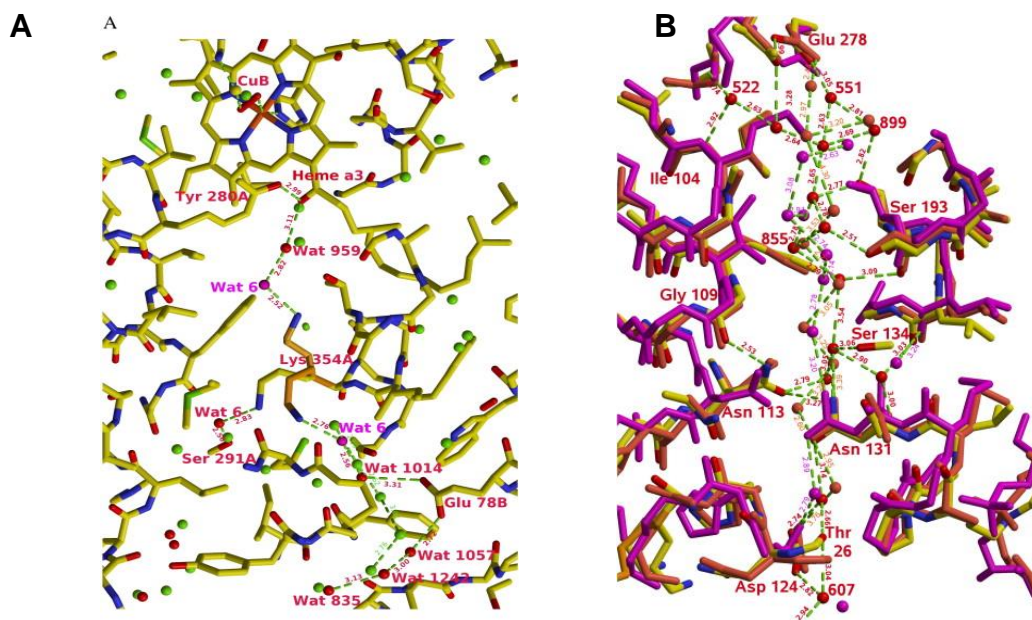


**Figura 4.** Estructura cristalográfica (PDB:3HB3) del complejo Citocromo oxidasa de *P. denitrificans*. Las SUI, III y IV se muestran en color cian, la SUII se muestra en color naranja. Se muestra el anticuerpo Fv en color rosa-azul.

La parte central del complejo se encuentra formado por la SUI que une tanto a los grupos *hemo a* como al  $Cu_B$ . La SUI se encuentra asociada en conjunto con la SUII por un lado y la SUIII por el otro. Los extremos amino y carboxilo de la SUII sobresalen en el espacio periplásmico y forman al dominio globular que contiene al centro binuclear  $Cu_A/Cu_A$  donde se da la unión con las moléculas de citocromo c. Como ya se ha mencionado anteriormente la SUIII parece no tener alguna función específica, por lo que se ha propuesto únicamente como una subunidad accesoria para poder

estabilizar el ensamblaje del complejo. La SUIV consta solamente de una hélice transmembranal que se encuentra haciendo contacto con las otras tres subunidades; la función de esta subunidad también es desconocida hasta el día de hoy (Iwata, 1995).

Como es bien sabido, el complejo citocromo oxidasa que desempeña tanto la reducción del  $O_2$  como la translocación de cuatro protones desde la región citoplásmica hasta la periplásmica, necesita una manera eficiente de transportar  $H^+$  para completar estos procesos. Las rutas de  $H^+$  propuestas más aceptada hasta el día de hoy para llevar a cabo ambos mecanismos fue basada en la determinación de una estructura cristalográfica a 2.2 Å de resolución; estructura obtenida por Koepke y col. en 2009.



**Figura 5.** A) Ruta K de translocación de  $H^+$ , se muestran y los residuos participantes en color amarillo de la red de protonación para el transporte electrónico hacia el centro  $Cu_B$ . B) Ruta D de translocación de  $H^+$ , se muestran los residuos participantes en color rojo para el bombeo de protones hacia la región periplásmica. Tomado de Koepke, 2007.

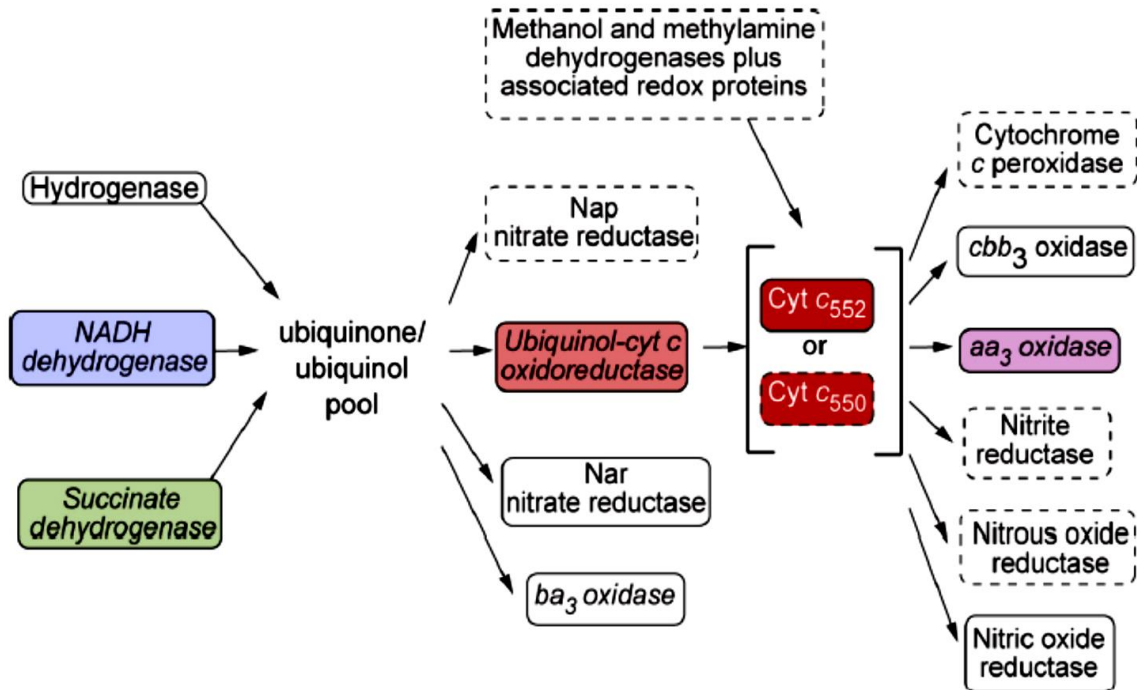
Por su parte, el modelo de translocación de  $H^+$  necesario para realizar el proceso de reducción del  $O_2$  para formar dos moléculas de agua ( $H_2O$ ) se le denominó ruta K por la participación de un residuo esencial de K354 (Figura 5A). Mientras que el mecanismo por el cual se desarrolla la translocación de cuatro  $H^+$  hacia el periplasma se le denominó ruta D por la presencia y participación de un D124 altamente conservado (Figura 5B). Ambos modelos de translocación de protones se ha propuesto

que son llevados a cabo por una red sucesiva de protonaciones que se dan entre moléculas de H<sub>2</sub>O alojadas en los dos canales formados por las cuatro subunidades y las cadenas laterales de aminoácidos con valores de pK<sub>a</sub> que permiten su protonación y deprotonación (Koepke, 2007).

La red de protonaciones sucesivas de moléculas de H<sub>2</sub>O, también denominada como red de cables de H<sub>2</sub>O, ha sido propuesto como el mecanismo principal por el cual se lleva a cabo la translocación de H<sup>+</sup> a través de canales transportadores de iones como en el caso de el de la ATP sintasa. El mecanismo hasta ahora propuesto plantea la interacción e incorporación del H<sup>+</sup> entrante con una de las moléculas de H<sub>2</sub>O próximas a la entrada del canal, promoviendo así la reorganización de los enlaces covalentes y de puentes de hidrogeno del resto de moléculas que se encuentran alojadas a lo largo del canal; resultando finalmente en la liberación del H<sup>+</sup> perteneciente a la última molécula de H<sub>2</sub>O de la red (Nayaran y col., 2007).

#### **1.4 Oxidasas alternativas presentes en *P. denitrificans***

Además de la cadena respiratoria canónica de *P. denitrificans*, la respiración se caracteriza por tener varios puntos de ramificación al contar con oxidasas alternativas que permiten el crecimiento bajo concentraciones de O<sub>2</sub> muy variables, lo que dota a la bacteria de una alta flexibilidad metabólica; la cual se cree es resultado del acondicionamiento a su habitat natural (suelo). Parte de esta versatilidad viene provista por la expresión constitutiva de dos citocromos tipo c (*cyt c<sub>550</sub>* y *cyt c<sub>552</sub>*) que pueden actuar alternadamente en el transporte de los electrones (Figura 6). El *cyt c<sub>552</sub>* se encuentra anclado en la membrana plasmática del microorganismo, mientras que el *cyt c<sub>550</sub>* guarda una estrecha relación de potencial redox, así como estructural con el citocromo c mitocondrial. Bajo este mismo escenario, se ha observado que la depleción del gen del *cyt c<sub>550</sub>* no detiene la transferencia electrónica al complejo citocromo c oxidasa lo que ha demostrado la función alternativa que puede llevar a cabo (aunque con menor eficiencia) el *cyt c<sub>552</sub>*. Del mismo modo, se demostró que la presencia de una *oxidasa aa<sub>3</sub>* similar a la del complejo IV mitocondrial, una *oxidasa cbb<sub>3</sub>* puede aceptar electrones de alto potencial provenientes de alguno de los dos citocromos para llevar a cabo la reducción del O<sub>2</sub>.



**Figura 6.** Componentes de CTE de *P. denitrificans*. Se muestran los componentes constitutivos de la cadena respiratoria en recuadros coloreados. Los componentes alternativos a la CTE que pueden expresarse se muestran en recuadros punteados de color blanco. Tomado de Rich y Marechal, 2012.

La *oxidasa cbb<sub>3</sub>* es parte de una superfamilia de oxidasas hemo-cobre que contienen un sitio binuclear que consiste en un grupo hemo de alto giro y un centro Cu<sub>B</sub> estrechamente asociado. La estructura proteica de la *oxidasa cbb<sub>3</sub>* difiere de la *oxidasa aa<sub>3</sub>* por la sustitución del centro binuclear Cu<sub>A</sub> por un citocromo tipo c, el cual es el encargado de transferir los e<sup>-</sup> provenientes de la CTE a los dos hemos tipo b para llegar finalmente al centro Cu<sub>B</sub>. Estos cambios estructurales dan como resultado una oxidasa con una afinidad mucho mayor por el O<sub>2</sub> que la *oxidasa aa<sub>3</sub>*, lo que se traduce finalmente en una mejora sustancial en el crecimiento del microorganismo bajo condiciones de estrés respiratorio. El bombeo de protones mantiene una estequiometría de 2H<sup>+</sup>/2e<sup>-</sup>, lo que denota la alta eficiencia del proceso de transporte electrónico por esta ruta alternativa.

La tercera opción de la ruta oxidativa de la cadena respiratoria alternativa puede llevarse a cabo por la *oxidasa ba<sub>3</sub>*, un complejo proteico que es capaz de aceptar

electrones directamente de la molécula de UQH<sub>2</sub>. El complejo de la *oxidasa ba<sub>3</sub>* difiere estructuralmente del complejo IV de mamíferos por la sustitución del centro binuclear Cu<sub>A</sub> por un sitio de unión a UQH<sub>2</sub>, así como en el remplazo del citocromo tipo *a* por un citocromo del tipo *b*. La oxidasa bombea H<sup>+</sup> de manera similar al complejo IV, sin embargo, la estequiometría del proceso de oxidación del UQH<sub>2</sub> para reducir al O<sub>2</sub> es menor. Con respecto a lo anteriormente expuesto, múltiples estudios bioenergéticos han evidenciado que una cadena ramificada de transporte de electrones aeróbicos es una característica muy común entre muchas bacterias, pero la razón por la cual el control de la expresión de los diferentes componentes, así como la regulación de la distribución de electrones entre las ramas no se entienden completamente aún en estos días (Nicholls, 2013).

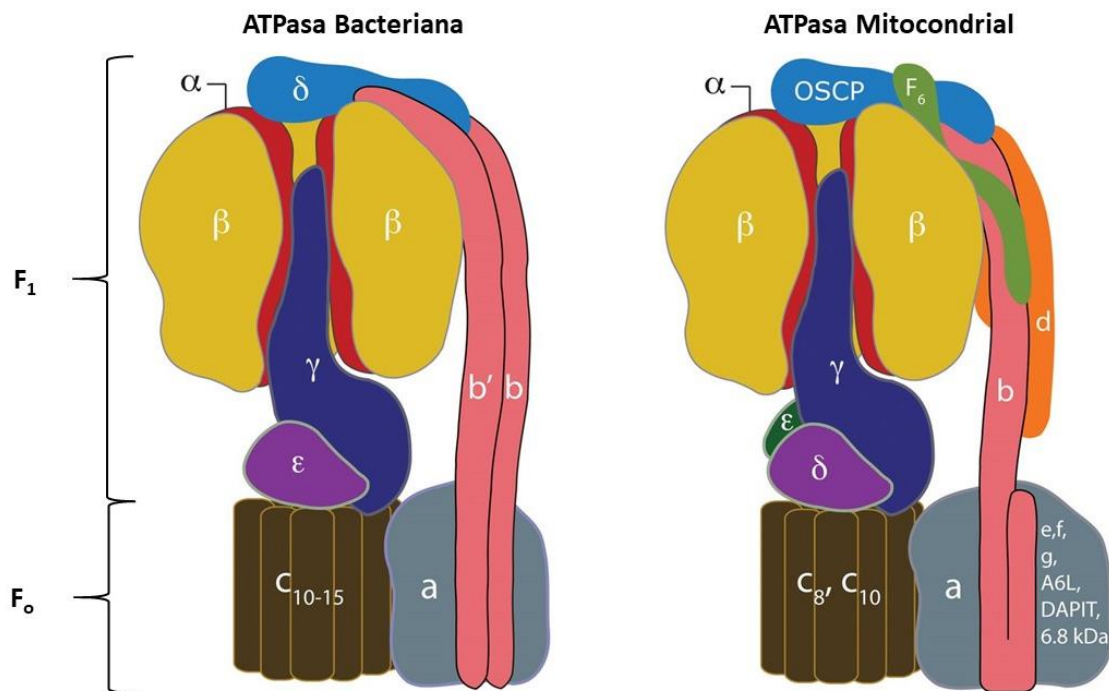
### 1.5 La ATP sintasa

La F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa o simplemente F-ATP sintasa (EC 3.6.3.14) es un complejo multiproteico encargado de producir la mayoría de las moléculas de ATP, utilizadas como fuente de energía principal en los distintos procesos metabólicos de las células procariontes y eucariontes. El complejo se encuentra localizado en distintas membranas transductores de energía según el organismo de estudio; ubicándose en la membrana plasmática de bacterias, en la membrana tilacoidal de los cloroplastos o en la membrana interna de las mitocondrias (Lehninger, 2018).

En organismos aeróbicos, la síntesis de ATP se lleva a cabo a partir de una reacción de condensación entre el ADP y Pi impulsada por la  $\Delta\mu$  establecida por el gradiente electroquímico y de protones resultado del trabajo desempeñado por la CTE, de acuerdo con lo postulado por la teoría quimiosmótica de Mitchell (1970). Del mismo modo, hoy en día se sabe que muchas ATP sintasas bacterianas pueden operar bajo condiciones anaeróbicas e hidrolizar ATP para restablecer el gradiente electroquímico con el propósito principal de impedir el abatimiento de aquellos procesos metabólicos que son cruciales para la célula. En contraste con estas ATPasas bacterianas, las actividades hidrolíticas de las ATPasas mitocondriales o cloroplásticas están inhibidas *in vivo*, pero pueden ser activadas artificialmente *in vitro* (Walker, 2013).

### 1.5.1 Arquitectura general de la ATP sintasa

La arquitectura general de la ATP sintasa está conformada por dos dominios funcionalmente acoplados, el dominio citosólico  $F_1$  donde se genera la síntesis de ATP y el dominio membranal  $F_0$  en el que se lleva a cabo la translocación de protones (Deckers-Herbestreit, 1992); estando estos dos dominios unidos por un tallo central y un tallo periférico (Figura 7). Independientemente de su procedencia, las ATP sintasas hasta ahora conocidas parecen poseer una estructura general sumamente conservada a través de la evolución (Guo & Rubinstein, 2018). La composición proteica específica del complejo y de cada una de las subunidades está también determinada por el tipo de organismo, lográndose encontrar las versiones más simplificadas de la enzima en bacterias (8 subunidades), mientras que las versiones más complejas se han observado únicamente en eucariontes (16-21 subunidades).



**Figura 7.** Composición proteica de la ATP sintasa bacteriana (izquierda) y mitocondrial (derecha). Se muestran las regiones  $F_1$  y  $F_0$  unidas por el tallo central y periférico, así como cada una de las subunidades que la conforman. Cada una de las subunidades son representadas con distintos colores para su clara identificación. Modificado de Walker, 2013.



El dominio  $F_1$  de prácticamente todas las F-ATP sintasas consta de cinco proteínas globulares denominadas  $\alpha(3)$ ,  $\beta(3)$ ,  $\gamma(1)$ ,  $\delta(1)$  y  $\epsilon(1)$ , que poseen la estequiometría propiamente señalada. Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se encuentran dispuestas alternadamente formando una estructura hexamérica de carácter hidrofílico, la cual se posiciona en la parte superior del tallo central formado por la asociación de las subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$  en la enzima bacteriana. Los cambios conformacionales de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  provistos por la interacción con la subunidad  $\gamma$  son los responsables de realizar el proceso de síntesis o hidrólisis de ATP (Walker, 2013). La región  $F_1$  se encuentra estructuralmente unida a la región membranal por una segunda estructura denominada “tallo periférico”, el cual está conformado por las subunidades  $\delta$  (OSCP en mitocondrias) y un dímero de subunidades  $b$  y  $b'$  ( $d$  en mitocondrias); estructuras homólogas que se incrustan dentro de la membrana lipídica.

Por su parte, la región  $F_0$  a diferencia de la región  $F_1$  posee una enorme variabilidad en la cantidad de subunidades proteicas que la conforman, lo cual depende del mismo modo del organismo de procedencia. La estructura general más sencilla de la región  $F_0$  encontrada en las bacterias está formada únicamente por las subunidades  $a$ ,  $b$  y  $c$ , mientras que su contraparte mitocondrial está constituida hasta por 18 subunidades en algunos organismos (Tabla 1). Ensayos con ATP sintasas de organismos como *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae* permitieron dilucidar las primeras estructuras tridimensionales de una porción de la región  $F_0$  con la cual se logró determinar la composición proteica, mientras que estudios recientes de Crio-ME lograron revelar las interacciones existentes entre las subunidades  $a$ ,  $b$  y  $c$  de la ATP sintasa de *Bacillus PS3* (Guo & Rubinstein, 2018). La región  $F_0$  de cloroplastos y algunas bacterias, como *P. denitrificans*, poseen una composición proteica bastante similar a la de muchas bacterias considerándose por lo tanto como subunidades canónicas, a excepción de las subunidades  $b$  homólogas ya mencionadas (Walker, 2013).

Centrándonos propiamente en la región membranal de las ATP sintasas, el anillo oligomérico de subunidades  $c$  es un complejo proteico altamente hidrofóbico que se encuentra formado por una cantidad variable de monómeros de estructuras alfa helicoidales, las cuales están constituidas por dos cruces transmembranales que se

pliegan como una horquilla y se encuentran unidas por un bucle de aproximadamente cuatro aminoácidos. Este anillo de subunidades c en conjunto con las subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$  conforman el rotor de la enzima (Deckers-Herbestreit, 1996). Existen líneas de evidencia que sugieren la interacción de varios residuos de la subunidad c con las subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$ , lo que indica claramente que los residuos de esta región se encuentran lo suficientemente expuestos al dominio  $F_1$  como para interactuar con las subunidades adyacentes (Altendorf y col., 2000). Por otro lado, se observó que en la región carboxilo terminal de las subunidades c se encuentra un residuo de Asp o Glu altamente conservado en prácticamente todos los organismos, el cual se ha propuesto como uno de los residuos clave en el proceso de translocación de  $H^+$  a través de la membrana. Esta idea ha sido sustentada gracias a la observación de la inhibición de la translocación de  $H^+$  al adicionar un compuesto llamado diciclohexilcarbodiimida (DCCD) que se une con gran afinidad a los residuos mencionados (Preiss y col., 2015).

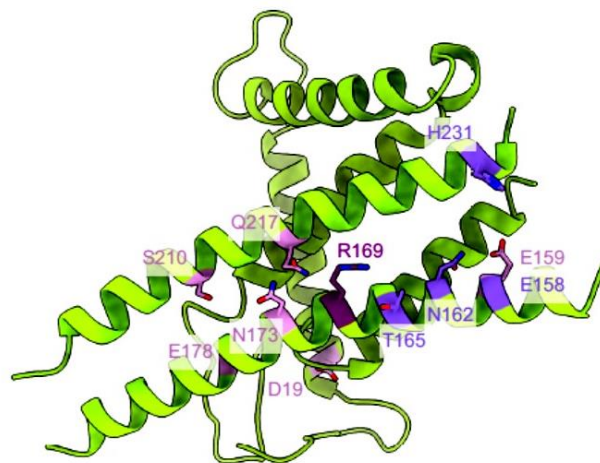
Región	Organismo procedencia			
	<i>E. coli</i>	<i>P. denitrificans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. taurus</i>
<b><i>F</i><sub>1</sub></b>	$\alpha_3$ (55.4)	$\alpha_3$ (55.1)	$\alpha_3$ (54.9)	$\alpha_3$ (55.2)
	$\beta_3$ (50.4)	$\beta_3$ (50.3)	$\beta_3$ (51.1)	$\beta_3$ (51.7)
	$\gamma$ (31.5)	$\gamma$ (31.5)	$\gamma$ (30.6)	$\gamma$ (30.2)
	$\delta$ (19.3)	$\delta$ (22.3)	$\delta$ (14.5)	$\delta$ (15.0)
	$\epsilon$ (14.3)	$\epsilon$ (15.2)	$\epsilon$ (6.6)	$\epsilon$ (5.6)
	-	-	OSCP (20.8)	OSCP (20.9)
	-	$\zeta$ (11.8)	IF <sub>1</sub> (7.3)	IF <sub>1</sub> (9.5)
	-	-	STF1 (7.2)	-
	-	-	STF2 (9.4)	-
	-	-	TMA10 (9.7)	-
<b><i>F</i><sub>0</sub></b>	a (30.1)	a (26.7)	Sub 6 (27.8)	Sub 6 (24.7)
	b <sub>2</sub> (17.2)	b <sub>2</sub> (20.1)	Sub 4 (23.2)	b <sub>1</sub> (24.6)
	c <sub>10</sub> (8.2)	c <sub>12</sub> (7.6)	Sub 9 <sub>10</sub> (7.7)	c <sub>14</sub> (7.6)
	-	-	Sub 7 (19.6)	d (18.5)
	-	-	e (10.7)	e (8.1)
	-	-	f (10.5)	f (10.1)
	-	-	g (12.9)	g (11.2)
	-	-	h (10.4)	F6 (8.9)
	-	-	i (6.6)	DAPIT (6.3)
	-	-	k (7.5)	MLQ (6.8)
-	-	Sub 8 (5.8)	A6L (7.9)	

A partir de estructuras cristalográficas, así como de micrografías de microscopía atómica y electrónica de ATP sintasas bacterianas, cloroplásticas y mitocondriales se ha observado que el número de subunidades c del anillo puede estar compuesta desde 8 hasta 17 subunidades (Pogoryelov, 2009, Watt, 2010; Schulz, 2017). De modo que el número de subunidades que conforman al anillo depende del organismo y de la especie, hallándose siempre una cantidad mayor de subunidades en los anillos de enzimas procariontes y cloroplastos (Nesci y col., 2016). Dicha variabilidad es la base de una teoría que propone que el número de subunidades c componentes del anillo oligomérico surgió como una adaptación biológica a las condiciones bioenergéticas predominantes en el medio. Así, organismos provistos de un mayor  $\Delta\phi$  suelen poseer anillos más pequeños como en el caso de las enzimas mitocondriales, mientras que en medios en los que el  $\Delta\text{pH}$  es preponderante los anillos que se expresan en organismos como las cianobacterias suelen poseer un mayor número de copias de subunidades c.

Por otro lado, la subunidad b es una proteína anfipática que se divide en dos dominios estructuralmente funcionales (Figura 6). El dominio amino que está constituido generalmente por los primeros 23 aminoácidos de la proteína se encuentra anclado a la membrana, por lo tanto, se piensa que esta porción de la proteína es la encargada de completar la unión a la membrana lipídica. La porción media de la subunidad b desempeña un papel bastante importante, ya que es la encargada de la dimerización de las dos proteínas homólogas (b y b') mediante múltiples interacciones hidrofóbicas, a lo largo de una longitud de aproximadamente 250 Å. El resto de la estructura que se localiza en la región citosólica de la célula se encarga de fijar a la región catalítica mediante la interacción del dominio carboxilo de la subunidad b con la subunidad  $\delta$  que se encuentra unida con una de las subunidades  $\alpha/\beta$  de la enzima. Mientras que el monómero b' se ha observado unido a la región  $F_1$  mediante una interacción directa con alguna de las dos subunidades catalíticas (Dmitriev y col, 1999). Todas estas interacciones apoyan la idea de que la subunidad b es el componente principal del estator del complejo enzimático. En este sentido, se ha observado también que la presencia de la subunidad b es bastante importante para el correcto ensamblaje de los dominios  $F_1$  y  $F_0$ . (Welch, 2008). Bajo esta misma propuesta, y mediante ensayos de

entrecruzamiento se ha logrado demostrar la interacción existente entre los dos monómeros de la subunidad b y la subunidad a principalmente. Esta asociación en conjunto con las observada entre la subunidad a y c logran la formación de los dos hemicanales situados de cada lado de la membrana; estando ambos implicados en la translocación de protones.

Por último, y completando la región  $F_0$  de las ATP sintasas bacterianas, la subunidad a es una proteína altamente hidrofóbica constituida por seis  $\alpha$ -hélices de las cuales cinco de ellas se alojan completamente dentro de la bicapa lipídica. El extremo amino y carboxilo terminal se encuentran dentro de la membrana y orientados hacia el lado N. La primera  $\alpha$ -hélice se extiende verticalmente a través de la bicapa distal al contacto con el anillo de subunidades c, esta porción de la subunidad a se muestra empaquetada en conjunto con el dímero de subunidades b. La segunda  $\alpha$ -hélice es la única estructura que no se aloja dentro de la membrana y se encuentra en la superficie del lado N, dicha hélice conecta a la primera  $\alpha$ -hélice con una estructura de horquilla formada por las  $\alpha$ -hélices tres y cuatro. Las últimas dos  $\alpha$ -hélices son las estructuras helicoidales más largas de la proteína y parecen tener bastante cercanía con el anillo oligomérico por lo que estarían implicadas en la formación de los dos hemicanales de la región  $F_0$  (Figura 8) (Zhou y col., 2015).



**Figura 8.** Estructura tridimensional de la subunidad a proveniente de la ATP sintasa de *Bacillus PS3*. La imagen muestra la disposición inclinada de cinco de las  $\alpha$ -hélices, así como los posibles residuos involucrados en la translocación de  $H^+$ . Tomado de Guo, 2019.

La disposición espacial de la subunidad a determinada por experimentos de Crio-ME relativamente recientes logró revelar una orientación espacial casi paralela a la membrana, una disposición hasta ese entonces nunca vista en proteínas membranales (Allegretti y col., 2015). Dichos estudios estructurales permitieron determinar algunos de los posibles residuos clave implicados en la translocación de protones, dado su grado de conservación entre los organismos estudiados (Guo & Rubinstein, 2019). Algunos de los aminoácidos identificados en la estructura procedente de *Bacillus PS3* fueron la Arg169, que se encuentra ubicada muy cerca del centro de la bicapa lipídica y orientado hacia el residuo Glu56 de la subunidad c. Otros de los residuos identificados que parecen estar involucrados son el Glu178 y el Glu159, los cuales se piensa son cruciales para el paso de los protones a través de los dos hemicanales dadas sus características fisicoquímicas (Guo & Rubinstein, 2018).

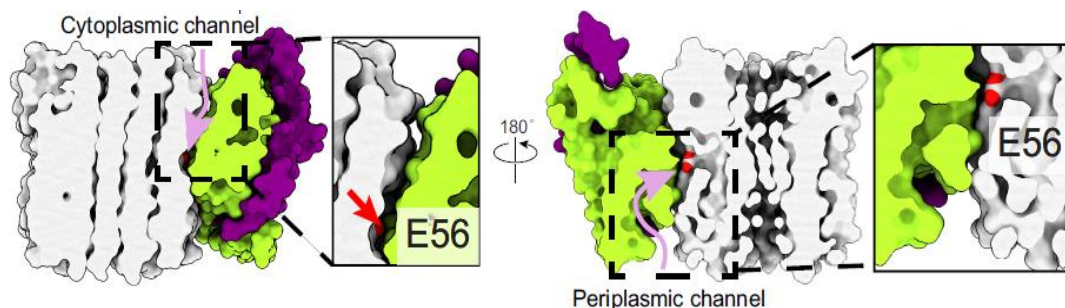
Se sabe que la composición de subunidades de la región  $F_0$  mitocondrial es significativamente más compleja que la de bacterias y cloroplastos, ya que además de las tres subunidades principales descritas, en levaduras el dominio membranal se encuentra conformado por las subunidades d, e, f, g, h ( $F_6$  en mamíferos), i, k, l y 8 ( $A_6L$  en mamíferos) (Figura 7). Además de estas subunidades denominadas como supernumerarias, se logró demostrar la presencia de las subunidades DAPIT (proteína asociada a diabetes de tejidos sensibles a insulina) y 6.8PL (6.8 KDa proteolípido) en mamíferos (Chen, 2007). Así mismo, recientemente se ha logrado observar que las ATP sintasas mitocondriales forman estructuras dímeras que se colocan en fila a lo largo de los pliegues de las crestas de la membrana interna; lo que se piensa es el fenómeno responsable de su plegamiento dentro de la mitocondria (Blum y col., 2019).

### **1.5.2 Modelo de translocación de protones y síntesis de ATP**

Las dos funciones acopladas desarrolladas por la ATP sintasa (síntesis e hidrólisis de ATP) se basan en la capacidad que tiene el rotor de girar en sentido horario o antihorario de acuerdo con las condiciones fisicoquímicas del medio. En condiciones fisiológicas, el complejo enzimático lleva a cabo la síntesis de ATP, un proceso que se desarrolla a través de un acoplamiento químico-mecánico entre las regiones  $F_1$  y  $F_0$ . El acoplamiento entre estas dos regiones implica el giro del complejo rotatorio

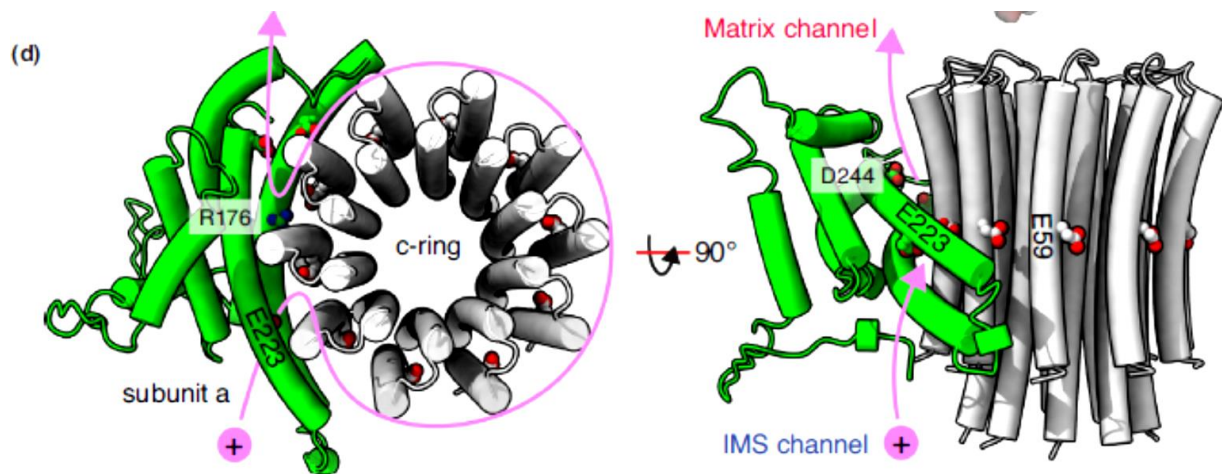
impulsado por la  $\Delta\mu$ , dando lugar a la translocación de protones a través de la región  $F_0$  desde el lado positivo de la membrana (P) hacia el lado negativo de la misma (N). De forma alternativa, el complejo enzimático bajo condiciones anaeróbicas es capaz de hidrolizar el ATP para movilizar a los protones en contra del gradiente, tratando así de restablecer el gradiente electroquímico (Lehninger, 2018).

De acuerdo con diversos estudios estructurales de la región  $F_0$  utilizando técnicas de cristalografía de rayos X y Crio-ME se ha propuesto una ruta hipotética para la translocación de protones, así como las estructuras que se encuentran implicadas. Características en la estructura de la región  $F_0$  mitocondrial bovina sugieren una posible ruta de translocación de protones similar a un modelo basado en la estructura de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* (Allegretti y col., 2015). Esta ruta de translocación general involucra el transporte de los protones conducidos a través de dos hemicanales formados entre las subunidades a, b y c. El hemicanal citoplásmico es una cavidad acuosa que parece estar formado por la interfaz de la subunidad a y el anillo de subunidades c. Por su parte, el hemicanal periplásmico parece estar formado por una cavidad formada entre las  $\alpha$ -hélices 1, 3, 4 y 5 de la subunidad a, logrando alcanzar al anillo mediante las hélices 5 y 6. Ambos canales parecen ser lo bastante amplios e hidrofílicos como para que una molécula de agua pueda pasar libremente a través de ellos hasta lograr el acceso al anillo de subunidades c (Figura 9). La arquitectura general altamente conservada de las regiones membranales de las ATP sintasas parecen sugerir que el particular arreglo observado de las  $\alpha$ -hélices es funcionalmente importante para la translocación de protones (Zhao y col., 2015).



**Figura 9.** Sección transversal de la región  $F_0$  conformada por las subunidades a (verde), b (morado) y c (blanco). En la imagen se muestran los hemicanales citoplásmico a la izquierda y periplásmico a la derecha. Tomado de Guo, 2019.

De acuerdo con el modelo general de translocación de protones propuesto hasta ahora, durante la síntesis de ATP los protones impulsados por la  $\Delta\mu$  viajan a través del hemicanal periplásmico apoyados por las diversas interacciones hidrofílicas hasta un residuo conservado de Glu de la subunidad c. La protonación del residuo de Glu permite la rotación del anillo en sentido contrarreloj llevando a la subunidad c ahora protonada dentro del ambiente hidrofóbico de la bicapa lipídica. Las protonaciones sucesivas del resto de subunidades c del anillo regresan al primer residuo de Glu protonado hacia el hemicanal citoplásmico, en donde el protón logra ser liberado dentro del citoplasma debido al carácter alcalino del medio y a la interacción con un residuo de Arg, residuo que ha demostrado estar presente en todas las estructuras de las subunidades a estudiadas (Figura 10) (Morales, 2015; Guo & Rubinstein, 2019).



**Figura 10.** Posible ruta para la translocación de protones a través de la región Fo llevada a cabo durante la síntesis de ATP. Se muestran algunos de los residuos más importantes involucrado en el proceso. Tomado de Guo & Rubinstein, 2018.

En diversos experimentos llevados a cabo con ATP sintasas bacterianas, se ha observado que el residuo conservado de Arg tolera una mínima cantidad de mutaciones, demostrando la importancia de este residuo dentro del proceso de translocación (Zhao, 2015; Zhou, 2015). Algunos de los experimentos realizados en la subunidad a del complejo de *E. coli* demostraron la importancia de otros residuos como son el Glu196, Glu219, His245, Asp44, Asn214 y Gln252. Por otro lado, múltiples ensayos de mutación con estos residuos y en particular con el Glu196 determinaron

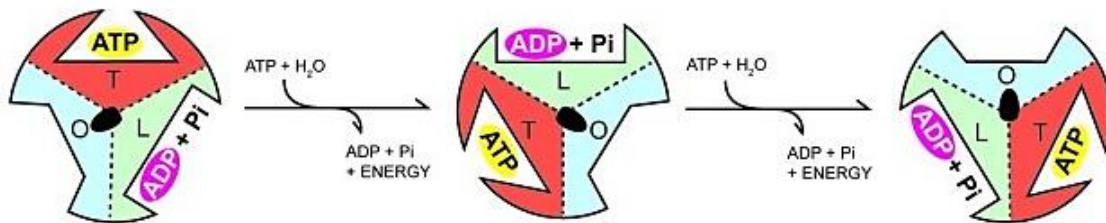
que la actividad de la enzima depende de la carga y la polaridad de los residuos que constituyen a los hemicanales (Glu > Asp > Gln = Ser = His > Asn > Ala > Lys) (Vik y col., 1988). Entre estos residuos el Glu178 y la Ser210 son considerados como algunos de los más importantes para la función de la enzima, ya que mutaciones dirigidas en dichos residuos en *E. coli* son los responsables de la inhibición en la translocación de protones (Vik y col., 2000). De manera complementaria, modelos atómicos de la estructura de *Bacillus PS3* muestran también la importancia de los correspondientes residuos de su subunidad  $\alpha$ . Sin embargo, se sugiere que estos residuos polares no están involucrados directamente en la transferencia de protones durante la translocación, aunque se piensa que su presencia puede ayudar a mantener el ambiente hidrofílico de los hemicanales. Esta variabilidad sugiere una notable flexibilidad del mecanismo de translocación en el complejo. (Guo & Rubinstein, 2019).

Con respecto a la síntesis de ATP, estudios funcionales y estructurales han demostrado el acoplamiento estructural y funcional de las regiones  $F_1$  y  $F_0$  para llevar a cabo este proceso. En la síntesis se utiliza la movilización de los protones a través de la región membranal para producir el giro en sentido horario de las subunidades que conforman el rotor de la enzima, el cual induce los cambios conformacionales de los tres sitios catalíticos ubicados en la subunidad  $\beta$  (Boyer, 1997). Las subunidades  $\beta$  sufren cambios conformacionales resultado de la interacción con la subunidad  $\gamma$  y en cada giro de  $120^\circ$  del rotor, produciéndose así las tres conformaciones denominadas como  $\beta_L$ ,  $\beta_T$  y  $\beta_O$  (Figura 11).

Por su parte, durante la hidrólisis del ATP, se invierte la dirección de rotación y el orden de los cambios estructurales que acompañan a la síntesis de ATP (Walker, 2013). Cada una de las conformaciones mencionadas presentan afinidades distintas por nucleótido para llevar a cabo cada uno de los pasos secuenciales para la síntesis de ATP, es decir, unión del ADP y  $P_i$ , síntesis del ATP y liberación del ATP. La conformación  $\beta_L$  (relajada) presenta una alta afinidad por moléculas de ADP y  $P_i$ , por lo que esta conformación es la responsable de unir a los sustratos de la reacción. Mientras tanto, la segunda conformación denominada  $\beta_T$  (tensa) origina las condiciones necesarias para completar la reacción de síntesis del ATP. Ambas



conformaciones, T y L, están lo suficientemente confinadas como para poder resguardar las moléculas nucleotídicas que se encuentran unidas. Finalmente, la conformación  $\beta_0$  (abierta) adopta esta disposición para liberar el ATP sintetizado y subsecuentemente poder unir de nueva cuenta a los sustratos necesarios para una nueva ronda de síntesis (Stewart, 2013).



**Figura 11.** Ciclo catalítico para la síntesis de ATP propuesto por Paul Boyer. Se muestran las tres conformaciones adoptadas de la subunidad  $\beta$  (conformación T denotada en rojo) por interacción con la subunidad  $\gamma$  (negro). Tomado de Stewart, 2013.

## 1.6 Inhibidores de ATP sintasa/ATPasa

Los diferentes tipos de ATP sintasa poseen varios mecanismos de acción e inactivación para la síntesis e hidrólisis de ATP de acuerdo a los requerimientos energéticos de la célula. Un claro ejemplo de estos mecanismos reguladores se presenta en las mitocondrias cuando la  $\Delta\mu$  se encuentra disminuida. Bajo este escenario la unión de ADP en las tres subunidades catalíticas promueve la inactivación completa de la enzima (Walker, 1994). En cuanto a la hidrólisis de ATP, se sabe que este proceso es realizado por el complejo enzimático bajo condiciones de anaerobiosis derivado de procesos patológicos (ej. Isquemia cardíaca) para tratar de restablecer el gradiente electroquímico de la membrana, preservando así funciones clave para la célula como el transporte de iones y metabolitos.

Dada la termodinámica y reversibilidad de los procesos de síntesis e hidrólisis de ATP, la mayoría de los organismos posee un mecanismo regulador proteico intrínseco para inhibir principalmente la actividad de ATPasa evitando así la depleción completa de las concentraciones de ATP. En los cloroplastos se piensa que el estado inactivo de la inhibición por ADP se estabiliza durante la noche al formarse un enlace disulfuro intramolecular en la subunidad  $\gamma$  de la ATP sintasa. Mientras que cuando la luz del día

es absorbida, la enzima se reactiva por una reducción del enlace disulfuro regulada por tioredoxina y las concentraciones de ADP (Walker, 2013).

De acuerdo con distintos experimentos estructurales y funcionales, la ATP sintasa se ha sugerido como blanco molecular terapéutico para el tratamiento de distintas enfermedades, así como para la regulación del metabolismo energético. Bajo esta premisa, múltiples equipos de investigación se han propuesto el diseño, síntesis y prueba de compuestos que puedan tener acción inhibitoria sobre la ATP sintasa con el objetivo principal de demostrar y tratar enfermedades relacionadas con la desregulación de la actividad enzimática (Hong & Pedersen, 2008). Derivado de estos esfuerzos, se han logrado obtener y clasificar varios compuestos que poseen actividad inhibitoria comprobada en la función de hidrólisis de ATP; algunos de los cuales se describen a continuación (Tabla 2).

<b>Tabla 2. Inhibidores de ATPasa</b>			
<b>Clasificación</b>	<b>Compuestos</b>	<b>Ejemplos</b>	<b>IC<sup>50</sup></b>
<b>Inhibidores proteicos</b>	Subunidades proteicas	ε	15 nM <sup>a</sup>
		IF1	0.25 μM <sup>d</sup>
		ζ	0.44 μM <sup>b</sup>
<b>Inhibidores de policétidos</b>	Macrólidos	Oligomicina	2.5 μg <sup>c</sup>
		Venturicidina	11 μg <sup>c</sup>
<b>Inhibidores catiónicos</b>	TALAs	Tetracaína	1.9 mM <sup>d</sup>
		Trifluoperazina	22.5 mM <sup>d</sup>
<b>Fitoquímicos polifenólicos</b>	Flavonoides e Isoflavonoides	Quercetina	85 μM <sup>d</sup>
		Morin	60 μM <sup>d</sup>
<b>Sustratos y análogos</b>	Iones metálicos divalentes	Mn <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> libres	---
	Nucleótidos de purina	ATP, ADP, GTP	---
<b>Modificador de aminoácidos</b>	Amino modificadores	Fenilglioxal	2.7 μM <sup>c</sup>
	Carboxil modificadores	DCCD	1 mol <sup>a</sup>
		NCCD	1 nmol <sup>c</sup>

a. EF1-ATPasa; b. SBP-ATPasa; c. SMP-ATPasa; d. M-ATPasa

### 1.6.1 Inhibidores proteicos

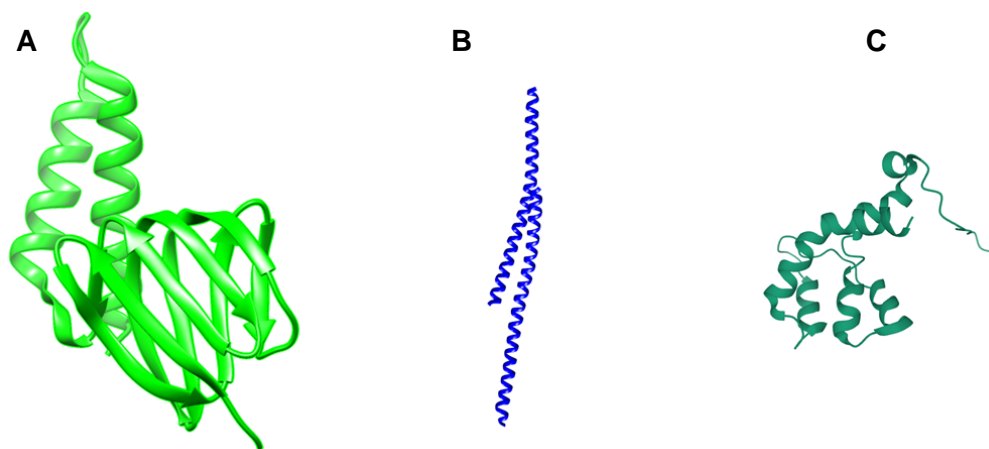
Los inhibidores proteicos básicos son estructuras constituidas principalmente de α-hélices que contienen residuos básicos, los cuales parecen poseer un papel importante en el desarrollo de la actividad inhibitoria. Dentro de estos inhibidores se encuentra la subunidad intrínseca bacteriana/cloroplástica ε, así como las subunidades inhibitoras IF<sub>1</sub> en las mitocondrias y la subunidad ζ hallada en el complejo de *P. denitrificans*.

La subunidad  $\epsilon$  compuesta por aproximadamente 120-140 aminoácidos es una proteína inhibidora endógena de la región  $F_1$  de bacterias y cloroplastos que inhibe la actividad de hidrólisis de ATP (Figura 12A). La inhibición producida por la subunidad  $\epsilon$  está controlada por el gradiente electroquímico y por la relación de las concentraciones de ATP/ADP. Cuando existe una alta  $\Delta\mu$  y baja concentración de ATP, el dominio C-terminal realiza grandes cambios conformacionales en la estructura de horquilla para extenderse dentro de las subunidades  $\alpha/\beta$  (Guo & Rubinstein, 2019). Se ha observado que en la conformación extendida "levantada", la hélice C-terminal se ubica cerca de la subunidad  $\beta$ , y la interacción electrostática directa entre el motivo identificado como  $\beta$ -DELSEED y los residuos básicos del dominio C-terminal conduce a la inhibición de la hidrólisis de ATP (Tsunoda y col., 2001).

La subunidad inhibidora  $IF_1$  es una proteína de 56 a 87 aminoácidos localizada en el complejo mitocondrial que se une a la región  $F_1$  con una relación estequiométrica 1:1. Estudios funcionales con la proteína inhibidora del complejo bovino demostraron que la secuencia inhibitoria mínima se localiza dentro de los residuos 14 a 47, mientras que los residuos flanqueantes se piensa desempeñan solo una función estabilizadora (Figura 12B). Experimentos complementarios con la proteína mostraron que la estructura inhibitoria activa posee una estructura homodimérica en conformación coiled-coil, la cual requiere de dos moléculas de ATP para su formación. El modo de unión de la proteína inhibidora se da dentro de un surco revestido de  $\alpha$ -hélices de los dominios C-terminales pertenecientes a las subunidades  $\alpha_{DP}$  y  $\beta_{DP}$ , mientras que su dominio N-terminal interactúa con la subunidad  $\gamma$ . Dadas estas interacciones se ha sugerido que la acción inhibitoria se lleva a cabo al impedir el cierre de la interfaz catalítica de las subunidades  $\alpha/\beta$  evitando así la hidrólisis del ATP (Walker, 2013). Por su parte, el modo de inactivación de  $IF_1$  se presenta por la formación de una estructura tetramérica a partir de la asociación de dos dímeros. Ante un aumento en los valores de pH las regiones inhibitorias que incluyen a los residuos 9-22 y 23-47 se enmascaran dentro del tetrámero impidiendo su interacción con la región  $F_1$  (Cabezón, 2000).

La proteína inhibidora  $\zeta$  encontrada en la estructura de la ATP sintasa de *P. denitrificans* se une al dominio  $F_1$  mediante los residuos 1-19 del dominio N-terminal

(Figura 12C). Dichos residuos ocupan un espacio entre la interfaz de las subunidades catalíticas  $\alpha/\beta$  que se extienden desde la superficie de la enzima. De manera interesante, se logró observar también que los residuos 3-19 forman interacciones polares e hidrófobas con otros residuos de las  $\alpha$ -hélices pertenecientes al dominio C-terminal de las subunidades  $\alpha_{DP}$  y  $\beta_{DP}$ . En solución, se ha observado que los residuos 1-18 se despliegan de una manera bastante desordenada en interacción con otras cuatro hélices de la misma estructura (residuos 19-42, 46-53, 66-77 y 81-103); conformación que es considerada como la versión inactiva de la proteína. Por su parte, la región N-terminal de  $\zeta$  se une de manera similar a la IF<sub>1</sub> de levadura y bovino, por lo que se piensa que el efecto inhibitor es relativamente parecido al desarrollado por su contraparte mitocondrial. Este modo de acción se propuso a partir de la superposición de los tres inhibidores proteicos, los cuales parecen ocupar la misma posición dentro de la interfaz catalítica de las subunidades  $\alpha_{DP}$  y  $\beta_{DP}$ . Asimismo, como la interacción con las regiones inferiores del dominio C-terminal de las  $\alpha$ -hélices (Morales, 2015).



**Figura 12.** Estructuras de las tres proteínas inhibitoras de ATP sintasa: A)  $\epsilon$  de *Bacillus* PS3 (2E5Y). B) IF<sub>1</sub> de *Bos Taurus* (1GMJ). C)  $\zeta$  de *Paracoccus denitrificans* (5DN6).

### 1.6.2 Inhibidores de policétidos

Los policétidos son metabolitos secundarios de hongos, plantas y animales, lo cuales surgen de la polimerización de subunidades de acetilo y propionilo. Los policétidos son estructuralmente una familia muy diversa de productos naturales con actividades biológicas y propiedades farmacológicas diversas. Algunos macrólidos naturales

(compuestos derivados de policétidos) como la Oligomicina, Venturicidina y Rutamicina presentan una alta actividad inhibidora de ATP sintasa y los sitios de unión caracterizados de estos compuestos se encuentran dentro de la región  $F_0$  de la enzima (Hong & Pedersen, 2008).

La oligomicina inhibe las ATP sintasas de las mitocondrias y las bacterias fotosintéticas, sin embargo, este compuesto tiene un efecto débil sobre la actividad de fotofosforilación en cloroplastos y sobre la actividad de ATPasa en bacterias no fotosintéticas. Estudios de mutagénesis sobre la estructura de levadura reveló el mecanismo de unión de la oligomicina dentro de la interfaz de las subunidades a y c, identificando claramente la participación del residuo Glu59 (Asp61 en *E. coli*) de la subunidad c (Davenish, 2000). Del mismo modo, la venturicidina se une a la subunidad c de la ATP sintasa e inhibe tanto la translocación de protones como la actividad de ATPasa en bacterias, cloroplastos y mitocondrias. Experimentos complementarios de mutagénesis e inhibición revelaron que el modo de acción de este compuesto es relativamente similar al desarrollado por la oligomicina dentro de la región  $F_0$ . Dicho planteamiento fue comprobado tras la adición de estos dos inhibidores y no observar un efecto conjunto (Nagley, 1986).

### **1.6.3 Inhibidores catiónicos**

Los anestésicos locales de amina terciaria (TALAs) son compuestos constituidos por una porción aromática, una cadena intermedia y un grupo amino terminal en donde la hidrofobicidad parece determinar la afinidad por la región  $F_1$ , ya que las potencias inhibitorias están directamente correlacionadas con el coeficiente de reparto octanol/agua. Se sabe que los TALAs inhiben principalmente la entrada de sodio a través de los canales iónicos de la membrana celular neuronal, sin embargo, se ha demostrado que también pueden unirse a la ATP sintasa de mitocondrias y algunas bacterias; resultando en la inhibición de la hidrólisis de ATP (Chazotte, 1982). El mecanismo de inhibición de los TALAs en el complejo mitocondrial sigue siendo algo controvertido, sin embargo, se piensa que la acción se desarrolla por la interacción del compuesto con las porciones hidrofóbicas de varias subunidades de la región  $F_1$  (Laikind, 1982). En contraste con la acción inhibitoria de los TALAs sobre las ATP

sintasas mitocondriales, anestésicos como la tetracaína y la dibucaína inhiben selectivamente las ATP sintasas bacterianas. Un ejemplo de ello es el efecto nulo que poseen los compuestos mencionados sobre el complejo de *Bacillus PS3* pero con una alta efectividad sobre la actividad enzimática de la proteína de *Mycobacterium phlei*. Tras la inhibición (no competitiva) de la ATP sintasa por tetracaína y dibucaína, la conductividad de los protones se muestra marcadamente inhibida. Se sabe también que la tetracaína y el DCCD no son mutuamente excluyentes en su unión a la ATP sintasa de *M. phlei*, por lo que parecen unirse a diferentes sitios dentro de la región  $F_0$  del complejo (Agarwal & Kalra, 1984).

Por su parte, se ha observado que el modo de acción de la clorpromazina y la trifluoroperazina es a través de la interacción de sus estructuras con varias subunidades de las dos regiones del complejo enzimático. Ambos compuestos se unen a las subunidades de la región  $F_0$  con mayor afinidad que a las subunidades de la región  $F_1$ , uniéndose la trifluoroperazina a las subunidades hidrofóbicas de manera más extensa que la clorpromazina. Asimismo, estudios complementarios demostraron que los sitios de unión de la clorpromazina y trifluoroperazina no son idénticos y por tanto no son mutuamente excluyentes en su efecto inhibitorio (Dabbeni-Sala, 1990).

#### **1.6.4 Modificadores de aminoácidos**

##### ***Modificadores de grupo carboxilo***

Los compuestos modificadores de aminoácidos son moléculas que contienen un grupo funcional  $N=C=C$  (carbodimidas) que logran inhibir la actividad de la ATP sintasa modificando los grupos carboxilo de los residuos que se encuentran en las regiones  $F_1$  o  $F_0$ . Las carbodimidas DCCD y NCCD son moléculas lípido solubles que se unen a la ATP sintasa de mitocondrias y algunas bacterias. El compuesto DCCD reacciona covalentemente con la región  $F_1$  mediante un residuo de Glu de la subunidad  $\beta$ . Esta interacción se ha demostrado en las estructuras mitocondriales de bovino (Glu199) y de *E. coli* (Glu192). Se ha logrado determinar la estequiometría de 1 mol de DCCD por 1 mol de  $F_1$  para un 95% de inactivación en la enzima de *E. coli*, mientras que la adición de 2 mol de DCCD resulta en una inhibición del 100% (Yoshida y col., 1982).

Ensayos con la estructura cristalina del complejo  $F_1$ -DCCD de las mitocondrias de corazón bovino, revelaron una molécula de DCCD unida en la región  $F_1$ . En dicha estructura, se logró observar la modificación del  $\beta$ Glu199 de la subunidad  $\beta_{DP}$  ubicado en la interfaz entre las subunidades  $\beta_{DP}$  y  $\alpha_{DP}$ ; lográndose la unión del DCCD en una hendidura hidrófoba en la cara expuesta al disolvente. Residuos de Val164, Met167, Val420 y Phe424 contribuyen a la unión de DCCD y el impedimento estérico generado se cree que inhibe a  $F_1$  mediante el bloqueo del cambio conformacional de  $\beta_{DP}$  a  $\beta_E$  (Gibbons y col., 2000). Por otro lado, se sabe que la acción inhibitoria del DCCD en la región  $F_0$  se presenta debido a la unión covalente con un residuo carboxilo esencial de la subunidad c (Asp61 en *E. coli*). Las estequiometrías para la máxima inhibición de la actividad enzimática son de 1 mol de DCCD por 1 mol de  $F_0$ , es decir, la modificación de 1 subunidad c para inhibir la actividad ATPasa y 2 mol de DCCD por 1 mol de  $F_0$  para inhibir completamente la translocación de protones (Cattell, 1971). Finalmente, se ha demostrado que el NCCD se dirige del mismo modo a la región  $F_0$  de la ATP sintasa y se piensa que el sitio de unión de NCCD es el mismo que ocupa el DCCD, es decir, el residuo de Asp61 de la subunidad c. Dicha aseveración fue corroborada en experimentos de inhibición al observarse que el DCCD impide la unión del NCCD a la ATP sintasa (Azzi y col., 1973).

## II. ANTECEDENTES

La primera estructura de resolución a nivel atómico (2.8 Å) del complejo enzimático se obtuvo mediante la cristalización de la región  $F_1$  de la ATP sintasa mitocondrial de corazón bovino (1994). Bajo este experimento se logró determinar por primera vez la estructura atómica de las subunidades catalíticas  $\alpha/\beta$ , así como su asociación con la subunidad  $\gamma$ . Dicha estructura fungiría como elemento clave para la dilucidación del mecanismo de síntesis de ATP, la cual haría acreedores al premio nobel de química a los doctores investigadores Paul D. Boyer y John E. Walker en 1997. En la estructura heterohexamérica resuelta logró observarse que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  poseen una estructura tridimensional organizada en tres dominios donde la región N-terminal de conformación barril- $\beta$  ubicada en la parte superior del complejo, así como un dominio central de unión a nucleótidos y un dominio helicoidal C-terminal (Abrahams, 1994).

Los tres sitios catalíticos lograron distinguirse dentro de la interfaz de las subunidades  $\alpha/\beta$  con algunas moléculas de nucleótidos unidas a algunas de las conformaciones adoptadas. A partir de la misma estructura logró distinguirse la unión Mg-ADP en el sitio  $\beta_{DP}$ , Mg-AMP-PNP en el sitio  $\beta_{TP}$ , así como la ausencia de cualquier de las moléculas nucleotídicas dentro del sitio  $\beta_E$ . Las subunidades  $\beta_{DP}$  y  $\beta_{TP}$  aparecieron en una conformación cerrada, mientras que la subunidad  $\beta_E$  se mostró adoptando una conformación abierta; en la que el dominio C-terminal y el dominio inferior de unión a nucleótidos se desplazaban hacia abajo permitiendo la apertura del sitio para la correspondiente unión de nucleótidos. La mayoría de las interacciones resultantes entre el nucleótido y las cadenas laterales de aminoácidos son aportadas por la subunidad  $\beta$ , con algunas contribuciones de la subunidad  $\alpha$ . Las tres subunidades  $\alpha$  se denominaron  $\alpha_{DP}$ ,  $\alpha_{TP}$  y  $\alpha_E$  por la asociación que se establecen en la interfaz para la formación de los sitios catalíticos con las subunidades  $\beta_{DP}$ ,  $\beta_{TP}$  y  $\beta_E$ . Por su parte, la región que se resolvió de la subunidad  $\gamma$  consistía en dos  $\alpha$ -hélices en conformación colied-coil. La determinación de esta estructura permitió finalmente establecer el funcionamiento asimétrico de la región catalítica para adoptar las tres conformaciones propuestas responsables de la síntesis de ATP, tal y como había sido propuesto por el profesor Paul D. Boyer en 1993.



Estudios estructurales subsecuentes llevados a cabo con la misma estructura y la implementación de inhibidores de la región  $F_1$  como la aurovertina, efrapeptina y el trifluoroaluminato ( $AlF_3$ ) demostraron contundentemente las conformaciones adoptadas por las subunidades de la región catalítica y revelaron la unión de cada uno los nucleótidos correspondientes al formarse la unión del complejo  $\beta_{DP}-AlF_3$  (Braig y col., 2000). Seguido de estos y varios ensayos más, la resolución de una de las porciones más importantes de la región  $F_0$  fue posible gracias a experimentos de cristalografía de rayos-X con el complejo enzimático de *S. cerevisiae*. Dicha estructura obtenida a una resolución de 3.9 Å demostró por primera vez la estrecha asociación entre la subunidad  $\gamma$  y el anillo oligomérico compuesto por 10 estructuras monoméricas de subunidades  $c$  (Stock, 1999). Las densidades electrónicas de las subunidades individuales  $c$  mostraron estar constituidas por dos  $\alpha$ -hélices unidas por una estructura tipo horquilla, sin embargo, las cadenas laterales de los aminoácidos no pudieron ser resueltas. No obstante, la estructura individual de las subunidades  $c$  mostró ser consistente con la estructura aislada y resuelta por NMR de los monómeros de *E. coli* un año antes (Fillingame y col., 1998).

Algunas de las características más importantes reveladas a partir de los ensayos realizados con la estructura de *S. cerevisiae* fueron la observación del modo de empaquetamiento de los monómeros de subunidades  $c$  que forman los dos anillos concéntricos, así como las interacciones existentes entre los residuos 38, 40 y 42 de la subunidad  $c$  con la subunidad  $\epsilon$ . Otra de las interacciones de suma importancia que pudieron ser determinadas a partir de esta estructura fueron la de las horquillas de dos  $\alpha$ -hélices del anillo oligomérico con la subunidad  $\delta$ , la cual establece distintos contactos con las estructuras mencionadas mediante la interacción por puentes de hidrogeno con las cadenas laterales de los residuos constituyentes de la estructura de barril  $\beta$ . Asimismo, lograron establecerse las interacciones existentes entre las subunidad  $\gamma$  y dos de las subunidades  $c$  del anillo; demostrando con ello de manera complementaria la probable constitución proteica del rotor de la enzima (Stock, 1999).

Al mismo tiempo que se desarrollaron los estudios pertinentes con el tallo central del complejo de ATP sintasa mitocondrial se logró un progreso significativo de esta región

al resolverse la estructura de la subunidad  $\epsilon$  aislada de la enzima de *E. coli* (equivalente a la subunidad  $\delta$  mitocondrial) la cual fue utilizada como estructura molde para el desarrollo de experimentos de entrecruzamiento subsecuentes (Uhlen y col., 1997); siendo esta su mayor aportación a la estructura general del complejo, ya que la resolución de estructuras individuales como esta no proporcionaban información suficiente para la comprensión precisa del mecanismo rotatorio.

Por su parte, en ensayos posteriores la resolución de la región  $F_1$  completa junto con las subunidades del rotor del complejo mitocondrial bovino a una resolución de 2.4 Å demostraría rotundamente la composición del tallo central (subunidades  $c$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ), y lo definiría como elemento clave del mecanismo rotatorio de la enzima. La estructura proveniente de este trabajo reveló del mismo modo la disposición espacial de la subunidad  $\gamma$ , la cual se mostraba dentro del dominio catalítico  $\alpha/\beta$  y sobresaliendo por debajo de él hasta llegar a interactuar con el anillo de subunidades  $c$ . Las subunidades  $\delta$  y  $\epsilon$  se mostraron interactuando con la subunidad  $\gamma$  mediante un pliegue de Rossmann, resultando en la formación de una estructura en forma de pie, la cual se identificó como la estructura responsable de realizar el acople químico-mecánico para la síntesis de ATP llevada a cabo en la parte superior del complejo. Cabe destacar como elemento de interés para el presente trabajo, que la obtención de la estructura a resolución atómica fue lograda únicamente cuando la solución proteica de  $F_1$ -ATPasa fue incubada con el inhibidor DCCD (Gibbons y col., 2000).

Posterior a todos los ensayos realizados para dilucidar gran parte del componente rotatorio de la enzima, el tallo periférico propuesto como el elemento principal del estator no fue resuelto a una resolución óptima sino hasta años posteriores. En donde mediante ensayos de cristalografía con la proteína recombinante de bovino se obtuvo una estructura a 2.8 Å, la cual fungió como evidencia suficiente para demostrar la función estructural de este componente proteico dentro del complejo enzimático. La estructura resuelta consistía de porciones bien definidas de las subunidades  $b$ ,  $d$ , OSCP y  $F_6$ , así como la región  $F_1$  en asociación con el anillo de subunidades  $c$ . El tallo periférico se visualizó como una estructura elongada constituida casi en su totalidad por estructuras  $\alpha$ -helicoidales que no se entrecruzaban pero que si parecían

interactuar entre sí muy estrechamente. La subunidad b se mostró formando una  $\alpha$ -hélice curva continua de aproximadamente 160 Å de largo hasta tener contacto con la superficie de la membrana lipídica. La subunidad d se visualizó con una conformación tridimensional que asemeja a un clip y presentando distintas interacciones hidrofóbicas con varias regiones helicoidales de la subunidad b. La conformación observada de F6 fue similar a la disposición alargada predicha con mucha antelación en donde se propuso que el dominio N-terminal se ubicaba de manera distal a la membrana y la región C-terminal extendiéndose hacia la superficie de la misma. A partir de la obtención de esta estructura lograron establecerse la mayoría de las interacciones existentes entre una de las subunidades  $\alpha$  y OSCP con el resto de las subunidades del tallo periférico, revelando con ello la conexión directa entre la región catalítica de la enzima y la región membranal (Dickson, 2006).

La información estructural anterior sería ampliada por la resolución de la estructura proteica del complejo proveniente del mismo espécimen, pero esta vez a una resolución de 3.2 Å para completar finalmente la parte extrínseca de la membrana de la ATP sintasa mitocondrial. La región resuelta del estator que complementa a la estructura del tallo periférico contenía una porción de la subunidad b, dos segmentos de la subunidad F6, tres segmentos de la subunidad d y la estructura casi completa de la subunidad OSCP (Rees, 2009). La información estructural más importante emanada de este ensayo fue la determinación de las regiones interactuantes de la subunidad OSCP con las subunidades  $\alpha$  y b. El dominio N-terminal de OSCP une el estator con la región  $F_1$  a través de interacciones helicoidales con la región N-terminal de la subunidad  $\alpha_E$ , mientras que la región C-terminal presenta interacciones con la región C-terminal de la subunidad b. La subunidad b volvió a mostrarse como una  $\alpha$ -hélice continua de 160 Å aproximadamente en su forma extendida y la estructura helicoidal parecía poseer una rigidez promovida por su asociación con las subunidades d y F6, aunque logró determinarse que la estructura puede doblarse hacia la región  $F_1$  con cierto ángulo a partir del residuo 146. La región enlazadora entre los dos dominios de OSCP también parecía ser flexible, lo que permite que el estator ajuste su forma a medida que cambia la conformación de las subunidades  $\alpha/\beta$  durante un ciclo catalítico.

Gracias a múltiples ensayos estructurales llevados a cabo en su mayoría mediante la técnica de cristalografía de rayos X la estructura de la región  $F_1$  de la ATP sintasa pudo ser resuelta completamente, sin embargo, hasta ese entonces las estructuras y disposiciones de las subunidades de la región membranal eran desconocidas. El advenimiento y consolidación de la técnica de Crio-ME para la observación de muestras biológicas permitió la obtención de una estructura de ATP sintasa mitocondrial bovina a una resolución de  $\sim 32$  Å (Rubinstein, 2003), de la cual logró obtenerse un mapa de densidad electrónica que guardaba una estrecha similitud con lo observado en las estructuras cristalográficas, así como con los mapas resultantes de las regiones  $F_1$  y  $F_0$  de la estructura proveniente del complejo de *S. cerevisiae* que fueron determinadas posteriormente a una resolución de  $\sim 24$  Å (Lao y col., 2008).

La constante mejora de la técnica de Crio-ME permitió la obtención de una estructura de ATP sintasa bovina a  $\sim 18$  Å que mostraba por primera ocasión las subunidades constituyentes de la región membranal del complejo mitocondrial (Baker y col., 2012). Derivado de este trabajo también fueron revelados los límites de varios subcomplejos de la enzima que concordaban con las estructuras cristalinas disponibles. Asimismo, las disposiciones espaciales de las subunidades alojadas en la región membranal que fueron observadas con antelación lograron ser corroboradas mediante los mapas de densidad resultantes. Las densidades electrónicas atribuidas a la subunidad a y el anillo de subunidades c mostraron tener contactos cercanos en el medio de la región membranal, mientras que la subunidad b se mostró posicionada de forma distal al anillo oligomérico sin generar ningún tipo de contacto con él. Del mismo modo, se pudo seguir la densidad desde el tallo periférico hasta la región membranal, revelando la porción unida de la subunidad b dentro de la membrana. Aunado a las características descritas, información estructural bastante importante fue revelada al observarse un mapa de densidad con una disposición transversal con respecto al plano de la membrana en un ángulo de  $\sim 43^\circ$ , perteneciente a la subunidad a. Del mismo modo, la resolución alcanzada en este ensayo fue lo suficiente como para lograr observar la localización de las subunidades e y g, subunidades proteicas a las que se les atribuiría de manera correcta la capacidad de dimerización de la ATP sintasa mitocondrial.

Seguido de las importantes revelaciones estructurales obtenidas mediante las distintas técnicas mencionadas, un estupendo hallazgo de la región  $F_0$  se obtuvo a partir del aislamiento de una estructura dimerica de ATP sintasa de *Polytomella sp.*, el cual fue resuelto mediante Crio-EM a una resolución de 6.2 Å. La mejora sustancial en la resolución de la estructura mencionada permitió observar por primera vez la conformación y disposición espacial dentro de la membrana de la subunidad a. Con respecto a esto, aunque estudios previos de Crio-EM y entrecruzamiento químico habían sugerido que la subunidad a estaba conformada por cuatro o más hélices verticales, el mapa de densidad electrónica obtenido reveló que las  $\alpha$ -hélices poseían una orientación casi horizontal; una disposición sumamente inesperada por tratarse de una proteína transmembranal (Allegretti y col., 2015).

El mapa de densidad electrónica reveló un haz de cuatro  $\alpha$ -hélices largas dispuestas en dos horquillas en un ángulo casi recto con respecto al anillo de subunidades c. La hélice más larga se encontraba embebida completamente en la parte media de la membrana y se mostraba doblada alrededor del anillo oligomérico en más de un tercio de su longitud. La segunda hélice más larga era casi recta y se encontraba unida a la primera mediante un lazo bastante estrecho. Ambas hélices se mostraron teniendo contacto con el anillo de subunidades c, interacciones que había sido demostradas anteriormente mediante ensayos de entrecruzamiento. La segunda estructura con forma de horquilla estaba constituida por las otras dos  $\alpha$ -hélices más cortas reveladas en el mapa de densidad y se extendían hasta generar contacto con la subunidad b del tallo periférico en el lado de la matriz. Un dato interesante observado en el estudio fue observar la posición de los residuos de Pro dentro de las hélices transmembranales, ubicándose justamente al inicio o fin de estas estructuras. Del mismo modo, se logró identificar un residuo de Arg239 altamente conservado entre los complejos de las especies estudiadas hasta ahora. De manera interesante este residuo fue visualizado cerca de un Glu perteneciente a una de las subunidades c del anillo. Por último, se logró revelar con la estructura obtenida la probable ruta de protones a través de dos hemicanales formados a cada lado de la membrana. A partir de la visualización de estas cavidades se propuso un modelo de translocación de protones que involucraba a varios de los residuos resueltos en el experimento.

De forma paralela a los estudios estructurales llevados a cabo con el complejo enzimático de *Polytomella sp.*, una estructura de ATP sintasa mitocondrial de bovino fue resuelta también mediante Crio-ME, pero esta vez con una mejora sustancial en la resolución obtenida (~6.9 Å) con respecto a la anterior estructura a 18 Å del 2012. La información estructural más relevante emanada a partir de esta estructura fue la visualización de los tres estados conformacionales adoptados en un ciclo catalítico completo de la enzima, así como la reafirmación de la disposición transversal de la subunidad a dentro de la membrana interna mitocondrial observada con poca antelación (Zhou y col., 2015). La clasificación y agrupación de las imágenes de criomicroscopía permitió resolver siete mapas distintos de la enzima, cada uno mostrando una conformación diferente del complejo. Promediando la densidad electrónica de los siete mapas se generó un segmento tridimensional que mostraba las seis  $\alpha$ -hélices constituyentes de la subunidad a, así como la disposición adoptada dentro de la membrana lipídica. Análisis de covarianza evolutiva realizados con la estructura de la subunidad a de diversas especies permitieron la determinación completa de la cadena polipeptídica a través del mapa de densidad resultante. Revelando con ello la presencia del residuo de Arg159 altamente conservado, así como de los residuos Asp y Glu involucrados probablemente en el proceso de translocación de protones por sus características fisicoquímicas. El modelo atómico obtenido de la subunidad a se incorporó a los mapas de los diferentes estados rotacionales, resultando en la determinación de una probable ruta para la translocación de protones, la cual había sido propuesta y denominado anteriormente como mecanismo de trinquete browniano (Junge & Nelson, 2005).

Complementando los estudios mencionados se llevaron a cabo ensayos de entrecruzamiento que establecieron finalmente la composición proteica y organización estructural del complejo ATP sintasa de bovino (Lee y col., 2015). La arquitectura general hasta ahora conocida consta de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , b, d y OSCP de la región  $F_1$  y las subunidades a, b, c, e, f, h, A6L, DAPIT y MLQ que constituyen a la región  $F_0$  que se alojan con un arreglo bastante característico dentro de la membrana. Siendo algunas de estas últimas subunidades las responsables de los arreglos oligoméricos dispuestos a lo largo de la membrana interna mitocondrial.

Tras el éxito obtenido en la obtención de la estructura del complejo ATP sintasa mitocondrial a alta resolución (en su mayoría de la región  $F_1$ ), diversos grupos de investigación continuaron con estudios estructurales del complejo enzimático de varias especies enfocándose en mejorar la resolución de la región  $F_0$ . El propósito principal ha sido revelar completamente la composición proteica de las subunidades pertenecientes a la región membranal, así como las interacciones existentes entre las subunidades responsables de la translocación de protones. A partir del establecimiento de este objetivo, estudios estructurales realizados con la ATP sintasa de la  $\alpha$ -proteobacteria *P. denitrificans* lograron resolver la estructura del complejo intacto mediante cristalografía de rayos X a una resolución de  $\sim 4 \text{ \AA}$  (Morales, 2015).

A partir de la estructura de *P. denitrificans* se logró determinar la composición estructural de la subunidad a, así como algunos de los residuos clave involucrados probablemente en el proceso de translocación de protones. La subunidad a mostró estar conformada por cuatro  $\alpha$ -hélices dispuestas de manera casi horizontal, en un ángulo de  $\sim 30^\circ$  con respecto al plano de la membrana, y localizándose muy cerca del anillo de subunidades c. Asimismo, las asociaciones de las subunidades a, b y c fueron lo suficientemente claras como para poder establecer la formación de los dos hemicanales propuestos como elementos clave en la translocación de protones

Con la estructura obtenida también se pudo determinar el mecanismo de inhibición de la hidrólisis de ATP llevada a cabo en la bacteria por la proteína inhibidora  $\zeta$ , un mecanismo similar al desarrollado por la proteína  $IF_1$  en su contraparte mitocondrial. Del mismo modo se logró resolver a alta resolución los componentes proteicos del tallo central y periférico. La subunidad  $\delta$  (OSCP en mitocondrias) componente del tallo periférico se mostró teniendo interacción con las regiones N-terminal de dos subunidades  $\alpha$ . La estructura completa del tallo periférico se mostró desplegado a través de dos  $\alpha$ -hélices dispuestas de manera paralela al tallo central. Las dos largas hélices pertenecen a las subunidades b y b', estructuras homologas asociadas mediante interacciones en su mayoría hidrofóbicas. Estas subunidades se mostraron alojadas dentro de la membrana e interactuando de manera no especificada con algunas de las estructuras  $\alpha$  helicoidales de la subunidad a.

Después de la estupenda resolución alcanzada en la estructura de la ATP sintasa de *P. denitrificans* que permitió la determinación de características transcendentales de la región membranal, un subsecuente estudio estructural del complejo de *E. coli* llevado a cabo mediante la implementación de la técnica de Crio-ME permitió la determinación de tres estados conformacionales distintos del complejo autoinhibido a las resoluciones de 6.9, 7.8 y 8.5 Å. Las tres conformaciones observadas que se asocian con la rotación de la enzima mostraban al dominio C-terminal de la subunidad  $\epsilon$  de forma extendida y estabilizando a la región  $F_1$  catalítica en cada uno de los estados rotacionales determinados. Del mismo modo, pudieron identificarse las interacciones generadas entre la subunidad  $\delta$  y los dominios N-terminal de la subunidad  $\alpha$  de los tres estados rotativos. Cada mapa generado también confirmó la estequiometría decaamérica del anillo de subunidades c del complejo bacteriano, que hasta ese entonces solo se había caracterizado por ensayos de entrecruzamiento y mutagénesis. La subunidad a de *E. coli* mostró estar constituida por siete  $\alpha$ -hélices transmembranales con una disposición transversal en un ángulo  $\sim 30^\circ$ , tal cual y había sido observado en la estructura de la subunidad a del complejo de *P. denitrificans*. Por último, este estudio logró revelar la longitud completa (incluyendo la región membranal) del tallo periférico del complejo bacteriano revelando los puntos de unión con la región  $F_0$  a través de una bifurcación generada de las subunidades b y b', empaquetándose ajustadamente junto a los dos extremos de la subunidad a (Sobti y col., 2016).

Hoy en día el estudio estructural del complejo ATP sintasa se ha seguido llevando a cabo por varios equipos de investigación en aras de resolver completamente a la región  $F_0$  y con ello el establecimiento de un modelo definitivo del proceso de translocación de protones. Derivado de esto, múltiples estructuras de ATP sintasa han sido resultas a una resolución de entre 3 y 7 Å mediante la técnica de Crio-ME que ha venido ofreciendo estupendos resultados gracias a la mejora en el proceso de obtención y refinamiento de las imágenes generadas. A partir de la consolidación de esta técnica se han obtenido estructuras a distintos niveles de resolución de los complejos mitocondriales de *Yarrowia lipolytica*, estructuras monoméricas y diméricas de *S. cerevisiae* y *Polytomella sp.*, así como un complejo tetramérico de *Sus crofa* (Hahn y col., 2016; Srivistava y col., 2018; Murphy y col., 2019; Gu y col., 2019).



Una de las estructuras más relevantes hasta el momento obtenidas es la perteneciente al complejo ATP sintasa de *Geobacillus stearothermophilus* (*Bacillus PS3*), expresada en una cepa de *E. coli* (DK8) carente del gen que expresa a su correspondiente complejo enzimático. El complejo ATP sintasa fue extraído de las membranas utilizando el detergente glicol-diosgenina y purificado mediante cromatografía de afinidad. Los mapas de densidad electrónica obtenidos a partir del análisis por Criome resultaron en la generación de tres modelos atómicos con resoluciones de 3.0, 3.0 y 3.2 Å de los diferentes estados rotacionales que se presentan al momento de desarrollarse la síntesis de ATP. El refinamiento enfocado de la región  $F_0$  y las subunidades del tallo periférico mejoraron la resolución considerablemente pero no fue suficiente para resolver la densidad electrónica de la mayoría de las cadenas laterales de aminoácidos de una de las subunidades b (Guo y Rubinstein, 2019).

La comparación de los tres estados rotacionales de la estructura resuelta mostraron que la subunidad b presentaba la variabilidad conformacional más significativa entre cada uno de los estados, revelando la gran flexibilidad que posee el tallo periférico bacteriano en comparación con su contraparte mitocondrial que parece tener mayor rigidez. Dicha información estructural sugiere que las subunidades a y el anillo de subunidades c se mantienen unidas mediante interacciones hidrofóbicas y no por las interacciones que pudiera proveer la porción membranal del tallo periférico. Aunado a lo anterior, la estructura de la ATP sintasa determinada evidenció el mecanismo de inhibición llevado a cabo por la subunidad  $\epsilon$  para impedir la hidrólisis de ATP. Bajo este escenario, la subunidad  $\epsilon$  mantiene una conformación extendida permitiendo la inserción de sus estructuras helicoidales dentro de la interfaz catalítica  $\alpha_{DP}/\beta_{DP}$ , forzando a la subunidad  $\beta_{DP}$  a adoptar la conformación abierta promoviendo una nueva ronda de síntesis de ATP. La información estructural más relevante emanada del complejo enzimático de *Bacillus PS3* fue la determinación de la composición proteica de la subunidad a, así como la visualización de la característica disposición transversal adoptada por las estructuras  $\alpha$ -helicoidales. Este particular arreglo de la subunidad a mostró ser muy similar al observado en el complejo de levadura (Srivistava y col., 2018), sugiriendo que la asociación de las subunidades a y b pueden llevar a cabo el mismo funcionamiento que las subunidades suplementarias del complejo mitocondrial.

### **III. JUSTIFICACION**

A pesar de la obtención de diversas estructuras de ATP sintasas de varios organismos utilizando las técnicas de difracción de rayos X y crio-ME, el mecanismo atómico por el cual se desarrolla la translocación de protones no ha logrado ser completamente establecido. Por esta razón, se ha propuesto la optimización del proceso de aislamiento y purificación de la ATP sintasa de *P. denitrificans* para tratar de obtener la mayor cantidad de proteína intacta a utilizar en los experimentos de cristalización y crio-ME.

### **IV. HIPÓTESIS**

La optimización de los procesos de aislamiento y purificación del complejo  $F_1F_0$ -ATP sintasa de *P. denitrificans* resultará en una mejora sustancial de los rendimientos obtenidos de biomasa/proteína, la cual será utilizada en experimentos de cristalografía y crio-ME para resolver la estructura atómica a alta resolución.

## V. OBJETIVO GENERAL

Optimizar y evaluar el proceso global de purificación del complejo F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa de *P. denitrificans* para obtener la mayor cantidad de proteína intacta posible que será utilizada para resolver su estructura atómica a alta resolución.

### 5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Comparar el rendimiento de la relación biomasa/proteína entre dos distintos métodos de cultivo de *P. denitrificans*
2. Optimizar los métodos de aislamiento y purificación de la ATP sintasa de *P. denitrificans*
3. Analizar el efecto de la utilización de dos detergentes distintos en los procesos de purificación y cristalización de la ATP sintasa
4. Evaluar la integridad funcional del complejo enzimático mediante la determinación de actividad enzimática de ATPasa *in vitro* e *in gel*
5. Determinar la integridad estructural de la ATP sintasa de *P. denitrificans* mediante microscopía electrónica de transmisión

## VI. MATERIALES Y METODOS

### 6.1 Cultivo de *Paracoccus denitrificans* cepa PD1222

#### 6.1.1 Determinación de medio de cultivo

Células de *Paracoccus denitrificans* PD1222 (Rif<sup>r</sup>, Spe<sup>r</sup>) fueron cultivadas en dos medios de cultivo distintos (LB y 2XYT) con o sin adición de Acido Succínico al 1 % (cuatro condiciones en total) para tratar de obtener la mejor condición de crecimiento en el laboratorio. Tomamos dos asadas de muestra (almacenada en Glicerol 20%) para inocular 20 ml de cada condición de medio de cultivo y se adicionó Rifampicina a una concentración de 25 µg/ml. Los tubos inoculados se incubaron a 30 °C por 24 h con agitación orbital a 120 rpm. Las células obtenidas de cada una de las condiciones fueron cosechadas por centrifugación y posteriormente tratadas para su análisis en geles de poliacrilamida al 8 %.

#### 6.1.2 Cultivo de *P. denitrificans* en incubadora

Para cada uno de los cultivos de *P. denitrificans* incubados en el laboratorio se ocupó siempre una asada de muestra para inocular 10 ml de medio LB (previamente esterilizado). Bajo estas condiciones se inocularon 40 ml de medio LB contenidos en tubos de 50 ml y se adicionaron 10 µl Rifampicina 100 mg/ml para obtener una concentración final de 25 µg/ml. Los tubos se incubaron a 37 °C con agitación orbital constante (140 rpm) durante 24 h. Habiendo culminado el tiempo de cultivo se tomaron 20 ml de cultivo de cada tubo para inocular 1000 ml (contenidos en matraces bafleados de 2L) de medio LB esterilizado y adicionado con Rifampicina 25 µg/ml. Cada uno de los matraces inoculados con el cultivo anterior (precultivo) fueron incubados bajo las mismas condiciones de tiempo, temperatura y agitación.

#### 6.1.3 Cultivo de *P. denitrificans* en biorreactor

El cultivo del microorganismo en un biorreactor de 5L (escala piloto) fue efectuado utilizando el mismo medio LB adicionado con 25 µg/ml de Rifampicina. El inóculo fue preparado un día anterior bajo las condiciones descritas para la preparación del precultivo. Por tanto, se prepararon y adicionaron 100 ml de inóculo a 5L de medio LB previamente esterilizado. Los parámetros de operación del biorreactor fueron de

temperatura a 30 °C y tiempo de 22 h. Mientras que los valores de pH y agitación fueron variando de 7.0 a 8.0 y de 700 a 800 rpm, respectivamente. La agitación fue llevada a cabo por un agitador de paletas sin perforación y la administración de oxígeno se realizó de manera automática mediante inyección de aire para mantener una pO<sub>2</sub> de ~80%.

## **6.2 Determinación de las condiciones de lisis enzimática por Tinción de Gram**

La tinción de Gram es una técnica de tinción diferencial utilizada para la visualización de la pared celular bacteriana. La distinción radica en la coloración adoptada por los microorganismos, siendo de color rojizo para gram negativos (G-) y azulado para los gram positivos (G+). La tinción se realizó de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Thermo Fisher) y fue utilizada como apoyo para determinar el tiempo de digestión enzimática y concentración de lisozima a utilizar con el propósito de optimizar el proceso de lisis enzimática. La tinción fue aplicada en extractos celulares tratados con buffer de lisis en tiempos de 0, 60, 90, 120, 150 y 180 min, así como con concentraciones de 200 y 300 µg de lisozima por ml de buffer. La visualización de la coloración adoptada se realizó en un microscopio de campo claro a 100x y en un microscopio invertido a 100x utilizando un filtro de contraste de fases.

## **6.3 Determinación de concentración de proteína**

### **6.3.1 Determinación de concentración de proteína por método de Bradford**

La cuantificación de proteína de las muestras fue llevada a cabo mediante la técnica clásica de Bradford, utilizándose BSA (100mg/ml) como estándar de proteína y adicionando 1000 µl de solución de Bradford. Se ocuparon cinco concentraciones distintas de BSA para la generación de la curva estándar. Para las muestras de vesículas invertidas y membranas solubilizadas se adicionaron 5 y 20 µl de una dilución 1:10, mientras que para las muestras provenientes de las cromatografías se adicionaron las mismas cantidades, pero partiendo de fracciones sin diluir. Las determinaciones de cada una de las muestras obtenidas se realizaron por triplicado utilizando celdillas de 1 ml. Todas las lecturas espectrofotométricas se llevaron a cabo a una longitud de 595 nm en un espectrofotómetro GeneQuant 1300 (GE Healthcare).

### 6.3.2 Determinación de concentración de proteína por método de Bradford modificado

La cuantificación de la concentración de proteína de las muestras con la mayor cantidad de lípidos (VI y Mb<sub>s</sub>) fue llevada a cabo mediante la técnica de Bradford modificado, técnica que implementa TCA para la precipitación de compuestos que pudieran interferir con la determinación. Se adicionaron los mismos volúmenes de muestra y BSA ocupados en la metodología estándar, y se completó un volumen de 20 µl con agua destilada en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Se agregaron 100 µl de DOC 0.15 % en cada tubo y seguidamente fueron incubados por 10 min a temperatura ambiente (agitando en vortex cada 5 min). Posteriormente se añadieron 100 µl de TCA 72 % y se incubaron las muestras nuevamente por 10 min a 4 °C (sin agitación). Terminado el tiempo de incubación todos los tubos fueron centrifugados a 14000 rpm por 15 min a 4°C (centrifuga Eppendorf 5415C). Seguido de la centrifugación se retiró todo el sobrenadante de los tubos y la pastilla obtenida fue resuspendida en 100 µl de agua destilada. Después de esto, se adicionaron 900 µl de solución de Bradford y se dejó incubar por 5 min a temperatura ambiente. Inmediatamente se realizó la lectura espectrofotométrica a 595 nm en celdillas de 1 ml y se ocuparon los datos obtenidos para conocer la concentración de proteína de las muestras (mg/ml).

### 6.4 Geles desnaturalizantes SDS-PAGE

Los geles de poliacrilamida denominados como SDS-PAGE por su contenido de Dodecil Sulfato de Sodio como agente desnaturalizante fueron utilizados en este trabajo para identificar a la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa de *P. denitrificans* en cada uno de los pasos de purificación desarrollados. Todos los geles de poliacrilamida al 8% fueron elaborados a partir de una solución de Acrilamida al 30 % (Bio-Rad) en conjunto con agua y un buffer de gel que contiene SDS al 0.5 %. La polimerización de la acrilamida se logra aproximadamente después de 20 min y es promovida por la adición de 40 µl de una solución de PSA al 10 % y 4 µl de TEMED. La carga de las muestras se realizó con respecto a la concentración de proteína (5 a 30 µg), mezclándose previamente con buffer de muestra (1:0.5 v/v). El corrimiento de los geles se llevó a cabo utilizando una fuente poder (Bio-Rad PowerPac) a 120V por aproximadamente 15 min a temperatura ambiente para ser cambiando posteriormente a 140V por 25 min.

## **6.5 Geles azules nativos de 1D (BN-PAGE)**

Geles de poliacrilamida con un rango de concentración de 4 – 13% fueron utilizados para determinar la concentración óptima de detergente (UDM y DDM) a utilizar para la solubilización de las vesículas invertidas aisladas. Se tomaron vesículas invertidas a una concentración de 10 mg/ml y fueron diluidas hasta 5 mg/ml con el buffer de solubilización. Posteriormente se agregaron las cantidades necesarias de detergente para obtener muestras con una relación detergente/proteína (p/p) de 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 y 2.0 mg. El gel fue cargado con 200 y 250 µg de cada muestra, las cuales fueron mezcladas previamente con buffer muestra en una relación 1:1 (v/v). Los geles fueron elaborados con prácticamente los mismos reactivos de los geles SDS-PAGE, aunque sin la adición de SDS al buffer de gel para mantener la estructura nativa de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa. El procedimiento de electroforesis involucró la utilización de un buffer de ánodo y dos de cátodo acorde al procedimiento reportado por Witting y col. (2006); en el que se deben utilizar dos concentraciones distintas de Azul de Coomassie G-250 (Serva) para realzar el contraste de la proteína de interés. El corrimiento de los geles se realizó a 80 V, con 13 mA constantes por 90 min a una temperatura de 8 °C. Después de este tiempo se siguió suministrando voltaje a 120 V y 9mA constantes por 18 h a 8 °C.

## **6.6 Geles desnaturalizantes de 2D**

Tras el corrimiento de los geles BN-PAGE de 1D se procedió a realizar un gel desnaturalizante para verificar el proceso de separación de las muestras. Para ello se cortaron las bandas de los carriles cargados con 250 µg de Mb<sub>s</sub> solubilizadas con las relaciones de 1.0 y 2.0 mg DDM/mg Proteína y se incubaron en un tubo Eppendorf con 1 ml de Tris-HCl 50 mM por 3h a temperatura ambiente. La carga de la muestra se realizó en tres carriles con 20, 10 y 5 µl de la solución obtenida, la cual fue mezclada previamente con una relación 1:1 (v/v) de buffer de muestra. El corrimiento del gel se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que los geles desnaturalizantes SDS-PAGE para después ser teñido por 30 min con una solución de tinción que contiene azul de coomasie. El gel fue desteñido posteriormente con una solución de Metanol-Ácido acético por 1h a temperatura ambiente.

## **6.7 Aislamiento de vesículas invertidas de *P. denitrificans***

Un volumen de 8 L de cultivo bacteriano fue cosechado en botes de 1 L mediante centrifugación a una velocidad de 6000 rpm (centrifuga Beckman Coulter; rotor JA8-1000) por 30 min a 4 °C. La visualización de una pastilla de color rosado denoto la eficiencia del proceso de incubación y cosecha; evaluado a través del pesaje de dicha pastilla (peso húmedo). Tras la obtención de la mayor cantidad de células posible, fueron tomadas 100 g de células para cada preparación de vesículas invertidas. Acorde a una relación de 1 g células/10 ml de buffer de lisis se prepararon 1000 ml de buffer con Tris HCl 10 mM; pH 7.4, Sacarosa 500 mM, EDTA 5 mM; pH 8.0 y 330 mg de lisozima. Las células fueron tratadas con el buffer de lisis por 3 h a temperatura ambiente con agitación magnética constante. El extracto celular obtenido fue centrifugado a 11000 rpm por 20 min en un rotor JA14 para posteriormente ser resuspendidas en un buffer que contiene Tris-HCl 10 mM; pH 7.4, ATP 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM suministrado con Benzamidina 7 mM y PMSF 2 mM como inhibidores de proteasas. La suspensión de extracto celular fue sometida a un proceso de digestión de DNA por 30 min a 25 °C adicionando 10 mg de DNAasa I (Roche; 2900 U). Culminado el tiempo de digestión y observado un cambio de viscosidad en el extracto, la suspensión fue centrifugada en un rotor JA20 a 15000 rpm por 40 min a una temperatura de 4 °C. La película roja formada en la superficie de la pastilla formada fue resuspendida en un buffer de lavado para ser separada de los fragmentos celulares más pesados. El buffer de lavado es preparado con Tris-HCl 10 mM; pH 7.4, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Benzamidina 7 mM y PMSF 2 mM. La suspensión de membranas fue nuevamente centrifugada en el rotor JA20 a 16000 rpm por 40 min a 4°C y resuspendida finalmente en 20 ml de un buffer que contiene Tris HCl 10 mM; pH 7.4, Sacarosa 250 mM, Glicerol 10%, ATP 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, EDTA 5 mM, Benzamidina 7 mM y PMSF 2 mM. Las porciones de vesículas invertidas obtenidas fueron almacenadas a -70°C para su posterior utilización en el proceso de solubilización.

## **6.8 Solubilización de membranas aisladas**

Vesículas invertidas obtenidas del proceso de aislamiento (20 ml; ~10 mg/ml) fueron diluidas a una concentración de 5 mg/ml utilizando un buffer de solubilización que



contiene ácido aminocaproico 750 mM (EACA) y Bis-Tris 50 mM; pH 7.0. Para el proceso de solubilización se ocuparon los detergentes Dodecil- $\beta$ -D-maltosido (DDM) o Undecil- $\beta$ -D-maltosido (UDM) en una relación de 0.5g de detergente por 1g de proteína cuantificada. Los detergentes fueron adicionados gota a gota para promover una correcta disolución. El proceso de solubilización fue llevado a cabo con agitación magnética por un tiempo de 30 min en un baño de hielo. Las membranas solubilizadas fueron posteriormente centrifugadas a 40000 rpm (ultracentrífuga Optima L-90K, rotor 70Ti) por 30 min a 4 °C para lograr la separación del contenido no solubilizado.

### **6.9 Purificación de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa por cromatografía de intercambio aniónico**

Muestras de Mb<sub>s</sub> fueron llevadas hasta una concentración de 5 mg/ml (~40 ml) con buffer de solubilización para posteriormente ser cargadas en un equipo de cromatografía AKTA Pure (GE Healthcare). El sistema de cromatografía constó de cuatro columnas con un arreglo en serie, comenzando con dos columnas HisTrap HP (5 ml; GE Healthcare); una cargada con iones níquel (1.5 VC de NiSO<sub>4</sub>) y otra con iones cobre (1.5 VC de CuCl<sub>2</sub>). Ambas columnas fueron previamente lavadas con 5 VC de H<sub>2</sub>O filtrada y 5 VC de EDTA 100 mM. El arreglo de columnas fue completado acoplando dos columnas HiTrap Q HP (5 ml; GE Healthcare), que fueron lavadas previamente con 5 VC de EDTA 100 mM y 5 VC de NaCl 0.5 M. El arreglo completo fue lavado con 10 VC de H<sub>2</sub>O filtrada y posteriormente equilibrado con 10 VC de un buffer elaborado con Tris-HCl 50 mM; pH 7.4, Glicerol 10%, ATP 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, DDM/UDM 0.05%, Sacarosa 250 mM, Benzamidina 7 mM y PMSF 2 mM (Buffer A). Después del proceso de equilibrio se procedió a la inyección de la muestra de Mb<sub>s</sub> de *P. denitrificans* a través del sistema de inyección automático del equipo. Culminada la inyección de la totalidad de la muestra se realizó un lavado con 5 VC de Buffer A para posteriormente ser retiradas las columnas cargadas con iones de Ni y Cu. Las dos columnas HiTrap Q HP restantes fueron sometidas a un proceso de elución con un buffer de elución que contiene 500 mM de NaCl preparado en Buffer A (Buffer B). La elución fue llevada a cabo mediante un gradiente escalonado de 10, 20, 30, 37, 42, 47, 55, 75 y 100% de Buffer B. La elución de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa se logró identificar siempre en los pasos de 42 y 47%, correspondientes a 210, 230 mM de NaCl.

## **6.10 Purificación de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa por cromatografía de exclusión molecular**

Las fracciones de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa de *P. denitrificans* obtenidas en el paso de purificación anterior (IA) previamente identificadas en los geles desnaturalizantes SDS-PAGE fueron colectadas y concentradas por centrifugación a 3200 rpm (centrifuga SDRVALL ST8R) en tubos Amicon de corte 100 KDa hasta un volumen de 500 µl para su posterior inyección al equipo de cromatografía. Las dos muestras concentradas de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa (500 µl, 20 mg/ml) fueron inyectadas por separado en una columna de filtración en gel Superose 6 Increase 10/300 GL (24 ml, GE Healthcare), la cual fue previamente equilibrada con 2 VC de Buffer A. La elución fue llevada a cabo utilizando 2 VC de Buffer A con un flujo de 0.5 ml/min y recolectando las fracciones obtenidas en volúmenes de 500 µl. Las fracciones de las dos muestras identificadas en los geles desnaturalizantes se colectaron y concentraron por separado hasta una concentración de proteína final de 15 mg/ml. El volumen final obtenido por cada pico de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa fue de aproximadamente 250 µl.

## **6.11 Determinación de actividad de ATPasa *in vitro***

La medición de la actividad de hidrólisis de ATP se realizó para monitorear y evaluar cada uno de los pasos de purificación empleados en la obtención de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa. En la determinación se empleó un buffer de actividad que contiene Tris-HCl 50 mM; pH 7.4, K CH<sub>3</sub>COO 10 mM, Mg (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> 3 mM. El buffer de actividad fue utilizado en la mezcla de reacción en conjunto con ATP 300 mM, LDAO 10 %, PEP 500 mM, NaSO<sub>3</sub> 1 M y NADH 300 mM. La reacción de hidrólisis de ATP es promovida por la adición de una mezcla enzimática con 6 y 8 U/ml de Piruvato cinasa (PK) y Lactato deshidrogenasa (LDH), respectivamente (García, 1995). La reacción se inició al momento de agregar el volumen específico de la muestra a la mezcla de reacción y dejando incubar por 2 min. Lecturas espectrofotométricas fueron tomadas cada segundo en un intervalo de tres minutos a una longitud de onda de 340 nm para medir la disminución de la absorbancia del NADH en el lapso de un minuto. Dada la estequiometría de la reacción enzimática acoplada (1 mol NADH oxidado por 1 mol ATP hidrolizado) y el coeficiente de extinción molar del NADH fue posible calcular la actividad enzimática reportada como µmoles de ATP hidrolizado/s.

### **6.12 Determinación de actividad de ATPasa *in gel***

La verificación de la integridad estructural y funcional de la  $F_1F_0$ -ATP sintasa de cada uno de los pasos de purificación se realizó también a través del desarrollo de geles BN-PAGE que fueron incubados posteriormente en buffer de actividad de ATPasa que contiene Glicina 50 mM; pH 8.5,  $Pb(CH_3COO)_2$  0.15 %,  $MgCl_2$  7.5 mM, ATP 5 mM,  $NaSO_3$  1 mM y LDAO 0.15 %. El gel fue cargado con muestras provenientes de cada uno de los pasos de purificación (5  $\mu$ g), y mezclando con buffer de muestra en una relación 1:1 (v/v). El proceso de electroforesis fue llevado a cabo acorde al procedimiento descrito para los geles BN-PAGE a 120 V por 40 min. Inicialmente los geles se sometieron a 40 mA constantes por 20 min realizando un cambio de buffer de cátodo (0.002% azul Serva) para después continuar la corrida a 2 5mA constantes por otros 20 min. Culminado el proceso de electroforesis el gel fue incubado en el buffer de actividad toda la noche a 30 °C. La actividad es detectada a partir de un precipitado de  $Pb_3(PO_4)_2$  que se observa únicamente en las bandas que contienen a la proteína.

### **6.13 Visualización estructural de $F_1F_0$ -ATP sintasa por ME de transmisión**

Para la verificación de la integridad estructural de la ATPasa se utilizaron muestras purificadas por cromatografía de EM a una concentración de 15 mg/ml, las cuales fueron diluidas con buffer Tris-HCl 50 mM hasta una concentración de 2 mg/ml y 5 mg/ml para determinar la concentración óptima de proteína a utilizar. Habiendo determinado la concentración óptima, muestras de 2  $\mu$ l fueron añadidas en rejillas de cobre para posteriormente ser incubadas por 2 min. El exceso de muestra fue absorbido con papel filtro milipore (0.025 micras) y después teñido agregando 2  $\mu$ l acetato de uranilo 2 %, siendo incubado por otros 2 min y retirando el exceso del mismo modo. Las muestras ya cargadas fueron analizadas haciendo uso del microscopio Jeol ARM200F, el cual cuenta con una resolución de hasta 0.8 Å.

### **6.14 Cristalización de $F_1F_0$ -ATP sintasa de *P. denitrificans***

El proceso de cristalización para la  $F_1F_0$ -ATP sintasa de *P. denitrificans* se realizó acorde a la metodología utilizada por Morales y col. (2015). Se tomaron muestras de proteína a 15 mg/ml provenientes de los dos picos (pk1 y pk2) obtenidos del proceso

de purificación, y los cuales se encuentran diluidas en buffer de elución (Buffer A). Cada una de las muestras fue diluida en una proporción 1:1 (v/v) en un buffer con Tris-HCl 50 mM; pH 8.0, al momento de ser colocadas en la placa de cristalización. La cristalización fue llevada a cabo por la técnica de difusión de vapor por gota sentada en la que se añadió 1  $\mu$ l de solución de proteína y 500  $\mu$ l de licor madre (Tris-HCl 50 mM; pH 8.0, MgCl<sub>2</sub> 60-150 mM, PEG 4000 10-20 %) en cada uno de los 96 pozos de la placa. Los cristales fueron incubados a 25 °C por alrededor de 20 días, siendo monitoreando diariamente utilizando un microscopio estereoscópico. Tras la obtención de los cristales de proteína apropiados para su difracción se pretende la adición de los inhibidores específicos de las regiones F<sub>1</sub> (Tetrafluoperazina y Quercetina) y F<sub>o</sub> (Tetracaína y DCCD) a una concentración de 100  $\mu$ M. La utilización de los inhibidores específicos de ATPasa mencionados, fueron planteados dada la experiencia previa en la implementación del compuesto DCCD como aditivo de cristalización para promover una mejora en la resolución estructural del complejo enzimático..

### **6.15 Análisis estructural mediante Crio-ME**

Muestras de ATP sintasa de *P. denitrificans* recién purificadas y optimizadas a una concentración de 5 mg/ml fueron enviadas al Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad de Estocolmo, Suecia para ser analizadas mediante Crio-ME en colaboración con el Dr. Alexey Amunts. La obtención de la estructura atómica se realizará a partir de 2  $\mu$ l de muestra (2 mg/ml) que se colocan en rejillas de cobre Quantifoil R1.2/1.3, las cuales son previamente descargadas por incandescencia al aire. Las rejillas cargadas con la muestra son posteriormente sumergidas por tres segundos en una mezcla etano/propano líquido para lograr el proceso de vitrificación. La captura de imágenes se realiza en un criomicroscopio modelo Titan Krios G3 operado a 300 KV utilizando una cámara Quantum K2 operada mediante el software EPUS. Los parámetros de exposición propuestos inicialmente son 4 electrones/píxel/s basados en el trabajo previo del Dr. Amunts para la obtención de la estructura de la ATP sintasa de *Euglena gracilis* (Muhleip y col., 2019). El posterior proceso de identificación, corrección y refinamiento de las imágenes para el modelamiento de la estructura atómica se realizará utilizando los softwares MotionCor2, Gctf y RELION-3.

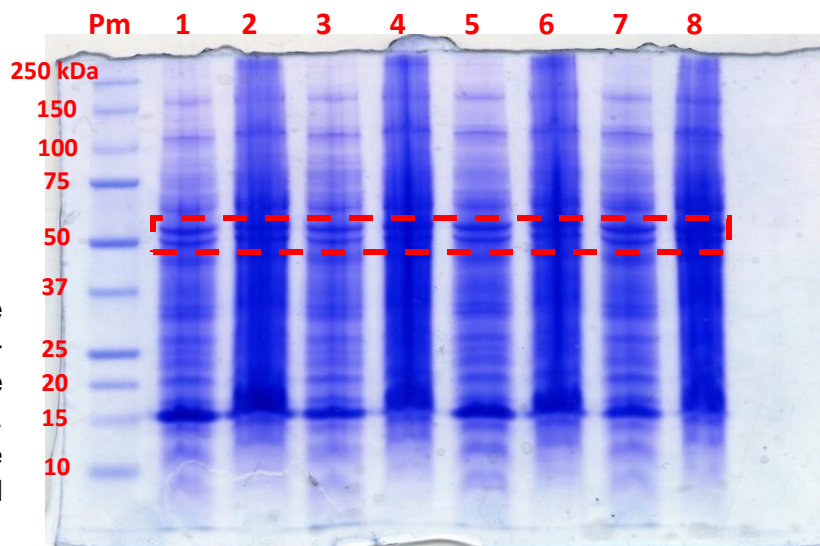
## VII. RESULTADOS

### 7.1 Determinación de condiciones para cultivo de *P. denitrificans*

#### 7.1.1 Selección de medio de cultivo para crecimiento de *P. denitrificans*

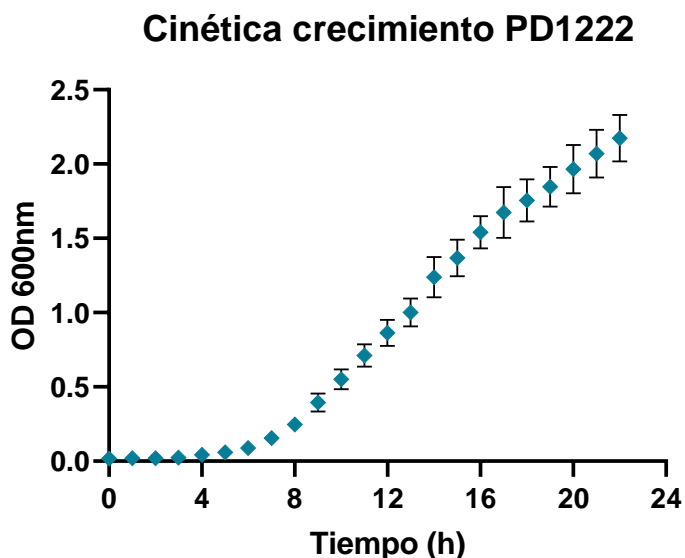
Los cultivos de *P. denitrificans* cepa PD1222 fueron producidos a partir de placas con medio LB y Rifampicina 25 µg/ml incubadas por 24 h a 30 °C. Se tomaron muestras para resguardar la cepa a -70°C para posteriormente ser utilizadas como inóculo inicial de los precultivos (10ml). Se probaron dos medios de cultivo distintos para seleccionar el medio óptimo para el crecimiento del microorganismo bajo condiciones de laboratorio. Los medios utilizados fueron Luria-Bertani (LB) y medio 2XYT, ambos suplementados o no con Ácido Succínico a una concentración del 1 %. Después de la incubación por 24 h cada uno de los cultivos fueron cosechados y tratados para ser analizados en geles desnaturalizantes SDS-PAGE al 8 % (Figura 13). La ATPasa fue identificada mediante los geles de poliácridamida correspondientes, revelando el bandeo característico del heterohexámero compuesto por las subunidades  $\alpha/\beta$  (55.1/50.3 KDa) pertenecientes a la región catalítica de la enzima, las cuales se muestran cerca de la banda de 50 KDa del marcador de peso molecular. Este perfil electroforético fue visible en los ocho carriles suministrados con 10 y 20 µl de cada uno de los cultivos incubados de los cuales no pudo identificarse una diferencia aparente en el nivel de expresión de las subunidades proteicas; mostrando con ello que el medio de cultivo LB es suficiente para lograr un buen crecimiento del microorganismo.

**Figura 13.** Gel de poliácridamida 8 % SDS-PAGE de muestras de cultivos de *P. denitrificans*. Las subunidades  $\alpha/\beta$  de ATPasa se encierran en el recuadro rojo punteado.



### 7.1.2 Cultivo y cinética de crecimiento de *P. denitrificans*

El cultivo de la cepa de *Paracoccus denitrificans* PD1222 se realizó utilizando medio LB (sin ácido succínico) como fuente de C y N. Se inició el cultivo con un inóculo de 20 ml de precultivo para cada litro de macrocultivo, incubándose por 24 h bajo las condiciones de laboratorio establecidas (ver Materiales y Métodos). El crecimiento se llevó a cabo en una incubadora de agitación orbital por 22 h a 30 °C constantes sin inyección de oxígeno o aire. Procedente de los cultivos cosechados se obtuvo una cinética de crecimiento con tendencia sigmoïdal y una pendiente poco pronunciada (Figura 14). Distinguiéndose con ello un crecimiento bastante lento en comparación con otros microorganismos mesofílicos como *E. coli*.

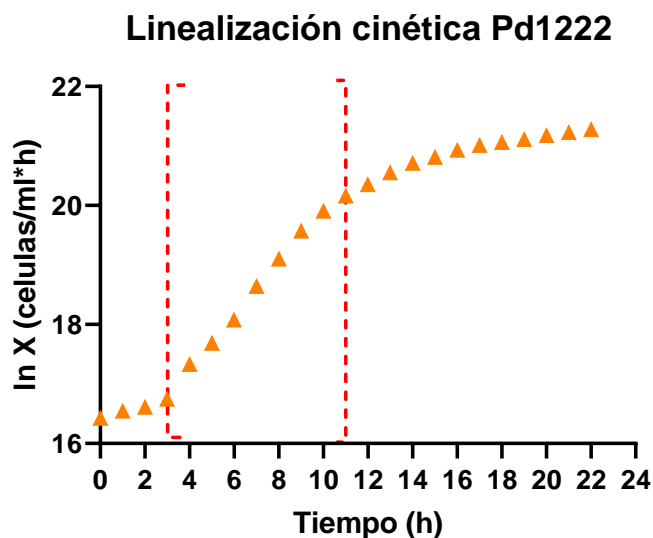


**Figura 14.** Cinética de crecimiento de *P. denitrificans*. La cinética de crecimiento obtenida fue usada para estimar las fases de crecimiento. El ensayo se realizó por cuadruplicado y los valores de OD<sub>600</sub> se grafican con sus respectivas desviaciones estándar.

De la cinética graficada mostrada se estimaron las fases de latencia (lag) y crecimiento exponencial (log) de la cepa en las 22 h de cultivo. La fase lag se identificó desde el comienzo del cultivo y hasta aproximadamente las 8h, ya que desde este punto se comenzó a registrar un aumento considerable en las lecturas de OD<sub>600</sub>. Por su parte, la fase exponencial se identificó desde las 8 h y hasta aproximadamente las 20 h. El registro de las últimas 2h de cultivo si bien se sigue mostrando un ligero incremento

en los valores de OD<sub>600</sub>, se decidió considerar como el inicio de la fase estacionaria debido a una disminución significativa en los valores de velocidad de crecimiento. Finalmente, al momento de la cosecha del cultivo se registró un valor OD<sub>600</sub> de 2.174 ± 0.157 y una biomasa total de 8.023 g/L (peso húmedo).

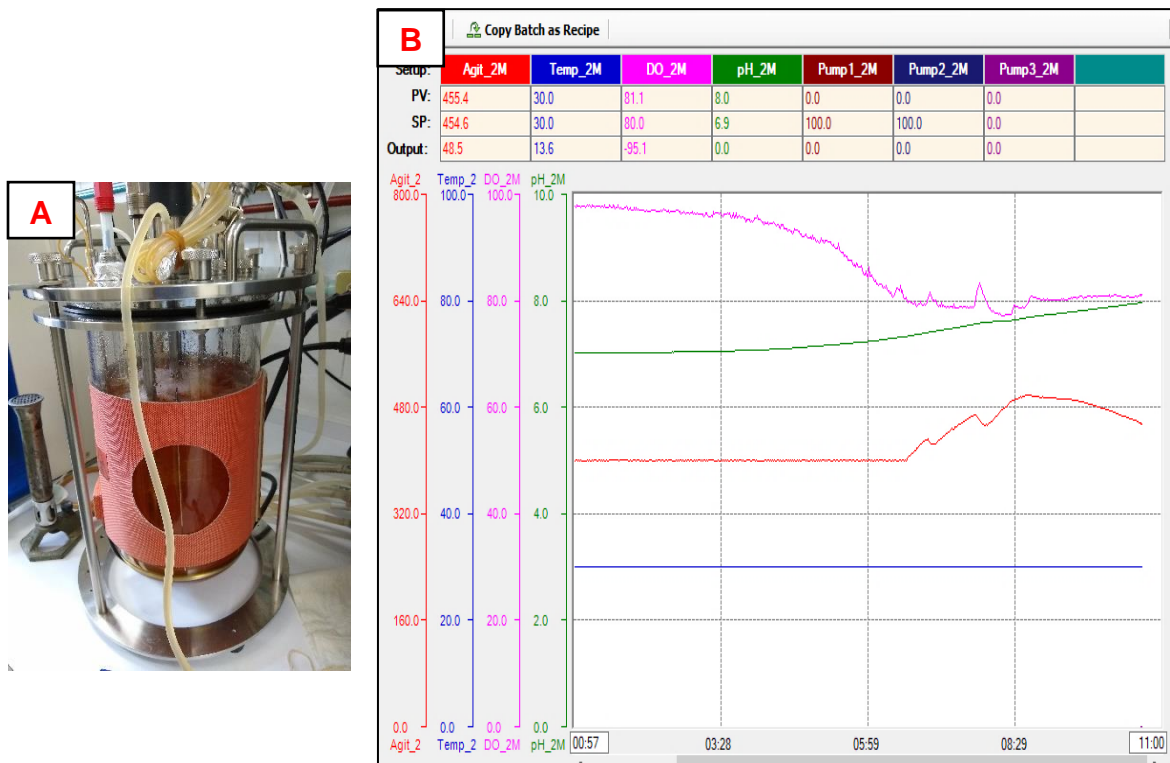
A partir de la cinética de crecimiento obtenida se procedió a realizar una linealización de los valores de velocidad de crecimiento (células/ml\*h), las cuales fueron calculadas utilizando los valores de OD<sub>600</sub> de cada uno de los tiempos registrados (Figura 15). Derivado del grafico generado se estimó el tiempo de crecimiento exponencial (3 – 11h) y se obtuvo la ecuación empírica de crecimiento  $y = 0.4361x + 15.528$ . Haciendo uso de dicha ecuación se logró calcular un valor de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de 0.436 células/ml\*h y un tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de 96 min.



**Figura 15.** Linealización de la cinética de crecimiento de *P. denitrificans*. El intervalo de tiempo estimado con la mayor velocidad de crecimiento se delimita las líneas punteadas.

Dados los resultados obtenidos del cultivo bajo condiciones de laboratorio se decidió intentar aumentar la producción de biomasa haciendo uso de un biorreactor de 5 L con inyección de aire para el suministro de O<sub>2</sub>. La propuesta fue llevada a cabo con el fin de aumentar la velocidad de crecimiento del microorganismo al aprovechar la cantidad de O<sub>2</sub> que puede ser suministrado por los instrumentos del biorreactor.

Se realizó un precultivo de 100 ml incubado bajo las condiciones de laboratorio para inocular los 5 L de medio LB contenidos en el biorreactor. Por su parte, el proceso fue debidamente monitoreado a través del software del panel de control (Figura 16). En el desarrollo del proceso se logró observar el crecimiento del microorganismo a partir del registro de valores de demanda de oxígeno (DO) después de las 6 h, muy acorde a lo observado en los cultivos incubados en el laboratorio. Este aumento se mantuvo por aproximadamente 16 h hasta que se registró una disminución en los valores de DO, así como un aumento de los valores de pH del medio. Del mismo modo, se observó un aumento en la velocidad de agitación, la cual fue programada para tratar de aumentar el nivel de O<sub>2</sub> disuelto en el medio y seguir promoviendo el crecimiento. En el momento de la cosecha se registró un pH de 8.0, DO de 81.1 y una temperatura de 30 °C, la cual se mantuvo constante durante todo el proceso. La biomasa obtenida al final del proceso fue de 24.2 g/L (peso húmedo), lo que corresponde a una biomasa 3 veces mayor a la obtenida bajo condiciones de laboratorio.

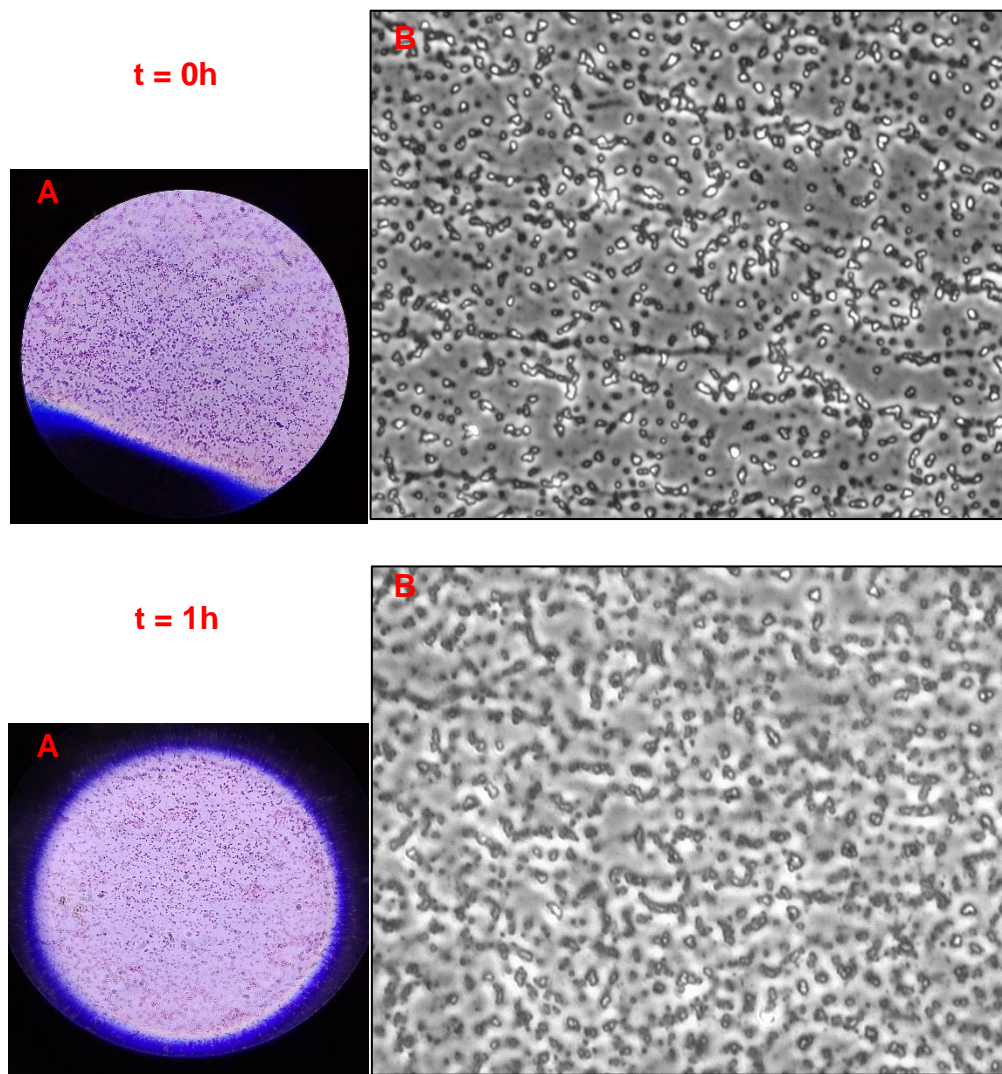


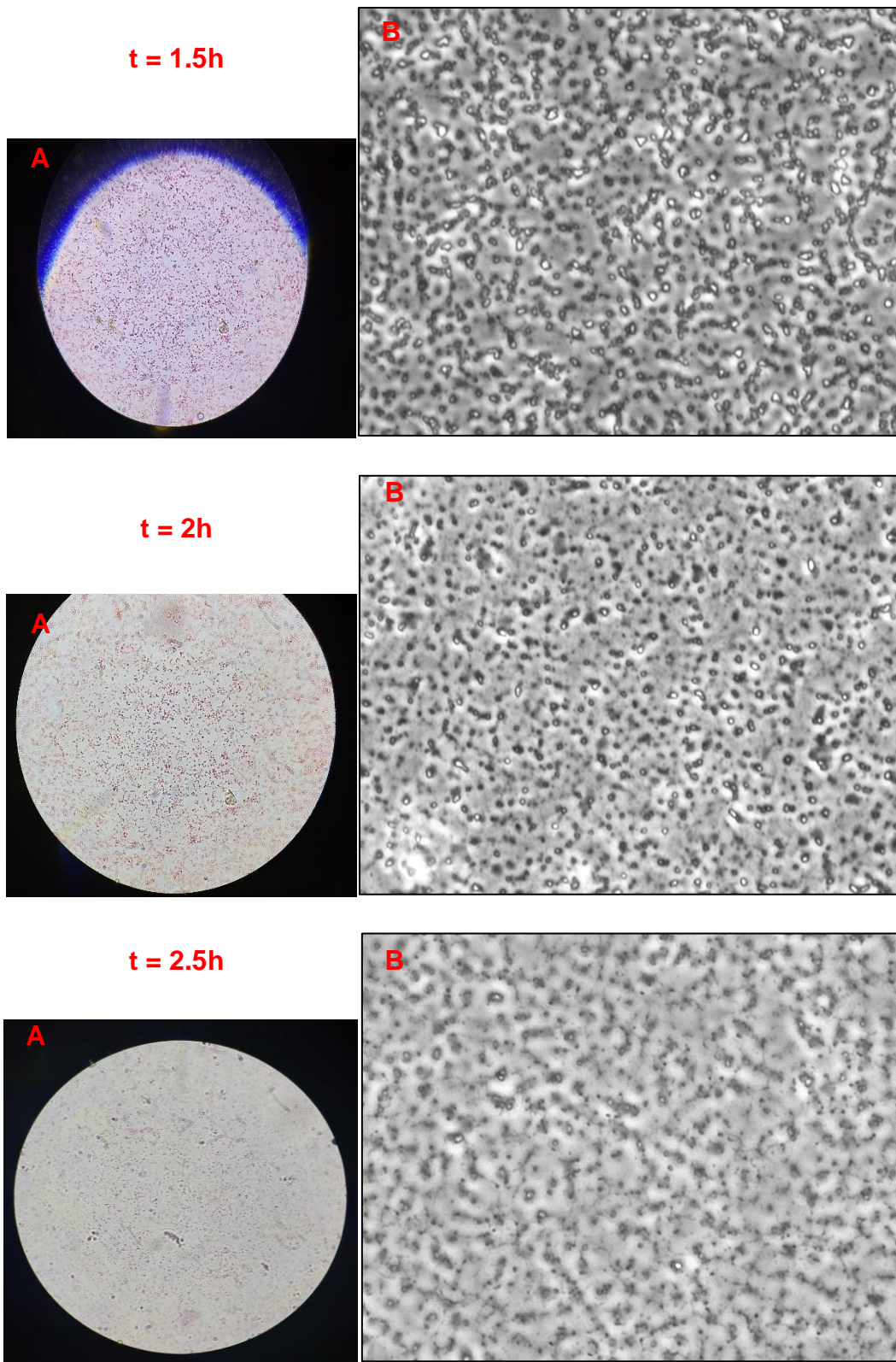
**Figura 16.** A) Cultivo de *P. denitrificans* en un biorreactor de 5L. B) Seguimiento de los parámetros de operación: velocidad de agitación (línea roja), temperatura (línea azul), demanda de oxígeno (línea rosa) y pH (línea verde).



## 7.2 Determinación de las condiciones óptimas para el aislamiento de VI

Con el propósito de obtener un mejor rendimiento de proteína proveniente de las membranas aisladas de *P. denitrificans*, se propuso la optimización del proceso de lisis enzimática proponiendo la adición de dos cantidades distintas de lisozima a utilizar (200 y 330  $\mu\text{g/ml}$ ). Del mismo modo, se propuso determinar el efecto del tiempo de acción de la lisozima agregada en el proceso de digestión (0, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5), mediante la implementación de una tinción de Gram y una posterior evaluación de la morfología microscópica. Dicha técnica fue propuesta para observar directamente el adelgazamiento y ruptura de las membranas del microorganismo a través de la coloración adoptada por estas en los distintos tiempos digestión (Figura 17).





**Figura 17.** Morfología microscópica de cultivos de *P. denitrificans* tratados mediante lisis enzimática en distintos tiempos (300 mg). A) Campo claro 100x B) Contraste de fases 100x.

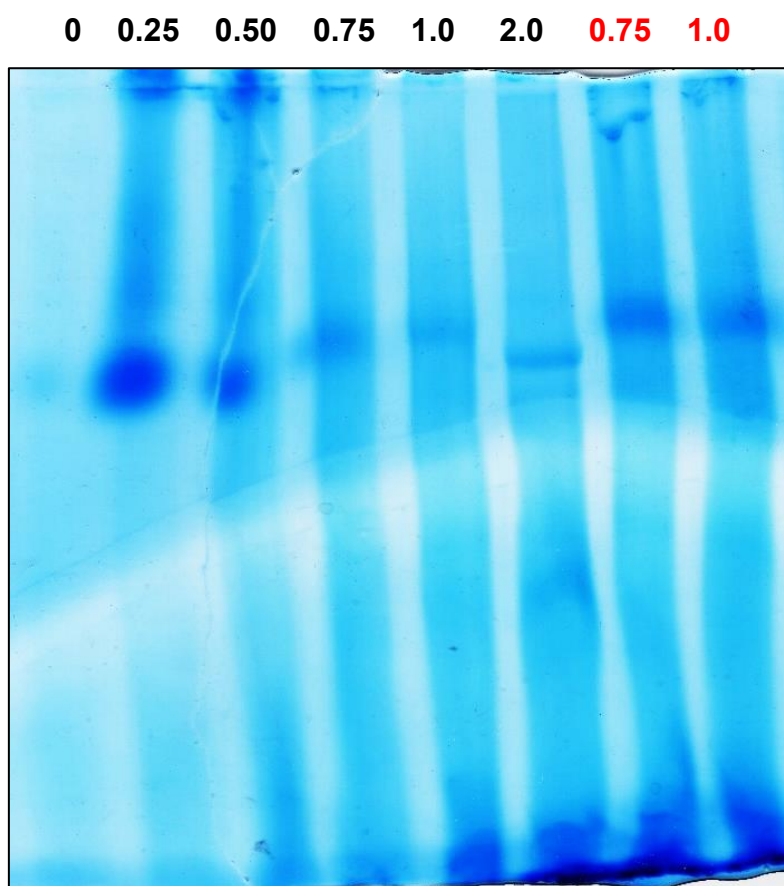
Como puede observarse en las micrografías obtenidas, la cepa de *P. denitrificans* se trata de un microorganismo gram negativo dada la coloración adoptada por las membranas después de la tinción. En los frotis realizados con el extracto celular del tiempo cero se logró observar la morfología microscópica característica de esta cepa bacteriana, es decir, cocobacilos no esporulados de tamaños entre 0.6 y 1.0  $\mu\text{m}$ . Por otra parte, no se observó la presencia de flagelos demostrando con ello la nula motilidad reportada de este microorganismo. A partir de las mismas muestras se logró distinguir un modo de duplicación (división) por fisión transversal. Finalmente, la alta viscosidad presente en todos los cultivos de la cepa se debe principalmente a la producción de Ácido poli- $\beta$ -hidroxibutirato; derivado del metabolismo secundario.

La progresión en el tiempo del tratamiento con lisozima reveló el efecto directo sobre la pared celular de la cepa, mostrándose una clara disminución de la coloración de la tinción después de la primera hora de digestión. En la micrografía de contraste de fases del extracto celular analizado también en este tiempo, se observó la primera evidencia de la pérdida progresiva de la integridad de la pared celular, sin embargo, el efecto no fue el suficiente como para lograr la pérdida de la morfología cocoide del microorganismo. Las imágenes obtenidas a partir del extracto tratado por 1.5 h ponen de manifiesto el efecto leve que tiene el tratamiento enzimático en un lapso de 30 min, ya que, tanto la disminución en la coloración de la pared celular como la morfología microscópica no muestran una diferencia contundente con respecto a la muestra del tiempo anterior. La percepción de la pérdida de coloración de las membranas logró observarse únicamente hasta después de 2 h iniciado el tratamiento como se muestra en las imágenes de campo claro. Del mismo modo, muestras analizadas por contraste de fases evidenciaron la pérdida progresiva de la morfología microscopía del microorganismo, aunque en algunos campos fue posible observar algunos cocobacilos intactos. Por último, el análisis microscópico realizado del extracto celular tratado con lisozima por 2.5 h reveló una pérdida casi completa de la tinción, signo de la ruptura de la pared celular. Asimismo, la última micrografía por contraste de fases revela la desintegración prácticamente completa de la pared celular al no poder observarse en ningún campo la morfología descrita. Dado lo anterior se demostró que un tiempo de 2.5 h de tratamiento es suficiente para lograr la degradación de la pared celular.



### 7.3 Determinación de la concentración óptima de detergente para solubilización

Habiendo obtenido las condiciones idóneas para la preparación de las VI se propuso un ensayo para determinar la concentración óptima de detergente para lograr una correcta solubilización de la ATP sintasa contenida en las membranas aisladas. Se implemento un gradiente de concentración de 0, 0.25, 0.50, 0.75 1.0 y 2.0 (mg DDM/mg proteína) de DDM en función de la proteína total cuantificada en las VI. Los geles BN-PAGE 4-13% fueron cargados con muestras de 200 µg de proteína solubilizada con las respectivas concentraciones de detergente a evaluar. El análisis del gel reveló principalmente el perfil electroforético del complejo monomérico esperado (ATP sintasa); identificado como una banda teñida con azul de coomasie R-250 (Figura 18).



**Figura 18.** Análisis proteico de ATPasa por BN-PAGE 4-13% proveniente de VI aisladas de *P. denitrificans* solubilizadas con distintas relaciones de DDM. La visualización del complejo proteico se debe a la tinción con Coomasie R-250.

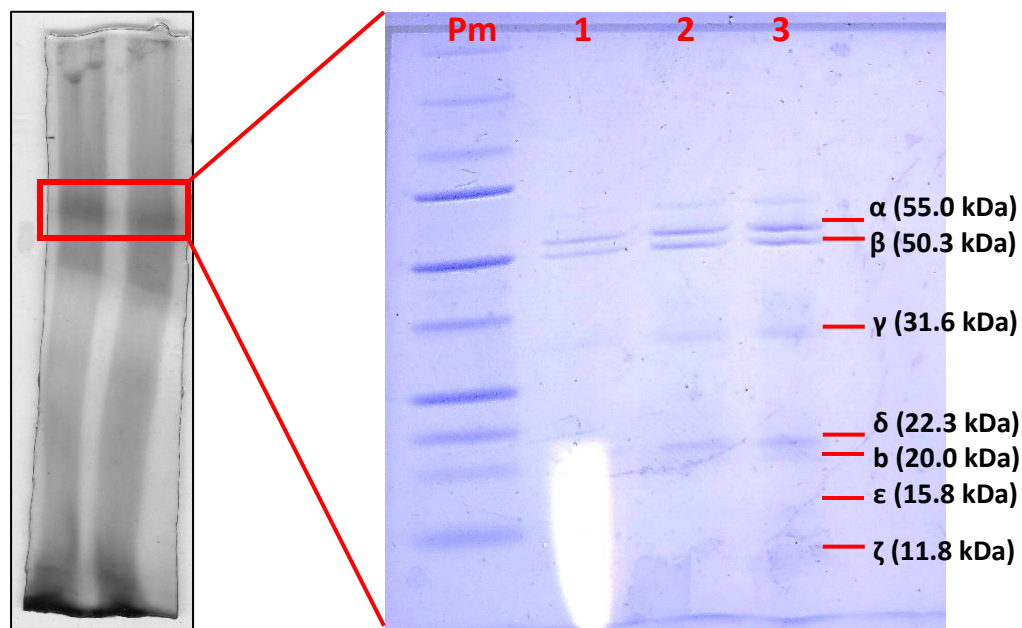
Culminado el proceso de electroforesis se logró observar la separación de la proteína en todos los carriles con muestras de proteína solubilizada con DDM (0.25-2.0). Acorde a lo esperado, el único carril donde no se logró visualizar al complejo fue el carril en el que la muestra no fue solubilizada con DDM. Todas las muestras que lograron ser identificadas poseen un  $M_r$  aproximado de 550 KDa, el cual fue determinado utilizando una muestra de ATPasa purificada como marcador de peso molecular. Como puede observarse en el análisis del gel, las dos primeras concentraciones de DDM utilizadas parecen haber extraído la mayor cantidad de proteína, observándose como una banda más gruesa. En estos mismos carriles no se logró observar la presencia de restos proteicos teñidos en la parte baja del gel, lo que indica que las mayores cantidades de proteínas aislada quedaron retenidas en el pozo y en esa altura del gel. En tanto que en el carril cargado con muestra solubilizada con una relación de 0.75 mostró cantidades bastante similares de ATPasa y restos de proteína membranal en el borde inferior. Los siguientes carriles en los que se adiciono la relación de 1.0 y 2.0 revelan un perfil de bandeado más compacto y nítido que las anteriores, pero con un mayor remanente proteico sobre todo en la muestra donde se añadió la relación de 2.0.

Acorde a los resultados obtenidos tras la valoración y análisis del gel BN-PAGE, así como a las subsecuentes mediciones de actividad de ATPasa para cada una de las concentraciones del gradiente; se determinó a la relación de 0.5 mg DDM/mg proteína como la concentración óptima para lograr la correcta solubilización de la ATP sintasa de *P. denitrificans* preservando la mayor cantidad de proteína con actividad enzimática.

#### **7.4 Identificación de las subunidades de $F_1F_0$ -ATPasa mediante geles de 2D**

Partiendo del gel de 1D utilizado para la determinación de la concentración optima de detergente, se cargaron dos carriles extras con muestras de 250  $\mu$ g de proteína solubilizadas con las relaciones de 0.75 y 1.0 mg DDM/mg proteína para ser posteriormente analizadas en un gel desnaturalizante de 2D. Los perfiles electroforéticos del gel BN-PAGE de estas muestras fueron claramente similares a los obtenidos en los carriles cargados con 200  $\mu$ g de proteína, pero con un claro aumento en el ancho de la banda resultante (Figura 18, carriles 7 y 8).

Las bandas identificadas en el gel fueron cortadas e incubadas en buffer Tris-HCl 50 mM para su extracción de la red de poliacrilamida. El extracto obtenido se cargó en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 8% para verificar la separación de la ATPasa (Figura 19). El proceso de electroforesis del gel de 2D evidencio la correcta separación de la ATPasa contenida en el gel BN-PAGE de las dos muestras, ya que el perfil de bandeado que se obtuvo fue el esperado de acuerdo con el peso molecular de cada una de las subunidades constituyentes del complejo  $F_1F_0$ -ATPasa.



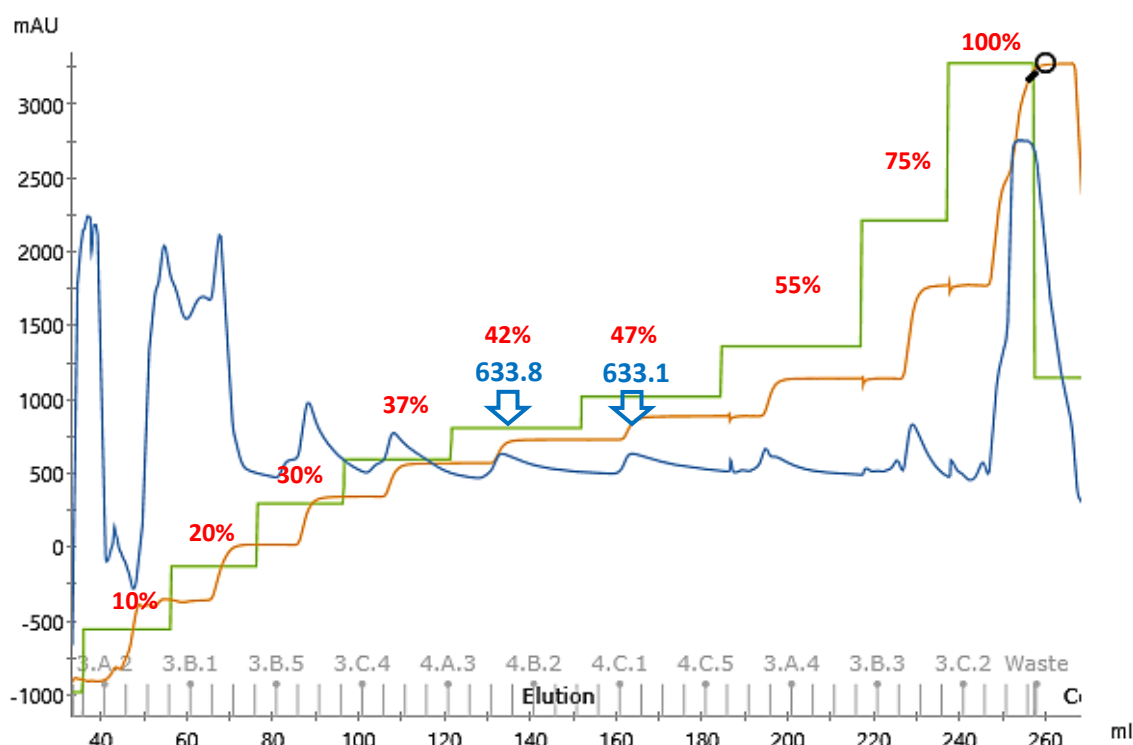
**Figura 19.** Análisis por SDS-PAGE 2D de muestras extraídas del gel BN-PAGE 1D. A) Las bandas de proteína utilizada se resaltan en el cuadro rojo. B) Perfil electroforético de las subunidades constituyentes del complejo  $F_1F_0$ -ATPasa

A partir de los tres carriles cargados con diferentes volúmenes de extracto proteico (1: 5  $\mu$ l; 2: 10  $\mu$ l; 3: 20  $\mu$ l) se identificaron a seis de las ocho proteínas que constituyen al complejo enzimático. Todas las proteínas que fueron claramente identificadas en el gel se muestran con su respectiva nomenclatura y peso molecular. Las subunidades que lograron identificarse claramente fueron aquellas que constituyen a la región  $F_1$  de la enzima ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ). Mientras que las subunidades de la región  $F_0$  membranal no lograron ser visualizadas (a y c), exceptuando una banda de la subunidad b que se observó levemente. Por su parte, la subunidad inhibidora  $\zeta$  apenas pudo ser identificada en el carril cargado con el mayor volumen de muestra (carril 3).

## 7.5 Purificación de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa de *P. denitrificans*

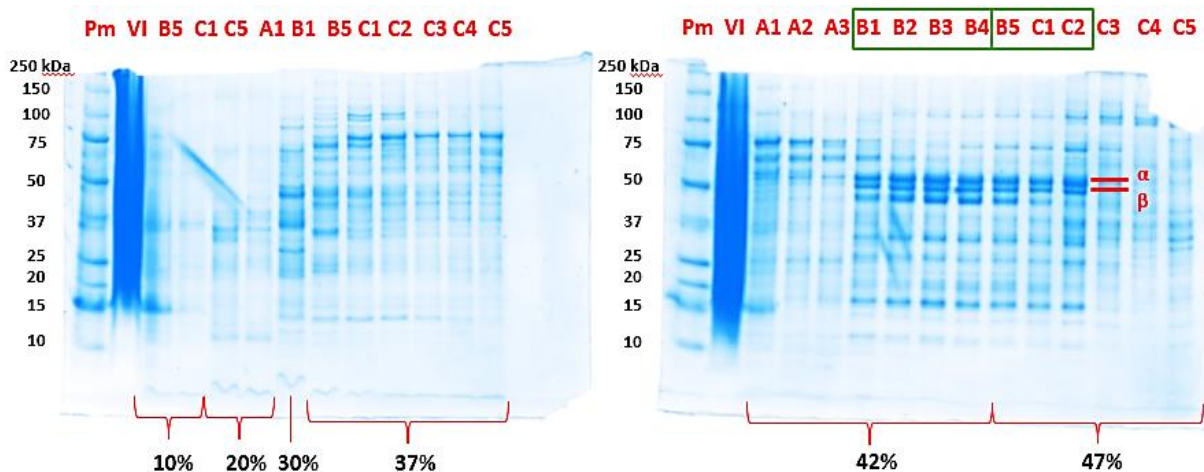
### 7.5.1 Purificación de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa mediante cromatografía de intercambio aniónico

Para comenzar el proceso de purificación se ocuparon muestras de membranas solubilizadas con la relación establecida de 0.5 mg DDM/mg proteína que se diluyeron a una concentración de 10 mg/ml con buffer de solubilización para posteriormente ser ultracentrifugadas para eliminar los restos insolubles. El extracto proteico obtenido fue sometido a una cromatografía de intercambio aniónico (IA) utilizando columnas HiTrap Q HP (resina de amonio cuaternario). El proceso de cromatografía fue desarrollado utilizando buffer A; así como el proceso de elución que se llevó a cabo usando el mismo buffer, pero con una concentración 500 mM de NaCl. Tras la inyección y el posterior lavado de la muestra, la elución se realizó mediante la implementación de un gradiente escalonado de concentración salina (10, 20, 30, 37, 42, 47, 55, 75 y 100 %) con el propósito de lograr una mayor eficiencia en la purificación del complejo (Figura 20).



**Figura 20.** Cromatograma de purificación de F-ATPasa de *P. denitrificans*. Se muestran los dos picos donde se logró identificar a la F-ATPasa. Registros de absorbancia se muestran en línea azul y valores de conductividad en naranja.

Como puede observarse en el cromatograma correspondiente únicamente al paso de elución, la mayor cantidad de proteína contaminante de las muestras fue removida con las concentraciones de 10 y 20% de NaCl, llegándose a obtener casi 80ml del volumen eluido. Los pasos siguientes con 30 y 37% de NaCl mostraron la remoción de otra buena cantidad de proteína adherida a la columna de la cual se obtuvieron otros 50ml. La ATPasa fue obtenida en los siguientes dos pasos de elución de forma separada, es decir, se obtuvieron dos picos de proteína al utilizar las concentraciones de 42 y 47 % de NaCl. Los dos picos observados tuvieron valores de absorbancia a 280 nm prácticamente iguales (633.8 y 633.1, respectivamente), por lo que se consideró la recuperación de una cantidad similar de proteína. Por otra parte, los últimos tres pasos de elución con las concentraciones de 55, 75 y 100% de NaCl lograron la remoción completa de la proteína adherida con mayor afinidad a las columnas. El volumen de las fracciones colectadas de cada uno de los picos obtenidos e identificados como pk1 (42 %) y pk2 (47 %) fue de aproximadamente 25 ml. Estas fracciones fueron evaluadas mediante análisis en geles SDS-PAGE junto con las fracciones de los otros pasos de elución para corroborar el contenido proteico y estimar el grado de pureza alcanzado en el proceso de purificación (Figura 21). Resultado del análisis de las diferentes fracciones colectadas del proceso de elución se lograron identificar cuatro fracciones de 5 ml obtenidas al implementar un 42 % de concentración de NaCl, así como otras tres fracciones de igual volumen pertenecientes al paso de elución de 47 %.



**Figura 21.** Análisis en geles SDS-PAGE de las fracciones colectadas en el proceso de cromatografía. Los carriles son etiquetados con sus concentraciones correspondientes.

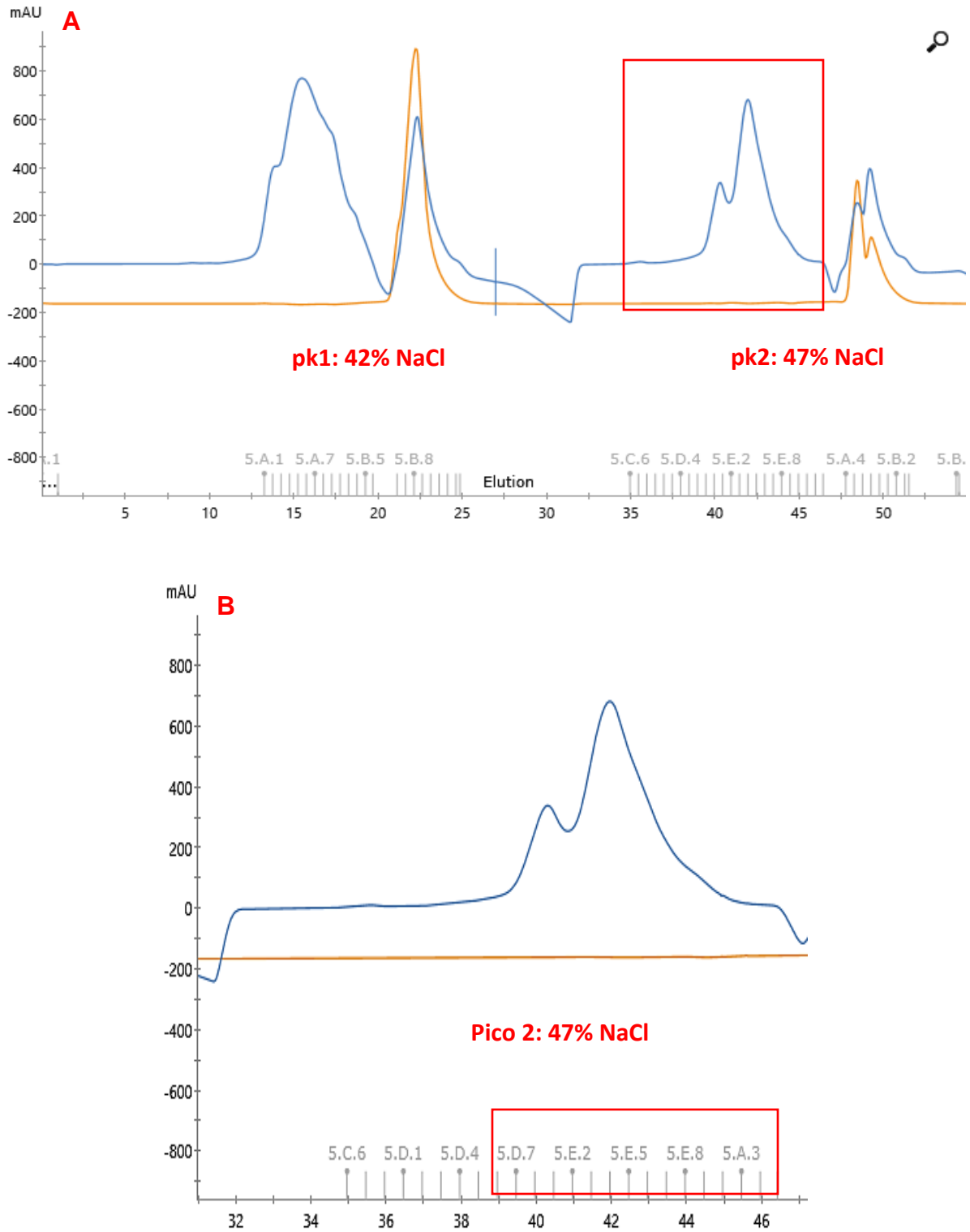


De acuerdo, a los perfiles electroforéticos observados en las fracciones donde se logró identificar a la ATPasa mediante el bandeo característico de la región catalítica  $\alpha/\beta$ , se estimó un grado de pureza de aproximadamente el 80 %. Ya que, además de la identificación de casi todas las subunidades que conforman al complejo ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , a y b) se llegaron a observar un número considerable de bandas que parecen pertenecer a proteínas contaminantes. Por último, ha de mencionarse que la eficiencia del proceso de cromatografía por IA fue también evaluada mediante la cuantificación de la actividad de ATPasa *in vitro*, mostrando un aumento de la actividad enzimática de entre 230 % y 260 % con respecto a la actividad registrada en las VI aisladas.

#### 7.5.2 Purificación de $F_1F_0$ -ATPasa mediante cromatografía de exclusión molecular

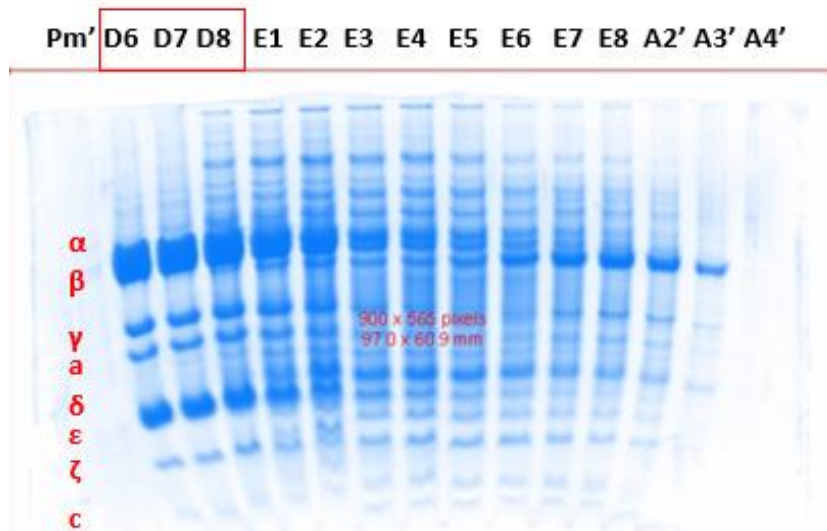
Para el siguiente paso de purificación, las muestras provenientes de los dos picos identificados en la cromatografía por IA fueron colectadas y concentradas hasta un volumen de 500  $\mu$ l para posteriormente ser sometidas a un proceso de cromatografía de exclusión molecular (EM) en una columna Superosa 6 increase 10/300. Las dos muestras denominadas como pk1 y pk2 fueron inyectadas por separado ocupando un volumen de 0.8VC entre sí para ser recolectadas en fracciones diferentes. La elución de las muestras pk1 y pk2 se desarrolló utilizando 2VC ocupando el mismo buffer del paso anterior. Se registró la lectura a 280 nm de dos picos distintos en el cromatograma con valores de 750 y 650 mUA, respectivamente (Figura 22A).

Como puede observarse en el cromatograma de la etapa de elución, el primer aumento en los valores de absorbancia se registró después de la elución de 13 ml ( $\sim$ 0.5VC), volumen que pertenecía a la inyección de la muestra pk1. Seguido de este pico se registró un segundo pico contiguo con valores similares (610 mUA), pero con la particularidad de registrar también un aumento en los valores de conductividad, fenómeno que fue observado de la misma manera en todas las purificaciones hechas para esta proteína. El siguiente registro de absorbancia fue el correspondiente a la muestra pk2 y se visualizó después de eluidos casi 40 ml seguido de un nuevo pico con las características descritas anteriormente, pero de menores proporciones (400 mUA). Las fracciones recolectadas de cada uno de los picos registrados fueron de aproximadamente 5 ml, con una concentración media de proteína de 0.95 mg/ml.



**Figura 22.** Cromatograma de purificación de F-ATPasa de *P. denitrificans* utilizando DDM  
 A) Se muestran los dos picos obtenidos con sus respectivos valores de absorbancia. B)  
 Ampliación del segundo pico donde se resaltan las fracciones analizadas por SDS-PAGE.

Las fracciones colectadas de los dos picos identificados fueron analizadas en geles SDS-PAGE para evaluar el proceso de purificación y determinar el grado de purificación alcanzado finalmente. Se analizaron muestras pertenecientes al pico obtenido con la concentración de 47 % (Figura 22B), las cuales evidenciaron la correcta purificación del complejo enzimático completo. Los perfiles electroforéticos observados en los geles SDS-PAGE demostraron un grado de pureza mayor al 95 %. El perfil de bandeo de las primeras tres fracciones obtenidas en el proceso revelo la presencia de todas las subunidades constituyentes del complejo  $F_1F_0$ -ATPasa llegando inclusive a observarse a la subunidad c, la cual no había podido ser observada dada la dificultad para ser identificada por su naturaleza altamente hidrofóbica (Figura 23). Posteriormente, las fracciones obtenidas fueron evaluadas *in vitro* para determinar la actividad enzimática resultante del proceso de purificación, registrándose un aumento de la actividad de ATPasa en un rango de entre 230-260 % con respecto a la actividad de las VI aisladas. Finalmente, las fracciones identificadas con el mayor grado de pureza y mayor actividad enzimática fueron recolectadas (1.5 ml) y concentradas por centrifugación hasta alcanzar una concentración de 15 mg/ml para ser utilizada en los procesos de cristalización y evaluación de la integridad estructural por microscopía electrónica de transmisión.



**Figura 23.** Análisis en geles SDS-PAGE de las fracciones colectadas en el proceso de cromatografía por EM. El perfil de bandeo es identificado con las subunidades del complejo  $F_1F_0$ -ATPasa. Se resaltan las fracciones obtenidas con el mayor grado de pureza alcanzado.

## 7.6 Verificación de la integridad estructural y funcional de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa

### 7.6.1 Cuantificación de la actividad enzimática de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa

Como se mencionó en algunos de los apartados anteriores, la eficiencia de cada uno de los pasos de purificación fue evaluada mediante la cuantificación de la actividad enzimática *in vitro*. Cabe mencionar que la medición de la actividad enzimática de las muestras obtenidas tras el desarrollo de las cromatografías se realizó para cada uno de los picos resultantes (42 % y 47 %) para poder ser evaluadas y comparadas entre sí (Tabla 3).

La medición se llevó a cabo a través de la reacción acoplada entre el sistema enzimático PK/LDH y la energía liberada por la oxidación del NADH que es utilizada para llevar a cabo la hidrólisis del ATP. Dada la estequiometría 1:1 de la reacción y el coeficiente de extinción molar del NADH (6.22 L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>), el cálculo de la actividad de ATPasa se llevó a cabo midiendo el cambio en los valores de absorbancia a 340 nm en el lapso de un minuto; y reportándose en unidades de  $\mu$ moles de ATP hidrolizado por minuto ( $\mu$ mol ATP<sub>h</sub>/min). Mientras que para obtener la actividad enzimática específica de las muestras hubo que dividir los valores obtenidos mediante el cálculo anterior entre la cantidad de proteína agregada (mg).

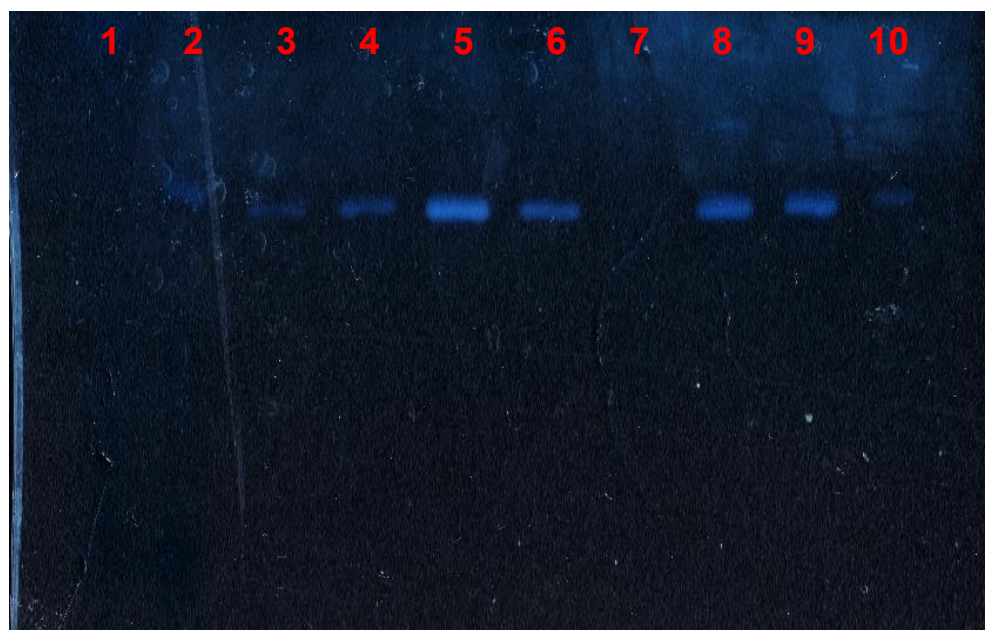
<b>Fracción</b>	<b>Proteína (mg/ml)</b>	<b>Actividad (<math>\mu</math>mol ATP<sub>h</sub>/min)</b>	<b>Act. específica (<math>\mu</math>mol ATP<sub>h</sub>/min/mg)</b>
<b>Vesículas invertidas</b>	10.56	0.039 $\pm$ 0.005 (100.0%)	0.400 $\pm$ 0.067 (100%)
<b>Membranas solubilizadas</b>	4.79	0.023 $\pm$ 0.001 (63.88%)	0.480 $\pm$ 0.023 (120%)
<b>Purificación IA 42 y 47 %</b>	1.04	0.019 $\pm$ 0.004 (48.71%)	0.920 $\pm$ 0.182 (230%)
	1.02	0.021 $\pm$ 0.004 (53.84%)	1.050 $\pm$ 0.171 (262%)
<b>Purificación EM 42 y 47 %</b>	0.96	0.018 $\pm$ 0.004 (46.15%)	0.950 $\pm$ 0.221 (237%)
	0.93	0.020 $\pm$ 0.004 (51.28%)	1.053 $\pm$ 0.227 (263%)

Como puede observarse la cantidad de proteína recuperada en cada uno de los de purificación se vio disminuida desde un valor de 10.56 mg/ml hasta una concentración final de aproximadamente  $\sim$ 0.94 mg/ml. Del mismo modo, los valores de actividad se vieron reducidos hasta valores de 0.018  $\mu$ mol ATP<sub>h</sub>/min dada la disminución en la cantidad de proteína total contenida en los respectivos volúmenes de las muestras. Por otro lado, y como era de esperarse la actividad enzimática específica resultó

aumentada en cada paso de purificación que se llevó a cabo, llegándose a registrar valores de hasta 1.280  $\mu\text{mol ATPPh}/\text{min}/\text{mg}$  en las muestras obtenidas del pico de 47 % de la cromatografía de EM. Un aumento en la actividad de ATPasa del 274 % con respecto a la mayor actividad registra en las VI aisladas (0.467  $\mu\text{mol ATPPh}/\text{min}/\text{mg}$ ). El mayor aumento en la actividad enzimática se registró entre las Mb<sub>s</sub> y las fracciones de los picos provenientes de la cromatografía de IA, por lo que se determinó la implementación de este proceso como un paso clave para la purificación del complejo enzimático.

#### 7.6.2 Evaluación de la integridad funcional de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa

Con el propósito de comprobar la integridad estructural y con ello la integridad funcional de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa obtenida en cada uno de los pasos de purificación (prestando especial interés en los procesos de cromatografía por IA y EM), se decidió realizar una evaluación de la actividad de ATPasa *in gel*. Para ello se desarrolló un ensayo en un gel BN-PAGE con un gradiente de concentración del 4-16 %, cargando 15  $\mu\text{l}$  de muestras de VI y Mb<sub>s</sub>, así como 5  $\mu\text{l}$  de muestras provenientes de algunas fracciones de los dos picos obtenidos en cada una de las cromatografías (Figura 24).



**Figura 24.** Determinación de actividad de ATPasa *in gel* de muestras de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa. Carriles: 1) VI, 2) Mb<sub>s</sub>, 3 y 4) IA 42 %, 5 y 6) IA 47 %, 7 y 8) EM 42 %, 9 y 10) EM 47 %

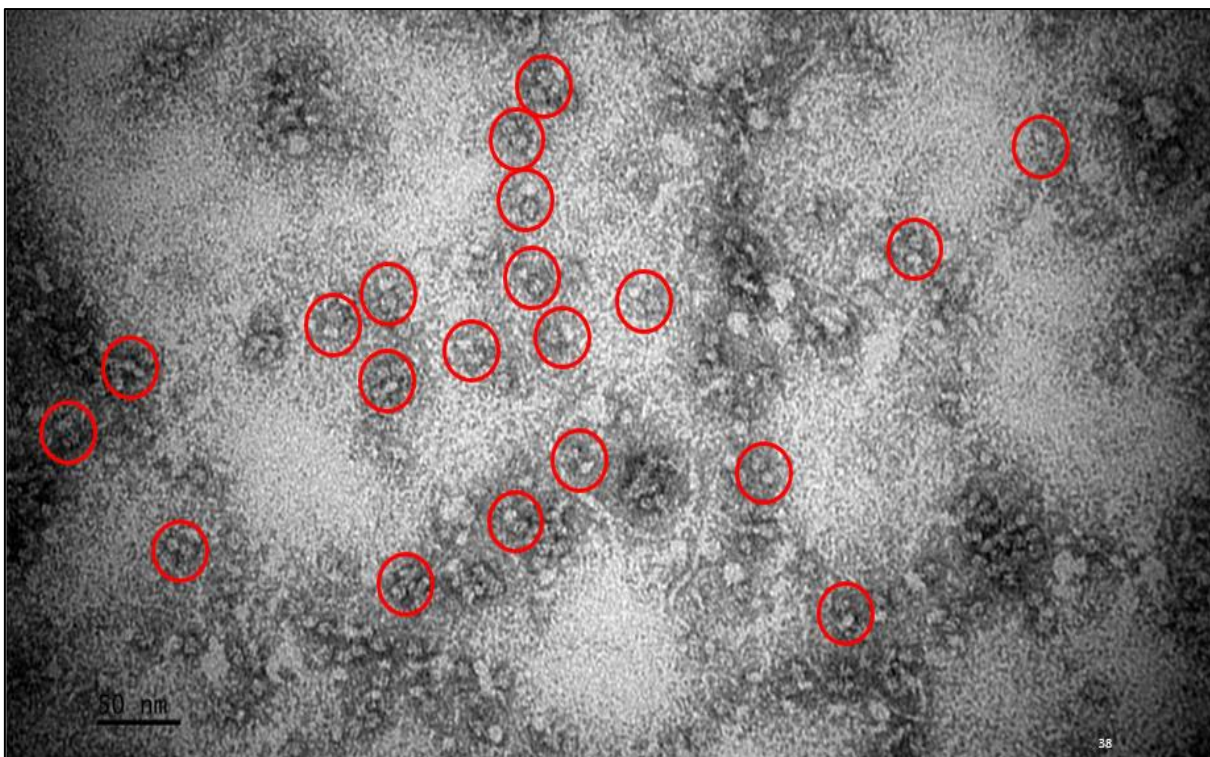
Posterior al proceso de electroforesis llevado a cabo bajo las condiciones reportadas anteriormente, el gel se incubó toda la noche a 30 °C en un buffer de actividad que contenía todos los componentes necesarios para promover la actividad ATPasa (ver Materiales y Métodos). La adición de acetato de plomo fungió como elemento revelador de la actividad de ATPasa, ya que la liberación del fosfato derivado de la hidrólisis del ATP es capaz de formar una sal con los iones de plomo en solución. Dando como resultado la revelación de una banda de color blanco únicamente en el lugar en el que se haya logrado la separación de la proteína con actividad enzimática.

A partir del análisis del gel de actividad se lograron observar bandas en casi todos los carriles, observándose una ausencia solo en los carriles que fueron cargados con las muestras de VI y EM42 % (1 y 7). Resultado que se piensa fue debido a la cantidad de lípidos presentes en la muestra de VI, así como a la poca cantidad de proteína contenida en la fracción de la EM42 % añadida. Por otro lado, fue interesante observar la correspondencia entre las bandas de mayor intensidad (actividad ATPasa) con los valores de actividad enzimática registrados en las muestras sometidas a los procesos de cromatografía, siendo siempre mayor el de las fracciones obtenidas a partir de la elusión con 47 % de NaCl 500 mM.

### 7.6.3 Evaluación de la integridad estructural de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa

Como último procedimiento para evaluar la integridad estructural de la ATPasa sometida a los distintos pasos de purificación, se planteó la visualización de la proteína mediante microscopía electrónica de transmisión dada las dimensiones del complejo proteico. Para ello, se utilizó una muestra de ATPasa purificada a una concentración de 15 mg/ml, la cual fue posteriormente optimizada a una concentración de 2 mg/ml y sometida al tratamiento pertinente para su visualización. Las imágenes obtenidas muestran la presencia mayoritaria de una estructura con las dimensiones y características buscadas, observándose una longitud de 20 nm y un ancho de aproximadamente 5 nm (Figura 25). El uso de acetato de uranilo añadido para dar contraste a las estructuras permitió también la identificación de las regiones F<sub>1</sub> y F<sub>0</sub> del complejo nanomotor; observándose la región F<sub>1</sub> como una porción globular de menor contraste con respecto a la región F<sub>0</sub> que presenta una mayor electrodensidad.



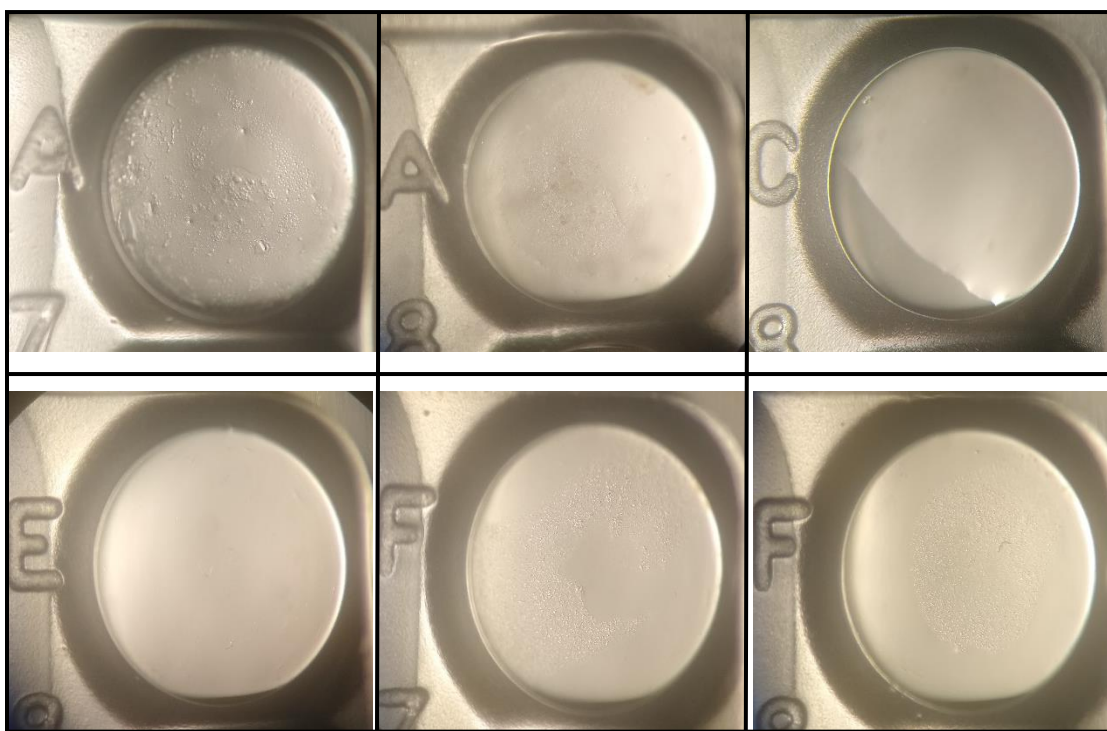


**Figura 25.** Micrografía electrónica de una muestra de  $F_1F_0$ -ATPasa purificada. Las estructuras identificadas en el campo son resaltadas en los círculos rojos. Escala 50 nm.

Un resultado de interés derivado de los ensayos de micrografía se dio al observar una cantidad considerable de proteína conglomerada, sin embargo, hay que hacer hincapié en que estas estructuras mostraron también una integridad estructural bastante aceptable al ser comparada con las partículas individuales identificadas. Del mismo modo, la presencia de porciones disociadas de la proteína no fueron perceptibles en ninguno de los campos observados, por lo que fue demostrada contundentemente la integridad estructural del complejo F-ATPasa, y con ello del proceso global de purificación desarrollado. Por otra parte, se llegaron a observar en algunos campos la presencia de grandes burbujas poco electrodensas que parecen estar compuestas por glicerol, lo que llego a interferir en la visualización del complejo en algunas zonas de la rejilla. Finalmente, y dados los resultados observados en las imágenes de microscopia se determinó que la muestra de ATPasa purificada en el laboratorio es apta para ser analizada por Crio-ME, así como para ser utilizada en los ensayos de cristalización en aras de resolver su estructura atómica.

### 7.7 Cristalización de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa de *P. denitrificans*

Para los ensayos de cristalización se ocuparon las dos muestras obtenidas en la elución de los dos picos registrados tras el desarrollo de las cromatografías. Como se mencionó anteriormente, estas muestras fueron evaluadas mediante ensayos de actividad *in vitro* e *in gel* para verificar la integridad funcional y por ende estructural de la proteína con el fin de obtener cristales con la conformación nativa del complejo. El cálculo de concentraciones para las cajas de licor madre utilizadas se realizó mediante el servicio web de Hampton Research. Las soluciones utilizadas implicaron gradientes de concentración crecientes de MgCl<sub>2</sub> (60-150 mM) y PEG 4000 (10-20%), condiciones que fueron establecidas de acuerdo con experimentos de cristalización previos (Morales, 2015). Habiendo añadido el volumen correspondiente de cada reactivo de cada una de las 96 condiciones se añadió 1 µl de ATPasa (15 mg/ml). Este procedimiento fue realizado para las dos muestras de ATPasa obtenidas, por lo tanto, el experimento implicó la elaboración de dos cajas bajo la técnica de gota sentada utilizando las mismas condiciones de cristalización (Figura 26).



**Figura 26.** Imágenes de pozos de la placa de cristalización incubada por 20 días. La ausencia de cristales se muestra prácticamente en todas las condiciones utilizadas.



Transcurrido el tiempo estimado para el crecimiento de los cristales de ATPasa, las cajas fueron analizadas usando un microscopio estereoscópico a 40x. Las observaciones pertinentes de cada uno de los pozos evidencio el resultado negativo en toda la placa, al no poder observarse ningún cristal al ser incubados bajo las condiciones descritas. Varios pozos mostraron únicamente la precipitación de la proteína adicionada y/o de los agentes de cristalización utilizados. Demostrando contundentemente el resultado insatisfactorio obtenido; el cual ya había sido reportado con anterioridad al utilizar el detergente DDM en los procesos de purificación e incubación de las muestras de ATPasa. Dados los resultados insatisfactorios obtenidos se ha propuesto cambiar el detergente DDM por UDM para la desarrollar nuevamente cada uno de los ensayos de purificación y cristalización.

## VIII. DISCUSIÓN

### 8.1 Determinación de condiciones para crecimiento y cultivo de *P. denitrificans*

El cultivo de la cepa PD1222 de *P. denitrificans* mostró un buen crecimiento utilizando las condiciones establecidas en el laboratorio, evidenciado por los valores de OD<sub>600</sub> alcanzados al final del cultivo, así como por la cantidad de biomasa obtenida. Las colonias utilizadas para realizar los precultivos y posteriormente los macrocultivo poseen las características morfológicas identificadas en varias cepas de *P. denitrificans* que han sido cultivadas en medio mineral (Nokhal & Schlegel, 1983). La superficie de las colonias tienen una forma circular con diámetros de 2 a 4 mm y presentan una tonalidad de color café claro con textura suave o ligeramente cremosa. Particularmente los cultivos de mayor tiempo llegaron a mostrar la misma morfología colonial, pero su coloración cambió a un color café opaco o inclusive a un color rojizo debido a la disminución en la presión de oxígeno del medio contenido en la placa. Por otro lado, los cultivos en medio líquido se muestran de color marrón, con baja viscosidad, sin presencia de filamentos y/o formación de películas.

Dadas las características descritas es evidente el resultado satisfactorio del cultivo en medio LB; aunque el medio es considerado como un medio pobre por su limitada fuente de nutrientes en comparación con otros medios más complejos o suplementados con concentraciones variables de sulfato, nitrato y/o fosfato. En cuanto al perfil electroforético obtenido, las bandas de proteína que son únicamente distinguibles en las muestras con un volumen de 5 µl (Figura 12; carriles 1, 3, 5 y 7), muestran una buena cantidad de proteína con M<sub>r</sub> similares a los encontrados en trabajos de caracterización proteica y lipídica de membranas aisladas de *P. denitrificans* ATC17741 y ATC13543 (Nauyalis, 1985).

A partir de la cinética de crecimiento, se evidencio que las condiciones utilizadas para el cultivo de *P. denitrificans* PD1222 en el laboratorio son bastante eficientes aún sin suplementar el medio con ninguna clase de sal inorgánica. Dicha aseveración se sustenta con los valores de OD<sub>600</sub> = 2.174 obtenidos al momento de la cosecha, puesto que en experimentos realizados con la misma cepa en medio mineral (con 2.5 µM de Zn), solamente se logró obtener un valor de 1.05 en un tiempo de 24h (Hahnke, 2014).

Se demostró también que la cantidad de O<sub>2</sub> disuelto mediante agitación orbital es suficiente como para lograr un buen rendimiento de biomasa, puesto que se ha observado que una mezcla gaseosa compuesta por un 5% de O<sub>2</sub> es lo idóneo para el crecimiento de *P. denitrificans* NBRC13301. Mientras que concentraciones menores o mayores al 5 % pueden tener una repercusión negativa en el crecimiento del microorganismo llegando incluso a inhibirlo (Tanaka y col., 2016).

La eficiencia del proceso de cultivo de *P. denitrificans* PD1222 bajo las condiciones establecidas fue demostrada de manera contundente con el resultado de los parámetros cinéticos calculados ( $\mu = 0.436 \text{ h}^{-1}$  y  $t_d = 96 \text{ min}$ ). Dado que en ensayos realizados con la misma cepa cultivada en medios minerales suplementados con varios metales y elementos traza, únicamente se logró obtener un tiempo mínimo de duplicación de 2.8 h y tasas de crecimiento de entre 0.140 y 0.251 h<sup>-1</sup>. Resultados similares a los obtenidos en este trabajo han sido únicamente comparables con los emitidos por Van-Verseveld (1983) tras reportar una  $\mu$  de 0.420 h<sup>-1</sup> en la cinética de crecimiento de *P. denitrificans* NCIB8944.

Por otra parte, los cultivos obtenidos del biorreactor no fueron los esperados, ya que, aunque la biomasa obtenida fue de tres veces más a la cosechada bajo las condiciones del laboratorio la cantidad de proteína aislada (>5 mg/ml) no fue la óptima para la realización de los ensayos posteriores. Este resultado se piensa que es debido principalmente a la inhibición del crecimiento por un alza en el pH del medio a las 16 h de cultivo, lo que habría repercutido en la integridad estructural de la membrana del microorganismo y con ello de las proteínas contenidas en ella. Derivado de estos resultados se propone, en experimentos posteriores, mantener un pH constante de 7.0 en el medio y disminuir la inyección de aire para tener una concentración de OD ~20%.

## **8.2 Determinación de condiciones óptimas para el aislamiento de VI**

Las evaluaciones de la morfología microscópica hecha mediante la tinción de Gram de los extractos celulares tratados en distintos tiempos con lisozima revelaron la eficacia de este proceso para lograr el correcto aislamiento de las membranas y purificación de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa. Dicha morfología fue descrita a partir de las micrografías obtenidas por microscopia de campo claro y contraste de fases a un aumento de 100x.

Las características identificadas en este microorganismo son bastante similares a las reportadas con anterioridad por Nokhal y Schlegel (Figura 1), quienes trabajaron en la identificación y clasificación de distintas cepas de *P. denitrificans*. El cultivo cosechado en fase estacionaria presenta una morfología cocoide de dimensiones entre 0.6 y 1.0  $\mu\text{m}$ , los cuales no presentan motilidad por ausencia de flagelos (Figura 16). Todas estas características fueron evaluadas a través del tiempo para determinar el efecto del tratamiento enzimático en el extracto celular obtenido en distintos tiempos, revelando un tiempo óptimo de 3h para este tratamiento. Como es ya sabido la actividad enzimática desarrollada por esta proteína es la de llevar a cabo la ruptura hidrolítica del peptidoglicano, constituyente principal de la pared celular de bacterias Gram negativas. Por tanto, un mayor tiempo de acción de la enzima a la temperatura adecuada se traduce en una mayor degradación de la pared celular, tal cual logró observarse a lo largo del tratamiento de lisis enzimática.

De acuerdo a todos los resultados obtenidos se determinó que tiempos de tratamiento menores a 3 h son insuficientes para lograr la ruptura completa de la pared celular y con ello, la obtención de la proteína de interés. Mientras que tiempos mayores serían innecesarios para lograr el mismo propósito. Los resultados finales fueron validados mediante la medición de la actividad enzimática de ATPasa, donde los valores resultantes son reportados en el apartado de cuantificación de la actividad enzimática de cada uno de los pasos de aislamiento y purificación de la ATPasa. Una propuesta final para la optimización de este proceso es la utilización de una mayor cantidad de lisozima, basado en trabajos anteriores en los que han llegado a utilizarse una relación de hasta 1000  $\mu\text{g}$  de enzima por mililitro de extracto celular (Morales, 2015).

### **8.3 Determinación de concentración óptima de detergente para solubilización**

El propósito principal de este ensayo fue obtener la relación de detergente a utilizar para lograr la extracción de la mayor cantidad de proteína sin perjudicar la integridad estructural de la misma; buscando con ello mantener también la actividad de ATPasa. Los resultados de este experimento revelaron el perfil electroforético esperado del complejo ATP sintasa proveniente de las VI aisladas en el proceso de lisis enzimática.

Se planteó la utilización de los detergentes DDM y UDM para la solubilización de las VI acorde a experimentos donde se logró aislar de manera adecuada al complejo enzimático intacto (Morales, 2015). Esta propuesta está basada también en algunos trabajos de caracterización bioquímica de los complejos respiratorios de *P. denitrificans*, en el que la mayor cantidad de proteína aislada fue obtenida utilizando una relación de 1.0 mg DDM/mg proteína (Schagger, 2002). La identificación del complejo enzimático fue lograda utilizando azul de coomasie R-250 (Serva), el cual por sus características fisicoquímicas se adhiere con gran afinidad a la ATPasa. Un fenómeno que a la fecha no ha sido bien descrito pero que se piensa es debido a la naturaleza altamente hidrofóbica del colorante. El perfil electroforético tras el análisis de los geles BN-PAGE reveló una correcta separación del complejo con un  $M_r$  de 550 KDa, peso molecular correspondiente al complejo completo de ATP sintasa de *P. denitrificans* (Morales, 2015; Varghese y col., 2017).

Un análisis más minucioso del perfil electroforético obtenido reveló claras diferencias entre cada una de las muestras solubilizadas. Ya que a pesar de que se observaron bandas de proteína con un  $M_r$  adecuado, estas parecen contener una mayor cantidad de proteína remanente en los carriles que contienen a las muestras solubilizadas con una mayor concentración de detergente. Lo anterior puede ser explicado justamente por la cantidad de detergente agregado, ya que la adición de una mayor cantidad puede promover la disociación del complejo enzimático provocando un corrimiento del perfil electroforético, resultando así en la visualización de las manchas azules que se observan al final del gel. Mientras que el añadir menores cantidades como la relación de 0.25 promovería la solubilización de una menor cantidad de proteína provocando el estancamiento de la muestra en el pozo del gel tal como pudo observarse en dicho carril. Gracias a la resolución global de este ensayo se estableció a la relación de 0.5 mg DDM/mg proteína como la concentración óptima para lograr la mayor cantidad de proteína aislada con actividad enzimática de ATPasa. Dicha concentración fue debidamente verificada midiendo la actividad enzimática de cada una de las muestras solubilizadas con las concentraciones de detergente propuestas. Esta evaluación resultó en el registro de valores bastante similares a los obtenidos en trabajos previos realizados con SBP de *P. denitrificans* (Morales y col., 2009).

#### **8.4 Identificación de las subunidades de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa mediante geles de 2D**

El desarrollo de este ensayo fungió como una herramienta de verificación del proceso de electroforesis llevado a cabo en los geles BN-PAGE de 1D para separar e identificar al complejo F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa. El patrón de bandeo observado fue el esperado de acuerdo con los pesos moleculares calculados de las subunidades que conforman en su totalidad al complejo enzimático. Estos resultados fueron también similares a los obtenidos en múltiples ensayos de electroforesis al analizar a la misma proteína en geles desnaturizantes SDS-PAGE (Morales 2015; Varghese, 2017).

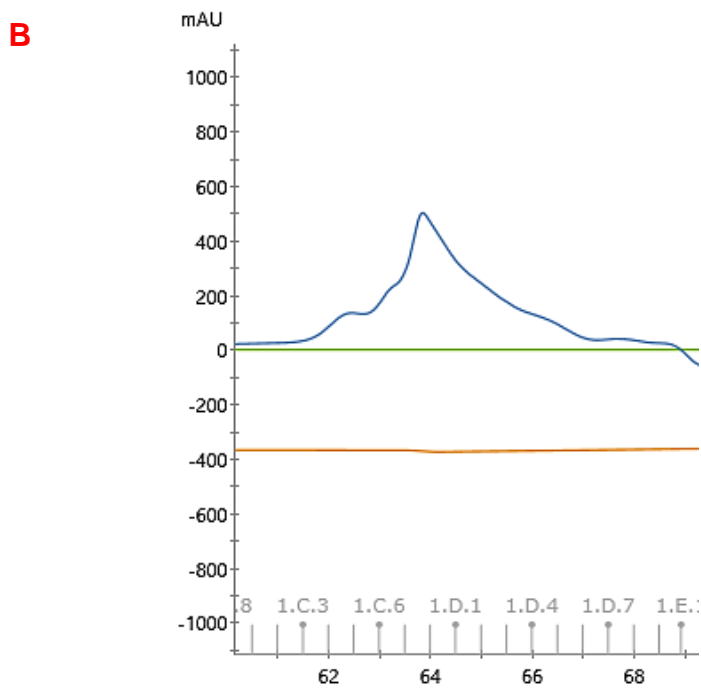
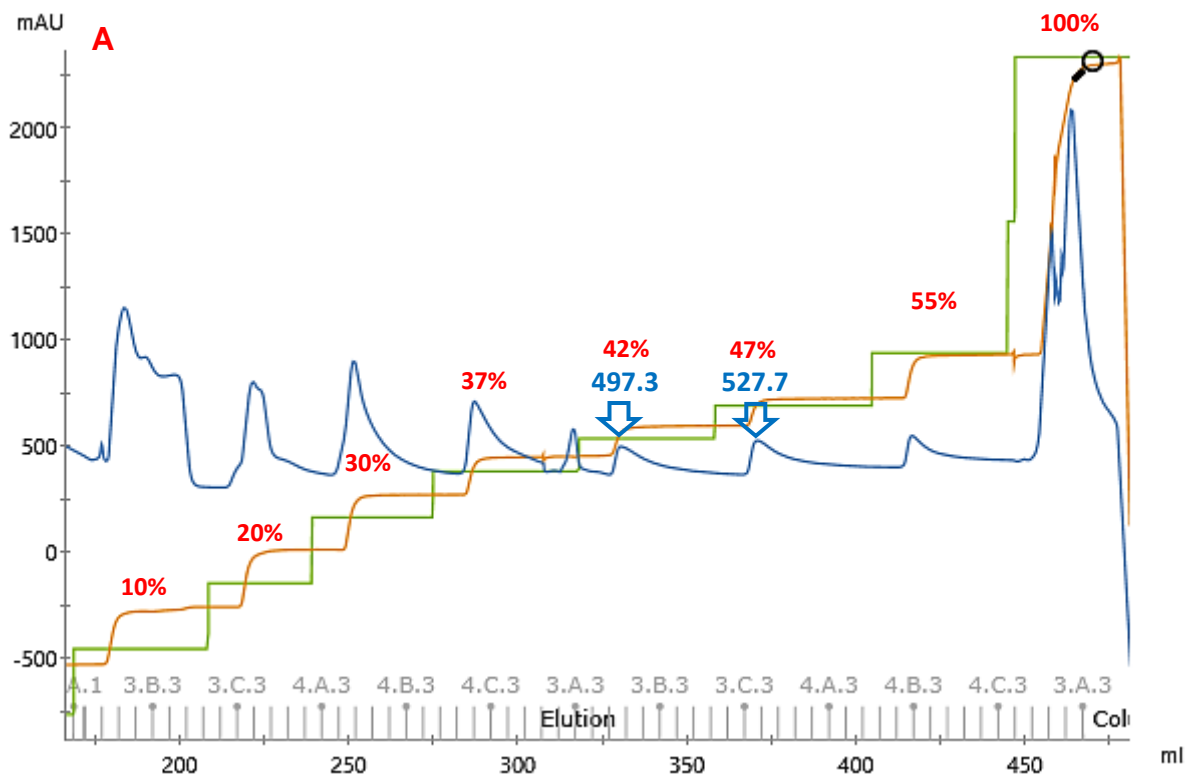
Las proteínas que lograron ser identificadas con mayor claridad fueron aquellas que poseen los pesos molecular correspondientes a las subunidades constituyentes de la región F<sub>1</sub> de la ATP sintasa bacteriana, mientras que las subunidades que constituyen a la región F<sub>0</sub> no lograron ser identificadas dada su naturaleza altamente hidrofóbica que impide su visualización en los geles de poliacrilamida. Por otro lado, la subunidad inhibidora ζ pudo ser identificada tras la realización de los ensayos de primera y segunda dimensión, demostrando el asombroso grado de afinidad que posee esta proteína por la región F<sub>1</sub> de la ATP sintasa (Morales, 2009). El análisis del perfil electroforético obtenido en el gel de 2D puso de manifiesto nuevamente la eficiencia del proceso de electroforesis de los geles BN-PAGE para separar e identificar al complejo enzimático, así como la integridad estructural del mismo al utilizar una relación de 0.75 y 1.0 mg de detergente por mg de proteína.

#### **8.5 Purificación de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa de *P. denitrificans***

Los pasos de purificación llevados a cabo para la purificación de la ATPasa mostraron ser eficientes dados los resultados observados en los cromatogramas y en el análisis de los geles SDS-PAGE. El desarrollo del primer paso de purificación implementando el arreglo de las columnas (2xHisTrap-2xHitrap) y la posterior elución con el gradiente de concentración creciente de NaCl 0-500 mM, logró aumentar la resolución de los dos picos pertenecientes en su mayoría a la ATPasa esperada. El rendimiento de este primer paso de purificación se estima en la obtención de 25 mg de proteína total con un grado de pureza del 80 %; resultados consistentes con los observados en los antecedentes directos de este trabajo (Morales, 2015).

El análisis de los geles realizados con las muestras de la cromatografía de IA evidenció la correcta separación de la mayoría de las proteínas contaminantes en los pasos previos a las concentraciones de 42 % y 47 % donde se obtuvieron los picos pk1 y pk2. Estas muestras también fueron analizadas mediante ensayos de actividad *in vitro* para corroborar el contenido de cada una de las fracciones con el propósito de identificar el contenido de ATPasa en ellas de una manera más precisa. Por su parte, la cromatografía de EM realizada con la columna Superosa 6 Increase demostró ser eficiente al alcanzar un grado de pureza mayor al 95 %, la cual fue estimada a partir del análisis correspondiente de los geles SDS-PAGE y por microscopía electrónica. El patrón de bandeo visualizado en estos geles demostró la presencia de únicamente las subunidades que constituyen al complejo F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa, así como la asociación de la proteína inhibidora ζ. Patrones que también fueron observados en experimentos de caracterización realizados con el mismo complejo enzimático de *P. denitrificans* (Morales, 2009; Morales, 2015; Varghese 2017). Dichos resultados fungieron como evidencia para demostrar completamente la eficiencia de los procesos de cromatografía ocupados para la purificación de la proteína estructuralmente integra.

Derivado de los resultados alentadores obtenidos en la purificación de la enzima se propuso evaluar el efecto en el rendimiento de purificación de la ATPasa utilizando UDM (0.015 %), dado que existe evidencia previa que indica que la cristalización de la ATPasa se lleva a cabo únicamente cuando se utiliza este detergente tanto en el proceso de purificación como en las soluciones donde se incuban los cristales (Morales, 2015). El proceso de obtención de las muestras para el desarrollo de los ensayos se llevó a cabo bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, llevándose al final a una concentración de 5 mg/ml previo a la inyección en el sistema de cromatografía. A partir del desarrollo de los procesos de cromatografía se observó que la purificación utilizando UDM logró también la separación de los picos pk1 y pk2, los cuales lograron ser identificados al eluir con una concentración salina de 42 y 47 %, respectivamente. Los valores de absorbancia registrados en la cromatografía de IA fueron de 497 y 527 mUA, los cuales fueron menores a los observados en el proceso de cromatografía usando DDM, sin embargo, los rendimientos obtenidos fueron consistentes con la concentración de proteína inyectada inicialmente (Figura 27A).



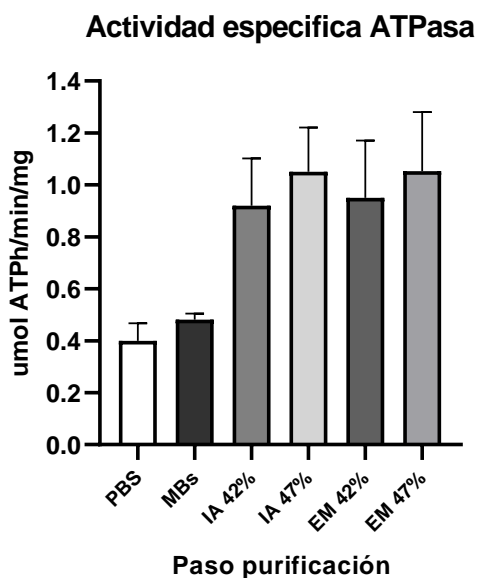
**Figura 27.** Cromatograma de purificación de F-ATPasa de *P. denitrificans* utilizando UDM  
 A) Se muestran los dos picos obtenidos en la cromatografía por IA. B) Cromatograma resultante de la cromatografía de EM de la muestra pk2 (47% NaCl).



Por su parte, el desarrollo de la purificación por cromatografía de EM también mostró resultados similares a los obtenidos con la purificación realizada ocupando al DDM, al registrarse valores de absorbancia de aproximadamente 550 mUA. La disminución de los valores de absorbancia obtenidos con respecto al proceso desarrollado con el detergente alternativo se justifica de la misma manera por la cantidad de proteína recuperada del paso de purificación anterior (Figura 27B). Tomando esto como premisa, los rendimientos obtenidos demuestran ser consistentes con la cantidad de proteína purificada, así como los valores de actividad enzimática específicos que también fueron bastante similares a los obtenidos utilizando DDM. Dados los datos resultantes de este ensayo se demostró la eficiencia de la purificación de ATPasa implementando UDM en las soluciones utilizadas.

### 8.6 Verificación de la integridad estructural y funcional de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa

Se desarrollaron una serie de experimentos para determinar la integridad estructural y funcional de la ATPasa obtenida a través de una serie de etapas de purificación, así como para determinar la eficiencia de estos. En primera instancia se determinó la actividad enzimática específica de cada uno de los pasos implementados, resultando en los valores de actividad mostrados en el gráfico correspondiente (Figura 28).



**Figura 28.** Actividad específica de hidrólisis de ATP de las muestras obtenidas en cada paso de purificación desarrollado. n = 5

Las actividades específicas de las muestras de VI y MB<sub>s</sub> mostraron un aumento poco considerable entre ellas, debido a que este paso solo involucró la solubilización de la proteína total contenida en las VI aisladas. Por tanto, si el proceso de solubilización se llevó a cabo de manera eficiente se tendría la misma concentración de proteína y actividad enzimática considerando la dilución de 5 mg/ml realizada, tal y como en el caso del resultado obtenido (Tabla 3). Cabe resaltar que la actividad enzimática específica registrada de las muestras de VI, mostró ser consistente con los valores de actividad de ATPasa de *P. denitrificans* reportados en experimentos de inhibición (0.69  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) y al evaluar un proceso de obtención de SBP (0.30  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) (Morales, 2009; Varghese, 2017).

Por otro lado, resultado del proceso de cromatografía por IA se obtuvo un incremento en los valores de actividad específica de entre 0.920 y 1.050  $\mu\text{mol ATP}/\text{min}/\text{mg}$ , los cuales fueron nuevamente comparables con los datos emitidos por Morales y colaboradores (0.980  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) al purificar al complejo mediante cromatografía de intercambio aniónico débil (DEAE). El proceso final de purificación que fue desarrollado mediante la cromatografía de EM resultó en la obtención de valores de actividad específica bastante similares a los obtenidos en el proceso de cromatografía de IA; datos que fueron un tanto inesperados dado el grado de pureza observado en el análisis de los geles SDS-PAGE correspondientes. Dichos resultados se piensa que fueron debido a la subestimación de la proteína cuantificada al emplear el método de Bradford tradicional, dada la porción del complejo enzimático embebido dentro de la membrana. Por lo tanto, se ha propuesto un cambio en el método de cuantificación de proteína por un método de Bradford modificado, en el cual se emplean al TCA y el DOC que promueven la diferenciación de las proteínas precipitadas de otras macromoléculas, resultando en una mejora en la estimación de la proteína real contenida en las muestras. Implementando esta metodología se espera poder evidenciar la mejora en el grado de purificación alcanzado entre cada uno de los pasos.

Con respecto al ensayo de determinación de actividad enzimática *in gel*, se logró evidenciar fehacientemente la eficiencia del proceso de purificación completo para obtener la mayor cantidad de proteína funcional y estructuralmente integra. Ya que en

cada uno de los carriles en los que fueron evaluados los distintos pasos de purificación se observó la presencia de actividad. La mayor actividad se mostró en los carriles cargados con muestras provenientes de los últimos dos pasos de purificación. En el caso del carril donde se cargaron las VI, no se observó la banda esperada debido a que las muestras no fueron solubilizadas con ningún detergente; por lo que la proteína no pudo ser separada de manera adecuada. Mientras que en el carril donde se cargó la muestra de EM 47 % tampoco se observó ninguna banda, ya que la fracción cargada en el pozo fue la correspondiente al inicio del pico registrado en el cromatograma, por lo que la concentración de proteína contenida en esta fracción era muy escasa.

Finalmente, se propuso un último experimento de evaluación de integridad estructural del complejo  $F_1F_0$ -ATPasa mediante microscopía electrónica de transmisión, de la cual se obtuvieron resultados bastante satisfactorios. La visualización de la proteína en varios campos fue posible después del proceso de optimización de la muestra a una concentración de 2 mg/ml en conjunto con la implementación de acetato de uranilo a una concentración del 2 %. El contraste otorgado por este compuesto permitió la clara identificación del complejo por sus características estructurales únicas. En la micrografía generada se mostró una cantidad aceptable de partículas individuales correspondientes a la ATPasa purificada, de la cual se enfatiza la visualización del complejo completamente ensamblado. Estos resultados fungieron como una clara evidencia de la eficiencia del proceso de purificación desarrollado para la obtención de la mayor cantidad de ATPasa estructuralmente íntegra; rubro clave para utilización de las muestras en ensayos de cristalización y crio-ME.

## IX. CONCLUSIONES

1. Se logró la obtención de un cultivo adecuado de *P. denitrificans* bajo las condiciones determinadas de temperatura y agitación establecidas.
2. El rendimiento proteína/biomasa de *P. denitrificans* resultante del cultivo llevado a cabo en biorreactor no fue el óptimo como para continuar su implementación.
3. Los procesos de aislamiento y purificación de ATPasa de *P. denitrificans* demostraron ser eficientes para la obtención del complejo intacto.
4. La integridad funcional y estructural de la ATPasa fue demostrada mediante el análisis de geles BN-PAGE y microscopia electrónica.
5. El uso de los detergentes DDM y UDM no muestran diferencias significativas en el rendimiento de la proteína purificada.
6. Las muestras obtenidas del proceso de purificación del complejo F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa tratadas con DDM o UDM poseen un grado de pureza aceptable para ser utilizada en los experimentos de cristalización y Crio-ME.
7. Los ensayos de cristalización de muestras de proteína tratadas e incubadas con DDM parecen mostrar un efecto negativo en la generación de cristales de ATPasa.

## X. PERSPECTIVAS

- Optimizar el método de cuantificación de proteína utilizando la técnica de Bradford modificado dada la variabilidad de los resultados de actividad enzimática obtenidos en los pasos de cromatografía.
- Optimizar el cultivo de *P. denitrificans* PD1222 en biorreactor manteniendo un pH de 7.0 constante y suministrando un máximo de 20 % de OD para tratar de mejorar la relación biomasa/proteína.
- Volver a realizar los experimentos de cristalización con las muestras de ATPasa tratadas con UDM dados los resultados insatisfactorios obtenidos al utilizar el DDM en los distintos procedimientos.
- Implementar los inhibidores específicos de ATPasa propuestos como aditivos de cristalización ocupando las concentraciones sugeridas por la bibliografía para tratar de aumentar la resolución estructural de la proteína.
- Realizar los ensayos de difracción de rayos X de los cristales que logren obtenerse mediante la utilización de un difractómetro de laboratorio (Col. Dra. Adela Rodríguez, UNAM).
- Seleccionar los cristales de ATPasa con los mejores índices de difracción para ser enviados al sincrotrón Swiss Light Source donde se tiene tiempo de acceso.
- Proponer el modelo de translocación de H<sup>+</sup> llevado a cabo por la ATP sintasa de *P. denitrificans* a partir de la estructura determinada por alguna de las dos técnicas propuestas.

## XI. BIBLIOGRAFIA

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R. & Walker, J.E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*. 370(6491). 621-628.
- Agarwal, N., & Kalra, V.K. (1984). Studies on the mechanism of action of local anesthetics on proton translocating ATPase from *Mycobacterium phlei*. *Biochimica et Biophysica acta*. 764(3). 316-323.
- Allegretti, M., Klusch, N., Mills, D.J., et al. (2015). Horizontal membrane-intrinsic  $\alpha$ -helices in the stator a-subunit of an F-type ATP synthase. *Nature* 521(1). 237-240.
- Altendorf, K., et al. (2000). Structure and function of F(O) complex of the ATP synthase from *Escherichia coli*. *Journal of Experimental Biology*. 203(1). 19-28.
- Azzi, A., Bragadin, M.A., Tamburro, A.M., & Santato, M. (1973). Site-directed spin labeling of the mitochondrial membrane. Synthesis and utilization of the adenosine triphosphatase inhibitor (N-(2, 2, 6, 6-tetramethyl-piperidyl-1-oxyl)-N'-(cyclohexyl)-carbodiimide). *The Journal of Biological Chemistry*. 248(15). 5520-5526.
- Baker, S.C., Ferguson, S.J., Ludwig, B., Page, M.D., Ritcher, O.M. and van Spanning, R.J. (1998). Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiol Mol Biol*. 62. 1046-1078.
- Baker, L.A., Watt, I.N., Runswick, M.J., Walker, J.E. & Rubinstein, J.L. (2012). Structure of mitochondrial ATP synthase by cryo-EM. *PNAS*. 109(29). 11675-11680.
- Beijerinck, M., u. D. C. J. Minkman. (1910). Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien. *Zbl. Bakt., II. Abt.* 25, 30-63.
- Berry, E.A., Trumpower, B.L. (1985). Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome bc<sub>1</sub> and cytochrome c-aa<sub>3</sub> complexes. *The Journal of Biological Chemistry*. 260(4). 2458-2467.
- Blum, T. B., Hahn, A., Meier, T., et al. (2019). Dimers of mitochondrial ATP synthase induce membrane curvature and self-assemble into rows. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 116(10). 4250-4255.
- Boyer, P.D. (1993). The binding change mechanism for ATP synthase – Some probabilities and possibilities. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1140(3). 215-250.
- Boyer, P.D. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annual review of Biochemistry*. 66. 717-749.
- Braig, K., Menz, R.I, Montgomery, M.G., Leslie, A.G. & Walker, J.E: (2000). Structure of bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase inhibited by Mg<sub>2+</sub>ADP and aluminium fluoride. *Structure*. 8(6). 567-573.

Cabezón, E., Butler, P.J., Runswick, M.J. & Walker, J.E. (2000). Modulation of the Oligomerization State of the Bovine F<sub>1</sub>-ATPase Inhibitor Protein, IF<sub>1</sub>, by pH. *J. Biol. Chem.* 275(33). 25460-25464.

Cattell, K.J., Lindop, C.R., Knight, I.G., & Beechey, R.B. (1971). The identification of the site of action of NN'-dicyclohexylcarbodi-imide as a proteolipid in mitochondrial membranes. *The Biochemical Journal.* 125(1). 169-177.

Chazotte, B., Vanderkooi, G., & Chignell, D. (1982). Further studies on F<sub>1</sub>-ATPase inhibition by local anesthetics. *Biochimica et Biophysica Acta.* 680(3). 310-316.

Chen, R., Runswick, M., Carroll, J., Fearnley, I., Walker, J.E. (2007). Association of two proteolipids of unknown function with ATP synthase from bovine heart mitochondria. *FEBS Letters.* 581(17). 3145-3148.

Copeland A., Lucas S., Lapidus A. (2006). Complete sequence of chromosome 1, 2 and plasmid1 of *Paracoccus denitrificans* PD1222. Recuperado el día 21 marzo 2020 de <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000000361>.

Dabbeni-Sala, F., Schiavo, G., & Palatini, P. (1990). Mechanism of local anesthetic effect on mitochondrial ATP synthase as deduced from photolabelling and inhibition studies with phenothiazine derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1026. 117-125.

Davis, D., Duodoroff, M. (1969). Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: taxonomic implications. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 19(4). 375-390.

Deckers-Herbstreit, G., Altendorf, K. (1992). The F<sub>o</sub> complex of the proton-translocating F-type ATPase of *E. coli*. *Journal of Experimental Biology.* 172(1). 451-459.

Deckers-Herbstreit, G., Altendorf, K. (1996). The F<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-type ATP synthase of bacteria: structure and function of F<sub>o</sub> complex. *Annual Reviews of Microbiology.* 50(1). 791-824.

Devenish, R.J., Prescott, M.G., Boyle, M. and Nagley, P. (2000). The oligomycin axis of mitochondrial ATP synthase: OSCP and the proton channel. *Journal of Bioenergetic. Biomembrane.* 32(1). 507-515.

Dickson, V.K., Silvester, J.A., Fearnley, I.M., Leslie, A.G. & Walker, J.E. (2006). On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase. *The EMBO Journal.* 25(12). 2911-2918

Dmitriev, O., Jones, P.C., Jiang, W., et al. (1999). Structure of the membrane domain of subunit b of *Escherichia coli* F<sub>o</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase. *Journal of Biological Chemistry.* 274(22). 15598-15604.

Fillingame, R.H., Jones, P.C., Jiang, W., Valiyaveetil, F.I. & Dmitriev, Y.O. (1998). Subunit organization and structure in the F<sub>o</sub> sector of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1365(1-2). 135-142.

- Fewson, C.A., Nicholas, D.J.D. (1961). Respiratory enzymes in *Micrococcus denitrificans*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 48(1). 208-210.
- Garcia, J.d.J., Tuena de Gómez-Puyou, M. & Gómez-Puyou, A. (1995). Inhibition by trifluoperazine of ATP synthesis and hydrolysis by particulate and soluble mitochondrial F<sub>1</sub>: Competition with H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. *Journal of Bioenergetics Biomembranes*. 27. 127-136.
- George, C.L., Ferguson, S.J. (1986). NADH dehydrogenase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochemical Society Transactions*. 14(1). 1205-1206.
- Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., & Walker, J.E. (2000). The structure of the central stalk in bovine F<sub>1</sub>-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nature Structural Molecular Biology*. 7(11). 1055-1061.
- Guo, H., Rubinstein, J. L., (2018). Cryo-EM of ATP synthases. *Current Opinion in Structural Biology*. 52(1). 71-79.
- Guo, H., Suzuki, T., Rubinstein, J. L., (2019). Structure of a bacterial ATP synthase. *eLife*. 8:e43128. 1-17.
- Hahnke, S.M., Moosmann, P., Erb, T.J. & Straus, M. (2014). An improved médium for the anaerobic growth of *Paracoccus denitrificans* Pd1222. *Front. Microbiol*. 5(18). 1-19.
- Hederstedt, L. (2002). Succinate:quinone oxidoreductase in the bacteria *Paracoccus denitrificans* and *Bacillus subtilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1553(1). 74-83.
- Hong, S., & Pedersen, P. L. (2008). ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiology and molecular biology reviews*. 72(4). 590-641.
- Iwata, S., Ostermeyer, C., Ludwig, B., Michael, H. (1995). Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*. 376(1). 660-669.
- Jhon, P., Whatley, F.R. (1975). *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature*. 254. 495-498.
- Jhon, P., Whatley, F.R. (1977). The Bioenergetics of *Paracoccus denitrificans*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 463(1). 129-153.
- Junge, W. & Nelson, N. (2005). Nature's Rotatory Electromotors. *Science*. 308(1).
- Kluyver, A. J. (1956). *The Microbe's Contribution to Biology* (Kluyver, A. J. and van Niel, C. B., eds.), (pp. 93-129). Massachusetts. Harvard University Press.
- Koepke, J. y col. (2009). High resolution crystal structure of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase: New insights into the active site and the proton transfer pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1787(6). 635-645.
- Kornberg, H. L., Collins, J. F. (1960). The influence of growth substrates on metabolic pathways in *micrococcus denitrificans*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 39(1). 9-24.



- L. Preiss, J. D. Langer, Ö. Yildiz, L. Eckhardt-Strelau, J. E. G. Guillemont, A. Koul, T. Meier. (2015). Structure of the mycobacterial ATP synthase Fo rotor ring in complex with the anti-TB drug bedaquiline. *Sci. Adv.* 1, e1500106.
- Lau W.C., Baker L.A. & Rubinstein J.L. (2008). Cryo-EM structure of the yeast ATP synthase. *Journal of Molecular Biology.* 382(5). 1256-1264.
- Laikind, P.K., Goldenberg, T.M., & Allison, W.S. (1982). On the mechanism of inhibition of the bovine heart F1-ATPase by local anesthetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 109(2). 423-427.
- Lee. J. et al. (2015). Organization of Subunits in the Membran Domain of the Bovine F-ATPase Revealed by Covalent Cross-linking. *Journal of Biological Chemistry.* 290(21). 13308-13320.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2018). *Principios de Bioquímica 7ª ed.* Editorial Omega. México.
- Ludwig, B., Schatz, G. (1980). A two subunit cytochrome c oxidase (cytochrome aa<sub>3</sub>) from *Paracoccus denitrificans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77(1). 196-200.
- Margullis, L. (1970). *Origin of eukariotic cells.* University Press. New Haven
- Medhi, K., Gupta, A. & Thakur, I. (2019). Biological nitrogen removal from wastewater by *Paracoccus denitrificans* ISTOD1: Optimization of process parameters using response surface methodology. 5. 41-48.
- Morales-Ríos, E. (2011). Clonación, sobreexpresión, purificación y caracterización de las subunidades épsilon y de 11-kDa presentes en la ATP sintasa de *P. denitrificans*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Morales-Ríos, E., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., Walker, J.E. (2015). Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution. *PNAS.* 112(1). 13231-13236.
- Morales-Ríos, E., Watt, I.N., Zhang, Q., Ding S., Fearnley, I.M., Montgomery, M.G., Wakelam, M.J.O., Walker, J.E. (2015). Purification, characterization and crystallization of the F-ATPase from *Paracoccus denitrificans*. *Open Biology.* 5:150119.
- Morales-Ríos, E., de la Rosa-Morales, F., Mendoza-Hernández, G. et al. (2009). A novel 11-kDa inhibitory subunit in the F1Fo ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related  $\alpha$ -proteobacteria. *The FASEB Journal.* 24. 1-10.
- Muhlheip, A., McComas, S.E. & Amunts, A. (2019). Structure of a mitochondrial ATP synthase with bound native cardiolipin. *eLife* 2019;8:e51179. 1-23.
- Murphy, BJ, Klusch, N, Langer, J, Mills, DJ, Yildiz, Ö, Kühlbrandt, W. (2019). Rotary substates of mitochondrial ATP synthase reveal the basis of flexible F-F coupling. *Science.* 364(6446). 1-10.

- Nagley, P., Hall, R. M. and Ooi, B.G. (1986). Amino acid substitutions in mitochondrial ATPase subunit 9 of *Saccharomyces cerevisiae* leading to oligomycin or venturicidin resistance. *FEBS Lett.* 195(1). 159-163.
- Nauyalis, P.A., Hindahl, M.S. & Wilkinson, B.J. (1985). Isolation, characterization and protein and polar lipid composition of *Paracoccus denitrificans* outer membrane. *Biochimica et Biophysica Acta.* 840(1). 297-308.
- Narayan, S., Wyatt, D. L., Crumrine, D. S., & Cukierman, S. (2007). Proton transfer in water wires in proteins: modulation by local constraint and polarity in gramicidin a channels. *Biophysical journal.* 93(5). 1571–1579.
- Nesci, S., Trombetti, F., Ventrella, V., Pagliarani, A. (2016). The c-Ring of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase: Facts and Perspectives. *J. Membr. Biol.* 249(1-2). 11-21.
- Nicholls, D.G. Ferguson, S.J. (2013). Chapter 5. Respiratory Chains. En David G. Nicholls (Ed). *Bioenergetics.* (pp 91-157). Academic Press.
- Nokhal, T-H. & Schlegel, H.S. (1983). Taxonomic Study of *Paracoccus denitrificans*. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 33(1). 26-37.
- Ostermeier, C., Harrenga, A. (1997). Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody FV fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94(20). 10547-10553.
- Pennoyer, J.D., Ohnishi, T., Trumpower, B.L. (1988). Purification and properties of succinate-ubiquinone oxidoreductase complex from *Paracoccus denitrificans*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 935(2). 195-207.
- Pogoryelov, D., Yildiz, Ö., Faraldo-Gómez, J. et al. (2009). High-resolution structure of the rotor ring of a proton-dependent ATP synthase. *Nat Struct Mol Biol* 16. 1068–1073.
- Rees, D.M., Leslie, A.G. & Walker, J.E. (2009). The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase. *PNAS.* 106(51). 21597-21601.
- Rob J.M., van Spanning, David J. (2007). Chapter 1. Introduction to the Biochemistry and Molecular Biology of Denitrification. En Hermann Bothe (Ed), *Biology of the Nitrogen Cycle.* (pp. 3-20). Elsevier.
- Rubinstein J.L., Walker J.E. & Henderson, R. (2003) Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *EMBO Journal.* 22(23). 6182-6192.
- Schagger, H. (2002): Respiratory chain supercomplex of mitochondria and bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1555. 154-159.
- Schulz, S., Wilkes, M., Dereck, J., et al. (2017). Molecular architecture of the N-type ATPase rotor ring from *Burkholderia pseudomallei*. *EMBO Reports.* 18(1). 526–535.
- Slabas, A. R., Whatley, F. R. (1974). Regulation of Pyruvate Kinase in *Micrococcus denitrificans*. *Biochem Soc Trans* 1. 2(5). 929-930.

- Slabas, A.R., Whatley, F.R. (1977). Metabolic regulation of pyruvate kinase isolated from autotrophically and heterotrophically grown *Paracoccus denitrificans*. *Archives of Microbiology*. 115. 67-71.
- Stewart, A.G., Sobti, M., Harvey, R.P., Stock, D. (2013). Rotary ATPases: models, machine elements and technical specifications. *Bioarchitecture*. 3(1). 2-12.
- Sobti et al. (2016). Cryo-EM structures of the autoinhibited *E. coli* ATP synthase in three rotational states. *eLife* 5:e21598. 1-18.
- Srivastava, A.P., Luo, M., Zhou, W., Symersky, J., Bai, D., Chambers, M.G., Faraldo-Gómez, J.D., Liao, M., Mueller, D.M. (2018). High-resolution cryo-EM analysis of the yeast ATP synthase in a lipid membrane. *Science*. 360(6389). 1-8.
- Stock, D., Leslie, G.W. & Walker, J.E. (1999). Molecular Architecture of the Rotatory Motor in ATP Synthase. *Science*. 286(5445). 1700-1705.
- Stroh, A., Anderka, O., Yagi, T. (2004). Assembly of Respiratory Complexes I, III and IV into NADH Oxidase Supercomplex Stabilizes Complex I in *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Biological Chemistry*. 279(6). 5000-5007.
- Strohm, T. O., Griffin, B. (2007). Growth Yields in Bacterial Denitrification and Nitrate Ammonification. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(5). 1420-1424.
- Stryer, L. (2013). Capítulo 18. Cadena Respiratoria. *Bioquímica con aplicaciones clínicas*. (pp. 525-565). Barcelona, España. Reverte.
- Tanaka, K., Mori, S., Hirata, M. & Matsusaki, H. (2016). Autotrophic Growth of *Paracoccus denitrificans* in Aerobic Condition and Accumulation of Biodegradable Plastic from CO<sub>2</sub>. *Environment and Ecology Research*. 4(4). 231-236.
- Uemoto, H., & Saiki, H. (1996). Nitrogen removal by tubular gel containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*. *Applied and environmental microbiology*, 62(11), 4224–4228.
- Uhlen, U., Cox, G.B. & Guss, J.M. Crystal structure of the epsilon subunit of the proton-translocating ATP synthase from *Escherichia coli*. *Structure*. 5(9). 1219-1230.
- Van Verseveld, H.W., Braster, M., Boogerd, F.C. et al. (1983). Energetic aspects of growth of *Paracoccus denitrificans*: oxygen-limitation and shift from anaerobic nitrate-elimination to aerobic succinate-limitation. *Arch Microbiol*. 135. 229–236.
- Verghese, F., Blaza J.N., Jones A.J.Y., Jarman, O.D. & Hirst, J. (2017). Deleting the IF1-like z subunit from *Paracoccus denitrificans* ATP synthase is not sufficient to activate ATP hydrolysis. *Open Biology*. 8(1). 1-10.
- Vik, S.B., Cain, B.D., Chun, K.T., Simoni, R.D. (1988). Mutagenesis of the alpha subunit of the F1Fo-ATPase from *Escherichia coli*. Mutations at Glu-196, Pro-190, and Ser-199. *The Journal of Biological Chemistry*. 263(1). 6599-6605.

- Vik, S.B., Long, J.C., Wada, T., Zhang, D. (2000). A model for the structure of subunit a of the *Escherichia coli* ATP synthase and its role in proton translocation. *Biochimica Et Biophysica Acta Bioenergetics* 1458(1). 457-466.
- Walker, J. E. (2013). The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochemical Society Transactions*. 41(1). 1-16.
- Walker, J.E. (1994). The regulation of catalysis in ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol*. 4(6). 912-918.
- Watt, I. N., Montgomery, M. G., Runswick, M. J. et al. (2010). Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *PNAS*. 107(39). 16823-16827.
- Welch, A.K., Clagget, S.B. & Cain, B.D. (2008). The b (arg36) contributes to efficient coupling in F(1)F(o) ATP synthase in *Escherichia coli*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40(1).
- Wittig, I., Schägger, H. (2008). Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et Biophysica. Acta*. 1777(7-8). 592-598.
- Witting, I., Braun, H-P., & Schagger H. (2006). Blue native PAGE. *Nature Protocols*. 1(1). 418-428.
- Yagi, T. (1986). Purification and characterization of NADH dehydrogenase complex from *Paracoccus denitrificans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 250(2). 302-311.
- Yang, X., Trumpower, B.L. (1985). Purification of a Three-subunit Ubiquinol-Cytochrome c Oxidoreductase Complex from *Paracoccus denitrificans*. *The Journal of Biological Chemistry*- 261(26). 12282-12289.
- Yang, X., Trumpower, B.L. (1986). Isolation of a Three-Subunit Cytochrome bc<sub>1</sub> Complex from *Paracoccus Denitrificans*. *Methods in Enzymology*. 126(1). 316-325.
- Yoshida, M., Allison, W.S., Esch, F.S., & Futai, M. (1982). The specificity of carboxyl group modification during the inactivation of the *Escherichia coli* F1-ATPase with dicyclohexyl[<sup>14</sup>C]carbodiimide. *The Journal of Biological Chemistry*. 257(17). 10033-10037.
- Zhao J., Benlekbir S., Rubinstein J.L. (2015). Electron cryomicroscopy observation of rotational states in a eukaryotic V-ATPase. *Nature*. 521(1). 241–245.
- Zhou, et al. (2015). Structure and conformational states of the bovine mitochondrial ATP synthase by Cryo-EM. *eLife*. 4:e10180. 1-15.