



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA  
DE LA SUBUNIDAD  $\alpha$  Y EL NÚCLEO CATALÍTICO DEL  
SECTOR  $F_1$ -ATPASA DE LA ATP-SINTASA DEL TERMÓFILO  
*Geobacillus kaustophilus***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**Doctor en Ciencias**

PRESENTA:

**GUILLERMO SALCEDO BARRIENTOS**

**TUTOR PRINCIPAL**

Dr. Enrique García Hernández  
Instituto de Química, UNAM

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

Dra. Marietta Tuena Sangri  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

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

Ciudad de México. Septiembre, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

La presente tesis fue realizada en el Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Enrique García Hernández. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del Proyecto PAPIIT IN205018, así como del Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACyT), proyectos 235831. Se agradece el apoyo de las técnico académicas María Concepción José Núñez, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, y de la Dra. Patricia Cano Sánchez, del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Química, UNAM. Guillermo Salcedo Barrientos recibió la beca de doctorado 328593, otorgada por CONACyT. También se agradece al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), el apoyo brindado para asistir a congresos.

## Agradecimientos

Agradezco a todos aquellos que me ayudaron a realizar el doctorado y crecer académicamente.

A la Universidad Autónoma de México (UNAM) y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Facultad de Química, por la formación académica ofrecida.

A los Drs. Marietta Tuena de Gómez Puyou y Armando Gómez Puyou por su confianza para permitirme trabajar en su laboratorio. Por compartir vivencias y enriquecer mi visión del mundo con su basto conocimiento de las ciencias bioquímicas.

Al Dr. Enrique García Hernández por su tutoría, por la libertad para desarrollar el proyecto y compartir sus ideas sobre proteínas, energías y la vida.

Al Dr. José de Jesús García Trejo por compartir su conocimiento sobre la enzima maravillosa que es la ATP sintasa.

Al Dr. Alfredo Torres Larios por compartir su experticia en la clonación, expresión y purificación de proteínas.

A la Dra. Patricia Cano Sánchez por su amistad y su extraordinario conocimiento en el manejo de las técnicas de clonación y Biología Molecular utilizadas en la presente tesis.

A la Técnico Q.F.B. María Concepción José Nuñez por enseñarme las técnicas de electroforesis, cromatografía líquida y a utilizar los múltiples equipos presentes en los laboratorios 104 y 105-OTE del Instituto de Fisiología Celular.

A todos los asistentes a los seminarios de resultados de los Drs. Puyou quienes me orientaron y aportaron ideas interesantes para discutir y desarrollar en el presente trabajo: Dra. Leticia, Dr. Jesús, Dr. Horacio, Dr. Célis, Carlos, Gustavo, Mariel, Concepción, Beatriz. Nayeli,

A todos mis profesores que me enseñaron sus conocimientos sobre Bioquímica y me encandilaron más en esta maravillosa ciencia

A Leticia García Gutierrez, Norma Trejo Medina, Rosa Lilia de la Rocha Viñas, Adelina González Pérez y Julio Ignacio Palacios Ordoñez, personal administrativo de posgrado por su diligencia en todos los trámites académicos.

A todos mis compañeros del posgrado que me hicieron la vida más amena durante mi estancia y desarrollo de este proyecto y con los que discutimos temas diversos de ciencia, sociedad y de la vida, entre otros a: Christian, Igor, Israel, Eleane, Axel, Monica, Selma, Paulette, Fco. Guillermo, Carlos, Gustavo, Katia, Luis Pablo, Aaron, Ernesto, Hector, Martha Irais, Rafael, Sergio.

A mi Papá que siempre me apoyo durante todo el tiempo que trabaje en este proyecto.

A todos mis amigos que siempre me han acompañado en este proyecto llamado vida.

# Índice

Abreviaturas .....	6
Resumen .....	7
Abstract .....	8
<b>1. Introducción General .....</b>	<b>9</b>
1.1 ATP, molécula que provee energía a la vida .....	9
1.2 ATP sintasa .....	11
1.3 Mecanismo catalítico .....	16
1.4 Sitios de unión de nucleótidos en F <sub>1</sub> .....	18
1.4.1 Sitios intercambiables y no intercambiables .....	18
1.4.2 Interacción cooperatividad entre los sitios de unión .....	20
1.4.3 El Mg(II) en la unión de nucleótidos .....	24
1.4.4 Eventos de unión y su efecto cinético.....	25
1.4.5 Cambios conformacionales entre subunidades.....	27
1.4.6 Correlación Estructura-Energía (función) .....	30
1.5 Termodinámica del reconocimiento molecular .....	37
1.5.1 El reconocimiento de proteína-ligando y su energía asociada .....	39
1.5.2 $\Delta C_p$ acoplador entre energética y estructura .....	40
1.5.3 Técnicas calorimétricas .....	42
<b>2. Antecedentes de este trabajo .....</b>	<b>46</b>
<b>3. Hipótesis .....</b>	<b>51</b>
<b>4. Objetivos .....</b>	<b>52</b>
4.1 Objetivo General .....	52
4.2 Objetivos Particulares .....	52
<b>5. Métodos.....</b>	<b>53</b>
5.1 Clonación de la subunidad $\alpha$ de <i>Bacillus PS3</i> (T $\alpha$ ) y <i>Geobacillus kaustophilus</i> (G $\alpha$ ).....	53
5.2 Ensayos de expresión .....	54
5.3 Purificación de la subunidad $\alpha$ .....	54
5.4 Purificación de la subunidad $\alpha$ con colas de histidina .....	55
5.5 Estado de agregación de la subunidad T $\alpha$ .....	56
5.6 Expresión y purificación del complejo GF <sub>1</sub> Cys/Trp less.....	57
5.7 Pureza y concentración.....	58
5.8 Calorimetría de titulación isotérmica (CTI).....	58

<b>6. Resultados</b> .....	59
6.1 Clonación y Purificación .....	61
6.1.1 Clonación de G $\alpha$ .....	61
6.1.2 Clonación de G $\alpha$ -His .....	61
6.1.3 Purificación de G $\alpha$ -His.....	62
6.1.4 Caracterización de la subunidad G $\alpha$ por espectrometría de masas .....	63
6.1.5 Purificación del complejo GF $_1$ ( $\alpha_3\beta_3\gamma$ ) .....	64
6.2 Calorimetría de titulación isotérmica (CTI) para la subunidad G $\alpha$ -His aislada .....	67
6.2.1 Afinidad de los complejos G $\alpha$ -ATP y G $\alpha$ -MgATP.....	69
6.2.2 Termodinámica de unión complejos G $\alpha$ -ATP y G $\alpha$ -MgATP .....	72
6.3 Diferencias en la energética de unión entre la subunidad no catalítica (G $\alpha$ ) y la subunidad catalítica (T $\beta$ ) .....	73
6.4 Influencia del Mg(II) en el reconocimiento de nucleótido .....	74
6.5 Cambio conformacional de la subunidad $\alpha$ al unir MgATP .....	76
6.6 Calorimetría de la unión de ADP al complejo $\alpha_3\beta_3\gamma$ (GF $_1$ ) .....	78
<b>7. Discusión</b> .....	81
<b>8. Conclusiones</b> .....	87
<b>9. Perspectivas</b> .....	89
<b>10. Bibliografía</b> .....	90
<b>11. Apéndices</b>	
A. Agregación Subunidad $\alpha$ de <i>Bacillus PS3</i> (T $\alpha$ ) .....	103
A.1 Purificación de la subunidad $\alpha$ con colas de histidina (T $\alpha$ -His) .....	103
A.2 Agregación de la subunidad $\alpha$ de <i>Bacillus PS3</i> (T $\alpha$ ) y de <i>Geobacillus kaustophilus</i> (G $\alpha$ ) .....	104
B. Artículos producto de esta investigación .....	105

# Abreviaturas

Moléculas	Parámetros
<p><b>ATP:</b> Adenosín trifosfato  <b>ADP:</b> Adenosín difosfato  <b>Pi:</b> Fosfato inorgánico  <b>GTP:</b> Guanosín trifosfato  <b>ITP:</b> Inosín trifosfato  <b>UTP:</b> Uridín trifosfato  <b>NTPs:</b> nucleótidos trifosfatados  <b>AMPPNP:</b> Análogo no hidrolizable del ATP  <b>DCCD:</b> Diciclohexilcarbodiimida  <b>Nbf-Cl:</b> 4-Chloro-7-nitrobenzofurazan  <b>FSBA:</b> 5'-p-fluorosulfonilbenzoiladenosina  <b>ALF4:</b> Fluoro aluminato  <b>IPTG:</b> Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido  <b>EDTA:</b> Ácido etilendiaminotetraacético  <b>DEAE:</b> Dietilaminoetil  <b>BCA:</b> Ácido bicinconinico</p>	<p><b>Δμ:</b> Potencial electroquímico  <b>ΔH<sub>u</sub>:</b> Cambio de Entalpía de unión  <b>ΔS<sub>u</sub>:</b> Cambio de Entropía de unión  <b>ΔC<sub>p</sub><sub>u</sub>:</b> Cambio de Capacidad calorífica de unión  <b>K<sub>u</sub>:</b> Constante de unión  <b>K<sub>a</sub>:</b> Constante de disociación  <b>ΔG<sub>u</sub>:</b> Cambio de energía libre de Gibbs  <b>R:</b> Constante de los gases ideales (1.98 cal mol<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup>)  <b>ΔS<sub>solv</sub>:</b> Cambio de Entropía de solvatación  <b>ΔS<sub>conf</sub>:</b> Cambio de Entropía conformacional  <b>ΔS<sub>r-t</sub>:</b> Cambio de Entropía de rotación y translación  <b>ΔΔH:</b> Cambio de cambio de entalpía  <b>TΔΔS:</b> Cambio del cambio de entropía multiplicado por la temperatura  <b>ΔT:</b> Cambio de Temperatura  <b>CTI :</b> Calorimetría de titulación isotérmica  <b>Q o q :</b> Calor intercambiado  <b>LT/MT :</b> Relación molar entre ligando total y Macromolécula total  <b>ΔASA:</b> Cambio de área accesible al solvente</p>
<p style="text-align: center;"><b>Proteínas</b></p>	
<p><b>OSCP:</b> Proteína que confiere sensibilidad a oligomicina.  <b>EF<sub>1</sub>:</b> Sector F<sub>1</sub> de <i>Escherichia coli</i>.  <b>MF<sub>1</sub>:</b> Sector F<sub>1</sub> de mitocondria bovina.  <b>TF<sub>1</sub>:</b> Sector F<sub>1</sub> de <i>Bacillus PS3</i>.  <b>GF<sub>1</sub>:</b> Sector F<sub>1</sub> de <i>Geobacillus kaustophilus</i>.  <b>Gα:</b> Subunidad α de <i>Geobacillus kaustophilus</i>.  <b>Tα:</b> Subunidad α de <i>Bacillus PS3</i>.  <b>Gα-His:</b> Gα con colas de histidina.  <b>Tα-His:</b> Tα con colas de histidina.  <b>YX(j)<sup>aa#</sup>:</b> donde, <b>Y:</b> organismo (E.coli (E), Mitocondria (M), Levadura (Y), Bacillus PS3 (T), Geobacillus (G), <b>X:</b> subunidad(α, β, γ, δ, ε, a, c), <b>(i):</b> conformaciones(DP, TP, E), <b>aa:</b> cualquiera de los 20 aminoácidos, <b>#:</b> numero de residuo. Ejemplos: Mα<sub>DP</sub><sup>D336</sup>, Eβ<sub>TP</sub><sup>V43</sup></p>	
<p style="text-align: center;"><b>Técnicas</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Unidades</b></p>
<p><b>DM/MC:</b> Dinámica molecular/Mecánica cuántica.  <b>NMR:</b> Resonancia magnética nuclear  <b>PCR:</b> Reacción en cadena de la polimerasa  <b>DLS:</b> Dispersión dinámica de Luz  <b>CD:</b> Dicroísmo circular  <b>FL:</b> Fluorescencia  <b>NCBI:</b> National Center for Biotechnology  <b>pdb:</b> Base de datos de proteínas</p>	<p><b>pN nm:</b> PicoNewtons por nanómetro (medida de fuerza)  <b>ns:</b> nano segundos  <b>nm:</b> nanometros  <b>mM:</b> milimolar  <b>μM:</b> micro molar  <b>Da:</b> Daltones  <b>mL:</b> mililitros  <b>Å<sup>2</sup>:</b> Amstrongs cuadrados</p>

# Resumen

El complejo  $F_1$  es el núcleo donde ocurre la catálisis de la ATP sintasa.  $F_1$  está formado de un anillo hexamérico de subunidades  $\alpha$  (no catalíticas) y  $\beta$  (catalíticas) en posiciones alternadas. Gran número de datos experimentales y bioquímicos han generado una imagen detallada del papel que realizan las subunidades catalíticas. No obstante, el papel funcional de las subunidades no catalíticas continúa siendo incierto. En este estudio caracterizamos calorimétricamente la asociación de los nucleótidos de adenosina a la subunidad  $\alpha$  aislada de *Geobacillus kaustophilus*. Las firmas termodinámicas de unión de nucleótidos por parte de la subunidad  $\alpha$  resultaron similares a las reportadas previamente para la subunidad  $\beta$ , caracterizadas por afinidades en el intervalo  $\mu\text{M}$  dirigidas por la entalpía. Sin embargo, la subunidad catalítica reconoce MgATP y MgADP con una afinidad comparable, mientras que la subunidad no catalítica presenta preferencia por MgATP. La estabilización del ATP en la subunidad  $\alpha$  presenta mayor dependencia a la presencia de Mg(II), mientras ambas subunidades son casi independientes del metal para el reconocimiento de ADP. Este comportamiento de unión concuerda con las propiedades que muestran cada subunidad dentro del complejo  $F_1$ . Para investigar sobre el comportamiento conformacional de la subunidad  $\alpha$ , se compararon los cambios de capacidad calorífica determinados calorimétricamente con descriptores estructurales obtenidos a partir de simulaciones de dinámica molecular (DM) sin sesgo. Las medidas calorimétricas de la subunidad  $\alpha$  aislada indican que esta subunidad no realiza un cambio conformacional significativo al unir nucleótido. Esto concuerda con las simulaciones que muestran que la subunidad libre de nucleótido y unida a nucleótido muestra una conformación promedio similar a la observada en la estructura cristalográfica de  $F_1$ . Las simulaciones además revelan un incremento en la flexibilidad conformacional cuando la subunidad  $\alpha$  une MgATP. En resumen, nuestro estudio apoya la idea de que las subunidades no catalíticas han sido optimizadas para acompañar y transmitir información conformacional entre subunidades  $\beta$  durante el mecanismo rotatorio.



## Abstract

The  $F_1$  complex is the nucleus where the catalysis of the ATP synthase occurs. It consists of three catalytic ( $\beta$ ) and three noncatalytic ( $\alpha$ ) subunits, forming a hexameric ring in alternating positions. A large number of experimental and theoretical data has provided a detailed picture of the complex role played by catalytic subunits. Nevertheless, the functional role of the noncatalytic subunits remains unclear. In this study, we have calorimetrically characterized the association of adenosine nucleotides to the isolated noncatalytic  $\alpha$ -subunit of *Geobacillus kaustophilus*. The thermodynamic signatures of nucleotide binding by the noncatalytic subunit are similar to those previously reported for the isolated catalytic  $\beta$ -subunit, characterized by enthalpically-driven affinities in the  $\mu\text{M}$  range. However, the catalytic subunit recognizes MgATP and MgADP with a comparable affinity, while the non-catalytic subunit shows preference for MgATP. The stabilization of ATP in the  $\alpha$  subunit presents greater dependence to the presence of Mg(II), while both subunits are rather independent of the metal in the recognition of ADP. This binding behavior agrees with the properties shown by each subunit within the  $F_1$  complex. To investigate the conformational behavior of the  $\alpha$  subunit, calorimetric heat capacity changes were compared with structural descriptors obtained from simulations of molecular dynamics (DM) without bias. Calorimetric measurements of the isolated  $\alpha$ -subunit indicate that the subunit undergoes no significant conformational changes upon nucleotide binding. This agrees with MD results that show that the nucleotide-free and nucleotide-bound  $\alpha$ -subunits have average conformations similar to that observed in the  $F_1$  crystal structure. The simulations further reveal an increase in conformational flexibility of the  $\alpha$  subunit upon MgATP binding. Overall, our study supports the idea that non-catalytic subunits have been optimized to accompany and transmit conformational information between  $\beta$  subunits during the rotational mechanism.

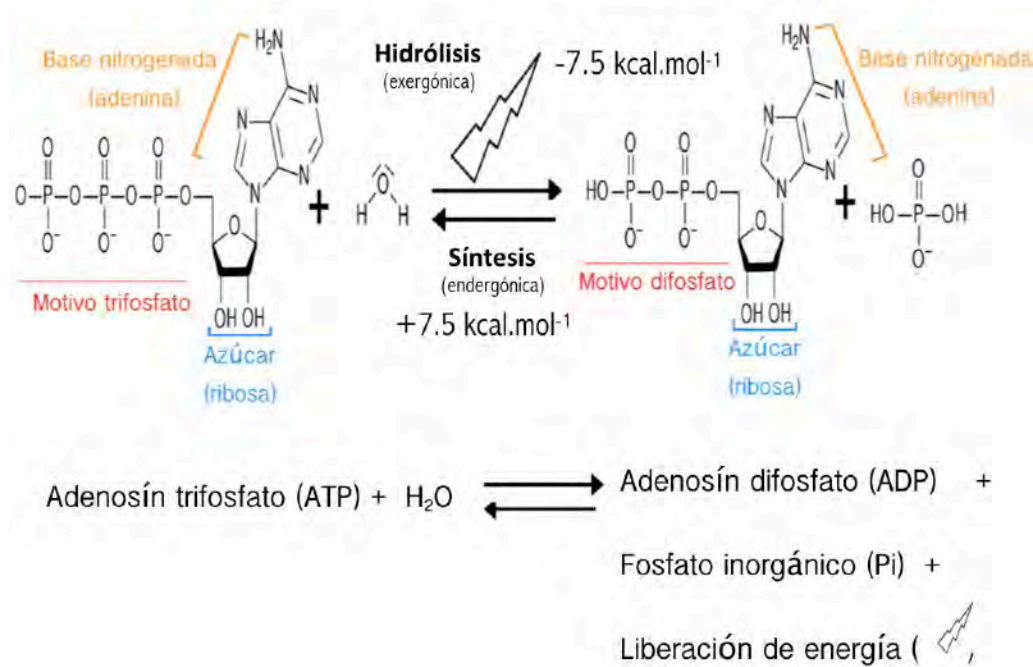
# 1. Introducción General

## 1.1. ATP, molécula que provee energía a la vida

La capacidad inherente de la vida para realizar actividades organizadas y responder a un estímulo en el ambiente, requiere del uso de energía.<sup>(11)</sup> Diferentes tipos de fuentes de energía como la fotosintética, la geoquímica y quimioheterótrofa, le dan sustento a la vida a través de procesos metabólicos que la cosechan y almacenan. El almacenamiento de la energía obtenida a través de la absorción de fotones en la fotosíntesis o con la oxidación de moléculas de glucosa durante la glucólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa, se realiza en la molécula llamada adenosín trifosfato (ATP). La mayor parte de la energía obtenida por cualquier célula es dirigida a la producción endergónica de esta molécula, almacenándola en la formación del enlace de alta energía entre el adenosín difosfato (ADP) y el fosfato inorgánico (Pi) (Figura 1). En esta molécula la energía es invertida en su síntesis y el uso de la energía almacenada se lleva a cabo al acoplar la hidrólisis del enlace de alta energía con otra reacción que necesite de energía. En un ser humano de 70 kg con una esperanza de vida de 75 años, se ha calculado que se generaran aproximadamente 2 millones de kg de ATP, es decir, su peso de ATP cada día.<sup>(5)</sup>

El papel universal que juega el ATP en la naturaleza es el de transferir la energía acumulada en su estructura. La hidrólisis de esta molécula, así como la de los análogos GTP, ITP y UTP hacia nucleótidos difosfatos (NTPs) y fosfato inorgánico (Pi) genera ~7.5 kcal/mol de energía en condiciones estándar. Esta energía se utiliza en distintos procesos indispensables para la vida que necesitan llevar a cabo un trabajo. Estos incluyen síntesis de DNA, RNA, proteínas, mantener el metabolismo y la motilidad. Aunque visualmente no podemos observar el trabajo que es realizado por enzimas y que utilizan el ATP como fuente de energía en nuestro cuerpo, es posible observar el efecto macroscópico de estas. Un ejemplo es la contracción muscular que permite cargar objetos o cargar nuestro cuerpo y desplazarnos de un lugar. En este proceso las proteínas motoras usan la energía de unión e hidrólisis de ATP para generar cambios conformacionales que permiten la contracción de filamentos y fibras musculares. Otros

trabajos que utilizan contracción muscular son la respiración y el bombeo que realiza el corazón, haciendo que en nuestro día a día el uso de ATP sea esencial. (74, 179)



**Figura 1.** Esquema de hidrólisis y síntesis de ATP. En colores se muestran las unidades que forman la estructura de ATP y ADP. Los términos endergónica y exergónica, se definen respectivamente, como una reacción que absorbe energía y una reacción que libera energía.

La producción de ATP depende de la fuente (fotosíntesis, glucólisis, fosforilación oxidativa, oxidación de ácidos grasos). La forma más eficiente obtener energía es la fosforilación oxidativa y en la década de 1960 la propuesta de transducción de energía enunciada por Peter Mitchell. Se denomina como “Teoría Quimiosmótica” y logró explicar como se obtiene la mayor parte de la energía celular. En esta propuesta existe una cadena que transporta protones entre ambos lados de la membrana tilacoidal, interna mitocondria o bacteriana y genera un potencial electroquímico a través de las membranas celulares. A su vez toda la energía almacenada por el potencial electroquímico es utilizado por un multicomplejo denominado ATP sintasa, haciendo fluir los protones H<sup>+</sup> a través de ella para generar movimiento rotatorio del anillo de subunidades embebido en la membrana. Esta rotación es acoplada mecánicamente al eje de rotación de F<sub>1</sub>, que funciona como leva y dirige cambios conformacionales en las subunidades catalíticas.(62, 120, 172)

## 1.2. ATP sintasa

Las ATP sintasas catalizan la síntesis de ATP, uniendo ADP y fosfato inorgánico. La reacción es endergónica por lo que necesita de energía, que es aportada por la fuerza protón motriz generado entre membranas. Trabajando en reversa la enzima también bombea protones a expensas de la hidrólisis de ATP.

En general, las ATP sintasas de diferentes fuentes presentan estructuras similares compuestas por una parte transmembranal ( $F_0$ ) que conduce iones, y una hidrosoluble ( $F_1$ ) que realiza la catálisis. La estructura general puede presentar variaciones en el número de subunidades complementarias dependientes del organismo (Figura 2). Mediante estructuras cristalográficas y de criomicroscopía, se ha determinado la forma tridimensional de subunidades y diferentes subcomplejos de la ATP sintasa. El complejo de bacterias no fotosintéticas posee la estructura más simple, formando una enzima de hasta 500 kDa por la interacción entre las subunidades  $abc_{9-13}$  en  $F_0$ , y  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  en  $F_1$ . Para las estructuras más complejas, como la de mitocondria de corazón de bovino o *Saccharomyces cerevisiae*, el tamaño puede llegar a ser de más de 600 kDa y tienen la capacidad de formar dímeros, arreglo que no se observa en bacterias (Figura 2C).<sup>(49)</sup>

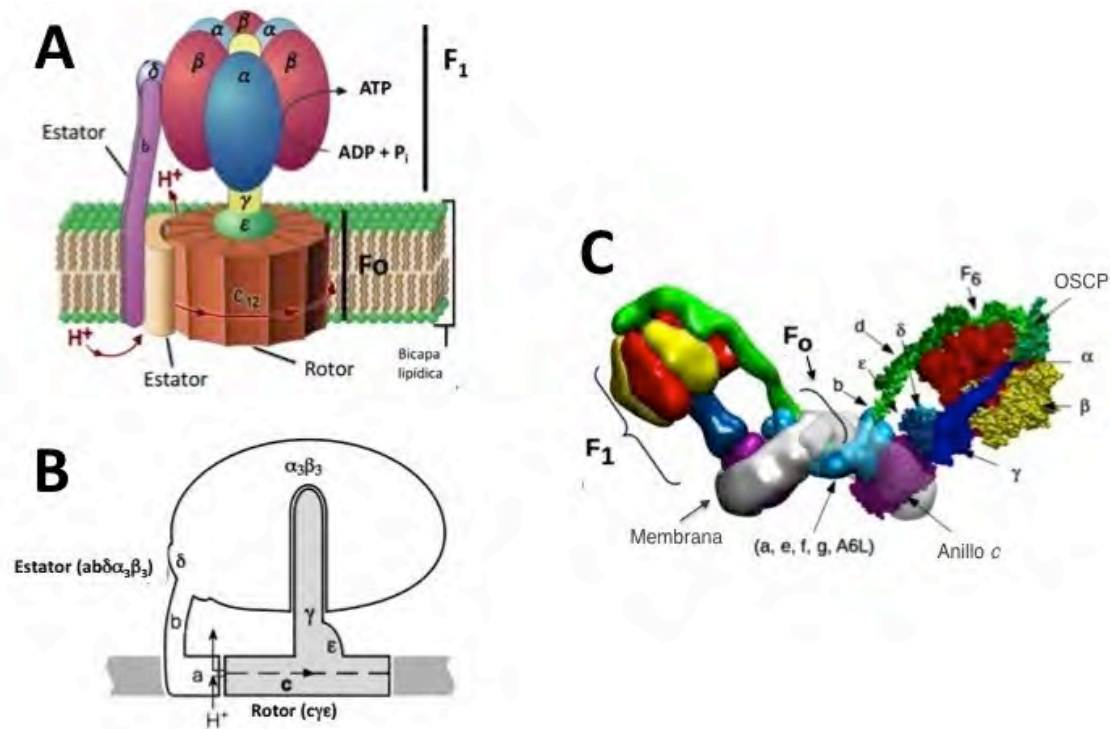
Desde el aislamiento del factor soluble  $F_1$  de la ATP sintasa por Racker en la década de los 60, <sup>(151, 159)</sup> se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo de esta enzima, conociéndose actualmente muchos de los aspectos generales del mecanismo de su funcionamiento. Un aspecto importante de esta enzima es que puede unir ATP y ADP con afinidades similares, aun en una célula viva y activa en donde las concentraciones citosólicas de ATP y  $P_i$  se encuentran en el intervalo de 2-5 mM, mientras que la concentración de ADP es de 10 a 50 veces menor. <sup>(4, 200)</sup> Se han realizado muchos experimentos bioquímicos con esta enzima que ayudaron a entender el mecanismo catalítico que realiza. También se han obtenido distintas estructuras cristalográficas que permiten asociar las posiciones observadas para residuos de aminoácidos claves con eventos moleculares detallados durante el mecanismo catalítico. En conjunto todos los datos y observaciones han ayudado a entender el proceso por el cual la enzima acopla el gradiente de protones a la formación de ATP. <sup>(1, 19, 27, 28, 37, 79, 99, 100, 119, 147)</sup>

En bacterias, la parte transmembranal conductora de iones, denominada  $F_0$ , está compuesta por tres diferentes subunidades con estequiometría  $abc_{9-13}$ . Las múltiples subunidades  $c$  forman un anillo membranaral (Figura 3). La subunidad  $a$  se localiza también en la membrana, haciendo contacto por fuera con el anillo de subunidades  $c$ , y

las dos subunidades *b* se anclan a una cara que forma la unión de la subunidad *a* y el anillo.<sup>(13, 130)</sup> La subunidad *c* está compuesta por dos hélices- $\alpha$  antiparalelas conectadas por un asa polar que se expone hacia donde se encuentra  $F_1$  (Figura 3A). El número de subunidades *c* del anillo varía dependiendo del organismo. Se pueden encontrar anillos constituidos por 10 protómeros en *Escherichia coli* y *Bacillus PS3*, 11 en *Ilyobacter tartaricus* y 15 en espirulina, entre otros, según mediciones realizadas por microscopía de fuerza atómica (Figura 3B).<sup>(154)</sup> La subunidad *a* (Figura 3C) está formada por 6 hélices transmembranales y presenta un residuo de arginina altamente conservado en la cuarta hélice transmembranal, que interactúa con la subunidad *c*. La subunidad *b* es una proteína helicoidal alargada, que tiene el extremo amino-terminal incrustado en la membrana y su extremo carboxilo-terminal interacciona con las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  en el extremo más lejano a la membrana de  $F_1$ . La mayor parte del motor rotatorio  $F_0$ , que se encuentra embebido en la membrana, permite el paso de protones y convierte la energía electroquímica en trabajo mecánico, generando la rotación del anillo de subunidades *c* (Figura 2A).

Los motores rotacionales similares a  $F_0$  tienen dos componentes: (1) un estator anclado fuertemente a la membrana (subunidad *a*) y (2) un rotor con forma de anillo que rota libremente sobre su eje (anillo de subunidades *c*). (Figura 2B) Esta estructura posee además elementos claves para su funcionamiento. Dos hemicanales que permiten el acceso de protones de los reservorios ácido y básico a los sitios del rotor. Estos están contrapuestos respecto a la membrana y le confieren asimetría al flujo de protones (Figura 3E). Otro elemento es la localización de una carga positiva entre los medios canales en el estator, posición que interactúa electrostáticamente con los sitios de carga de protón en el rotor. En *E. coli* la arginina 210 de la subunidad *a* confiere la carga positiva de +1 al estator y quien al presentar un pKa muy alto siempre se encuentra protonada (Figura 3C). Los sitios que portan al protón en el rotor son los residuos aspártico 61 de cada subunidad *c*. Este residuo tiene un pKa intermedio por lo que puede estar protonado o no. La forma desprotonada no puede rotar fuera de la interfaz rotor-estator y solo la protonación de este sitio permite su rotación hacia la bicapa lipídica. Se ha propuesto que la liberación del protón desde el aspártico 61 protonado ocurre con el cerrado de la entrada del hemicanal del reservorio ácido en el periplasma por el giro reverso de las hélices 4 y 5 de la subunidad *a*. Este movimiento ocurre junto a la rotación que acerca un sitio previamente protonado a la carga de la arginina 210, la interacción electrostática reduce el pKa del aspártico 61 permitiendo que el protón se

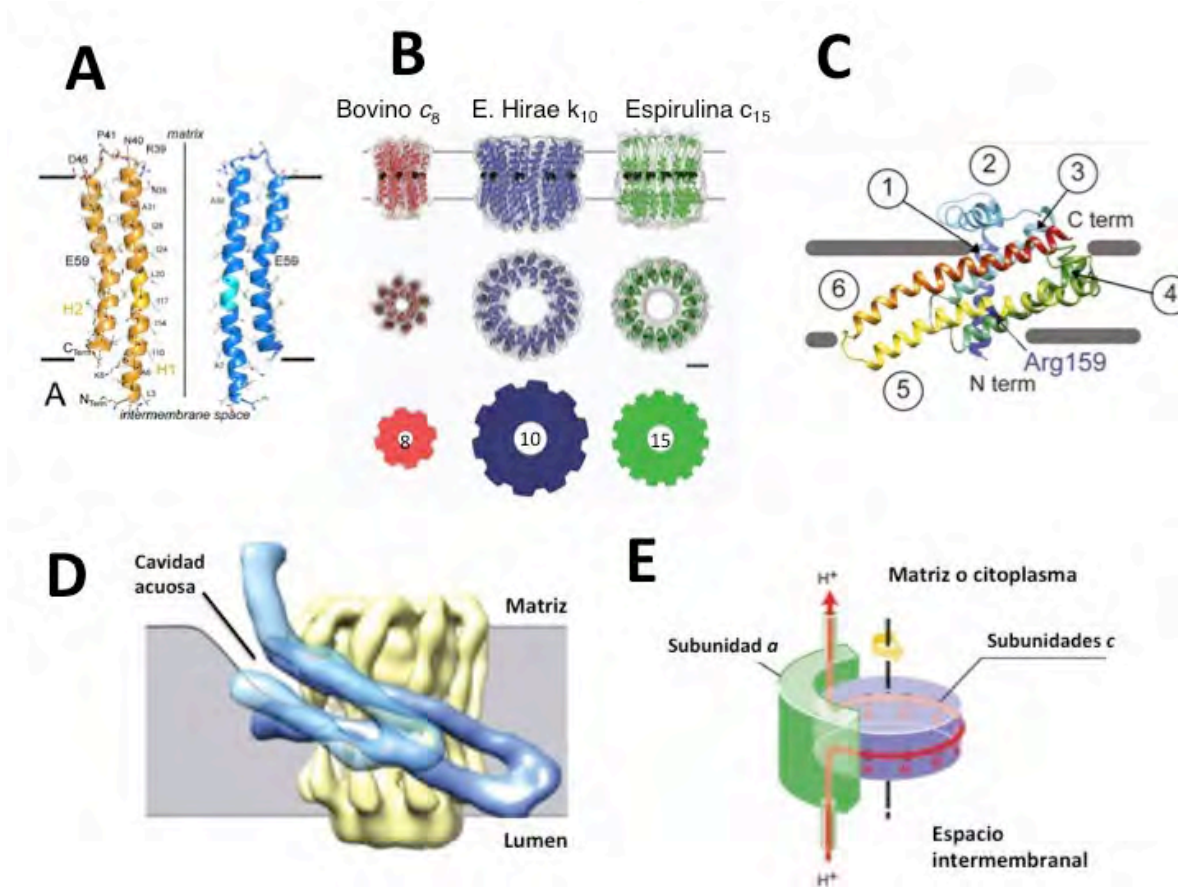
disocie en el hemicanal del citoplasma.<sup>(53, 61, 63, 71)</sup>



**Figura 2.** Estructura y funcionamiento de la ATP sintasa. **A)** Componentes funcionales de la ATP sintasa. El paso de protones ( $H^+$ ) a través del anillo de subunidades c, de un lado a otro de la bicapa lipídica en  $F_0$ , promueve la rotación del anillo de subunidades c y de  $\gamma$  (eje de rotación en  $F_1$ ). La rotación promueve cambios de conformación en los sitios catalíticos, localizados en la interfaz  $\beta$ - $\alpha$ , promoviendo la catálisis de la síntesis o la hidrólisis de ATP, tomada de Boyer P, (1999) **B)** Subunidades asociadas al rotor en gris (anillo de c y las subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$ ) y estator en blanco (subunidades a, b, hexámero  $\alpha_3/\beta_3$  y  $\delta$ ). Las líneas punteadas indican la posición de los hemicanales del rotor. Tomada de Elston *et al*, (1998) **C)** ATP sintasa de mitocondria se ha observado que puede formar dímeros con la participación de subunidades accesorias. En colores se señalan las subunidades que conforman cada monómero, en azul claro se señalan aquéllas que interactúan en la membrana para formar el dímero. Tomada de Bernardi *et al*, (2015).

El sector  $F_1$  (Figura 4) se encuentra compuesto por tres subunidades catalíticas  $\beta$ , tres no catalíticas  $\alpha$ , la subunidad rotatoria  $\gamma$ , la subunidad inhibitoria y de anclaje  $\epsilon$ , y la subunidad  $\delta$ , que sirve de anclaje entre el sector  $F_1$  y el brazo lateral del sector  $F_0$ . Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  forman una esfera hexamérica de subunidades catalíticas y no catalíticas alternadas. En el centro del hexámero se encuentra la subunidad  $\gamma$  que funciona como rotor, y  $\epsilon$  en la parte exterior interactuando con el pie de  $\gamma$  (Figura 4). Las subunidades catalíticas y no catalíticas son homólogas en secuencia y presentan un plegamiento similar con tres dominios, el amino terminal o barril  $\beta$  de seis hebras, el dominio central o de unión formado por 9 hebras  $\beta$  alternadas con 9 hélices  $\alpha$ , y el dominio C-terminal formado por un racimo de 6 ó 7 hélices  $\alpha$ .<sup>(1)</sup> El dominio de unión a nucleótido presenta características estructurales similares a otras proteínas que llevan a

cabo la unión e hidrólisis de ATP. Dentro de éstas se encuentra el asa de unión de fosfatos o motivo conservado Walker A -GXXXXGKT. También está presente el motivo Walker B, con una secuencia consenso de 4 residuos hidrofóbicos seguidos por un aspartato, localizados al final de una hebra  $\beta$ , este último necesario para unir el metal del complejo  $Mg^{2+}$ -nucleótido.<sup>(67, 160)</sup>

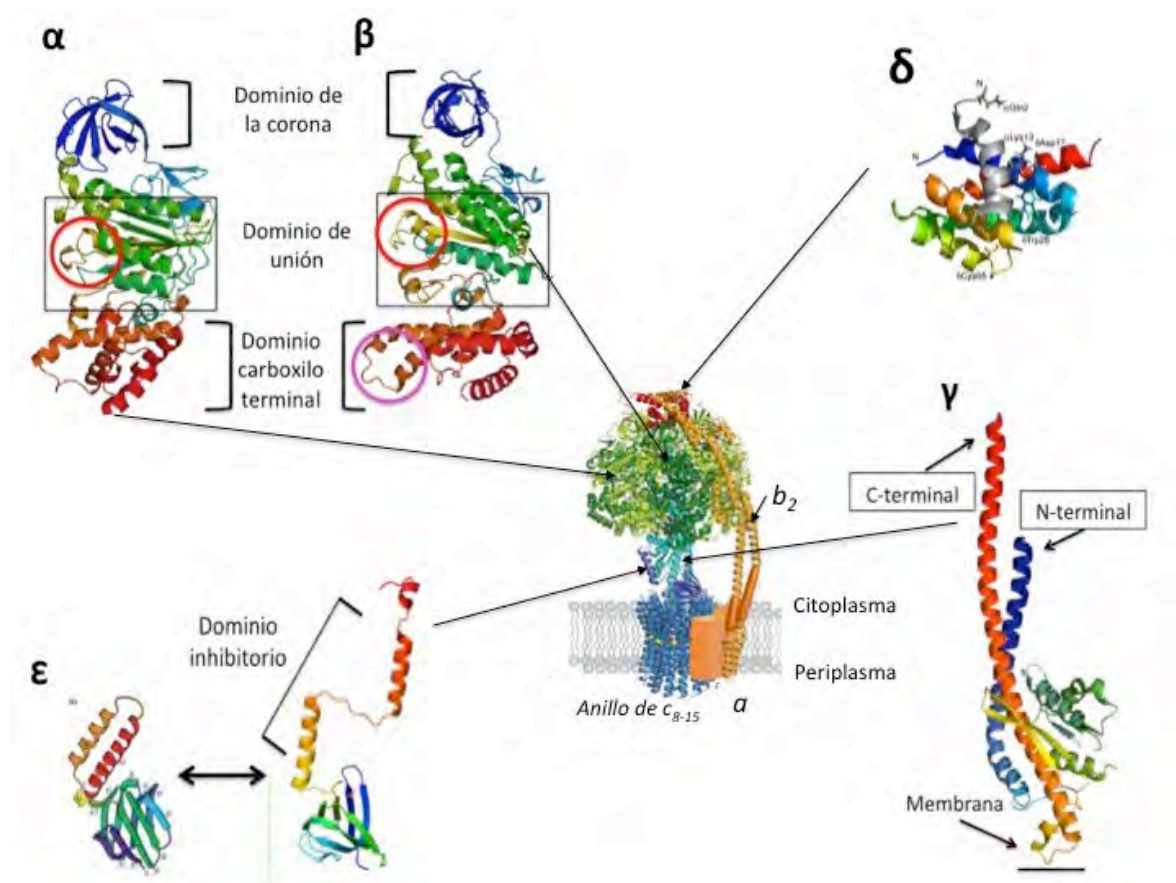


**Figura 3.** Sector  $F_0$  de la ATP sintasa. **A)** Estructura de dos subunidades  $c$  adyacentes, conformada por dos hélices unidas por un asa. En azul claro se resalta un punto de curvatura de una de las hélices, se señala el residuo aspártico responsable de unir al protón. Tomada de Dautant *et al*, (2010). **B)** Esquema del anillo de subunidades  $c$  obtenido mediante criomicroscopía electrónica de los anillos de distintas especies. Vista lateral (arriba), superior (en medio) y representación de engranes (abajo), el número señala las subunidades  $c$  que componen cada anillo. Tomada de Stewart *et al*, (2013). **C)** Esquema en listones de la subunidad  $a$ , conformada por 6 hélices, se señala el residuo de arginina altamente conservado. Tomada de Schep *et al*, (2016). **D)** Modelo obtenido por criomicroscopía del arreglo estructural entre el anillo de subunidades  $c$  (amarillo) y la subunidad  $a$  (azul) para la ATP sintasa de *Politomella*. Tomada de Allegretti *et al*, (2015). **E)** Modelo de generación de torsión en  $F_0$  dirigida por la fuerza protón motriz a través del contacto del anillo de subunidades  $c$  y la subunidad  $a$ . Se observan los sitios de carga y descarga de protones que están en las dos caras de la membrana. La flecha roja señala el trayecto que llevan a cabo los protones unidos a las subunidades  $c$  y la flecha amarilla señala la dirección de rotación. Tomada de Walker *et al*, (2013).

La subunidad  $\gamma$ , considerada el eje de rotación, tiene 3 hélices, la más grande de 90 Å de longitud, la cual entra en el anillo de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  desde el C-terminal hasta el inicio del dominio de unión. La segunda hélice, de alrededor de 60 Å de longitud, formada por el N-terminal, también se incrusta en el interior del anillo de  $F_1$ , pero con



una inclinación que le da asimetría a la subunidad. La última hélice es pequeña, localizándose en el pie de F<sub>1</sub>, interactuando en su mayoría con la subunidad ε. Estas dos últimas hélices forman la parte mas voluminosa de γ.<sup>(1)</sup> La subunidad ε juega un papel regulatorio en la hidrólisis en bacterias. Con 16.3 kDa, presenta una estructura conformada por un dominio con dos hélices α que se abren para llevar a cabo la inhibición de la hidrólisis, y un dominio de sandwich β que se encuentra en el pie que comunica a F<sub>0</sub> y F<sub>1</sub>.<sup>(39, 104)</sup> La subunidad δ, de 21 kDa en bacterias, es homóloga a la subunidad OSCP de mitocondria de bovino. Su estructura completa no ha sido determinada. El dominio N-terminal determinado cristalográficamente muestra 6 hélices α entrelazadas.<sup>(194)</sup> Se localiza en la parte superior del hexámero α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>, formando parte del brazo lateral que previene el movimiento del hexámero y permite que la energía de rotación sea ocupada en su totalidad para producir los cambios conformacionales para realizar la catálisis.



**Figura 4.** Componentes del Sector F<sub>1</sub> bacteriano. Las subunidades α y β muestran una conformación similar dividida en tres dominios que se señalan. En círculo rojo se observa el sitio de unión a nucleótido en ambas subunidades. El círculo rosa señala la zona del DELSEED. La subunidad γ conformada por hélices se señala con sus extremos N- y C-terminal y la zona que hace contacto con la membrana. En ε se observa el cambio conformacional reversible por la unión de ATP, que lleva a la exposición y acción del dominio inhibitorio. Para el dominio N-terminal de la subunidad δ se observan 6 hélices-α entrelazadas. La figura se realizó con Pymol.



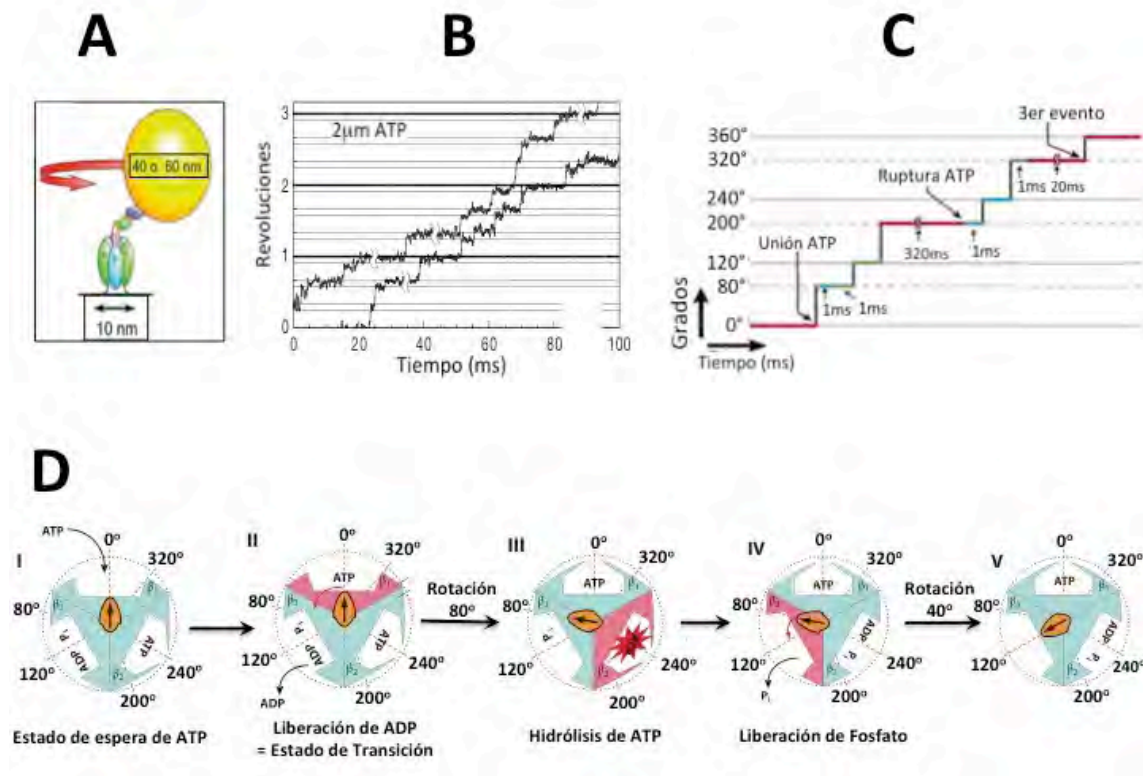
### 1.3. Mecanismo catalítico

Gran variedad de experimentos bioquímicos han provisto de información relevante para dilucidar el mecanismo catalítico de la ATP sintasa. Algunos de los más importantes han sido medidas de intercambio isotópico, estudios genéticos, observaciones de la rotación en experimentos de una sola molécula y la determinación de afinidades de unión para diferentes sustratos en los distintos sitios.

A partir del análisis de mediciones de intercambio de oxígeno-18, y la presencia de un ambiente mayormente hidrofóbico, Boyer et al, (1979) y De Meis et al, (1986) determinaron que la liberación de ATP es el proceso que requiere energía. La unión de ATP al sitio catalítico vacío promueve la liberación de los productos ADP y Pi. Así disminuyendo la concentración de ATP que se pueden unir a este sitio, muestra un incremento en la incorporación de oxígeno del agua al fosfato liberado, sugiriendo la existencia de distintos eventos de incorporación de moléculas de agua marcadas isotópicamente. Esto solo podría ocurrir al existir la síntesis e hidrólisis espontánea en el sitio catalítico. La espontaneidad catalítica dentro del sitio se corroboró con el uso de dimetilsulfóxido, quien al aumentar la hidrofobicidad del medio promueve que la síntesis e hidrólisis se lleven a cabo de forma espontánea en el sitio catalítico.<sup>(50, 87)</sup> En el sentido de la síntesis, la energía aportada por la rotación de la subunidad  $\gamma$  es usada para la liberación del ATP sintetizado y quien se encuentra unido fuertemente. Posteriormente se encontró que  $F_0$ - $F_1$  muestra una gran dependencia de los eventos catalíticos y liberación de productos de un sitio con la unión de sustrato en un segundo sitio. Esta cooperatividad en la catálisis multisitio fue referida como el “mecanismo de cambio de unión”. Distintas conformaciones involucradas en este mecanismo se han observado por cristalografía de rayos X.<sup>(1)</sup>

La rotación de la subunidad  $\gamma$  en  $F_1$  fue descrita por primera vez por Noji *et al*, (1997).<sup>(143)</sup> El complejo recombinante  $\alpha_3\beta_3\gamma$  modificado con colas de histidina en el amino terminal de las subunidades  $\beta$ , fue unido a partículas de Ni-NTA adheridas en una cubierta sobre una placa de vidrio. Por otro lado, un filamento de actina fue agregado a través de estreptavidina a una mutante de cisteína previamente biotinilada en el extremo de  $\gamma$  que se ancla a la membrana. La rotación del filamento se observó por microscopía en un campo de epifluorescencia con la presencia de 2 mM de ATP. Se mostró que la rotación del filamento era dependiente de la hidrólisis de ATP, con una

fuerza de torsión de  $40 \text{ pN nm}^{-1}$ . Posteriormente en otros estudios, el anclado del sector  $F_0$  y la presencia de perlas de oro como sondas ancladas a  $\gamma$  permitió observar el acoplamiento energético llevado a cabo entre la rotación del anillo de subunidades  $c$  (rotor de  $F_0$ ) en la membrana y el rotor  $\gamma$ - $\epsilon$  de  $F_1$  (Figura 5A).<sup>(47, 150, 190)</sup> Este funcionamiento mecánico permite dividir a la ATP sintasa en las partes denominadas “rotor” y “estator” (Figura 2A).



**Figura 5.** Rotación de  $F_1$ . **A)** Esquema de  $F_1$  unida a través de colas de histidina a una placa de vidrio y la subunidad  $\gamma$  unida a una esfera de oro a través de un filamento de actina. Tomada de Nakanishi-Matsui *et al*, (2013). **B)** Experimento de rotación del sector  $F_1$  durante el tiempo. La concentración de  $2 \mu\text{M}$  de ATP permite el aletargamiento de la rotación y permite se puedan observar los subpasos de  $120^\circ$  (líneas grises dobles), en donde permanece durante un tiempo más prolongado. Tomada de Yasuda *et al*, (2001). **C)** Eventos que ocurren en cada subpaso, giro de  $120^\circ$  y ciclo completo de  $360^\circ$ . La unión de ATP provoca la rotación en  $80^\circ$ , posteriormente cuando se han llevado a cabo dos reacciones con tiempos de  $1 \text{ms}$  (línea verde y roja), estas reacciones son la ruptura de ATP y lo que se ha denominado el tercer evento (liberación de fosfato recién formado o de ADP producido  $120^\circ$  atrás). En una mutante con la catálisis disminuida se observa que el paso asociado a la ruptura de ATP dura  $320 \text{ms}$ . Una mutante con la velocidad de liberación de productos afectada hace que el segundo evento dure  $20 \text{ms}$ . Rotación de la subunidad  $\gamma$  y mecanismo catalítico. Tomada de Ariga *et al*, (2007). **D)** Esquema del mecanismo de cambio de unión durante la hidrólisis de ATP. La subunidad rosa es la que se piensa genera el poder de rotación, las subunidades que descansan se señalan en cian. La subunidad  $\gamma$  es señalada en naranja. Los estados I y V corresponden a la espera para que se una ATP en la  $\beta_E$ , la posición angular de  $\gamma$  es fijada en  $0^\circ$ . (I-II) Espera de ATP: ATP es unido en la subunidad  $\beta_1$  vacía. (II-III) La unión de ATP inicia la rotación de  $\gamma$  en  $80^\circ$ , acompañado de la liberación de ADP de la  $\beta_3$ . (III-IV) Espera de hidrólisis de ATP y liberación de  $P_i$ . EL ADP y  $P_i$  se forman en  $\beta_2$  y el fosfato es liberado de  $\beta_3$ , el orden de los eventos aún no está determinado. (IV-V) Rotación de  $40^\circ$ , la rotación subsecuente completa un paso de  $120^\circ$  dejando la  $\beta_3$  vacía y lista para unir ATP. La rotación catalítica de un ATP en particular necesita de  $360^\circ$ , de rotación, con el ATP uniéndose en la  $\beta_1$  en  $0^\circ$ , Su hidrólisis en  $200^\circ$ , la liberación de ADP entre  $240^\circ$ - $320^\circ$  y la de fosfato en  $320^\circ$ . Tomada de von Ballmoos *et al*, (2009).

Posteriormente, con el estudio de la rotación de la subunidad  $\gamma$  en experimentos novedosos de una sola molécula, se ha descrito de manera muy detallada el mecanismo rotatorio. De forma general, se observa que con cada  $120^\circ$  de rotación de  $\gamma$  se hidroliza o sintetiza una molécula de ATP (Figura 5B, 5D). Cada paso de  $120^\circ$  se divide en subpasos de  $80^\circ$  y  $40^\circ$ , que corresponden a diferentes eventos. El primero de mayor amplitud se debe a la unión de ATP, el segundo a la catálisis.<sup>(2, 3, 187, 200)</sup> El tiempo de espera que permanece la subunidad  $\gamma$  en la posición de  $80^\circ$  o de espera catalítica es de alrededor de 2 ms. En este tiempo se llevan a cabo dos reacciones de 1 ms, la primera es la hidrólisis de ATP unido  $200^\circ$  atrás, y la segunda reacción es la liberación de Pi. Estos dos eventos conjuntamente provocan la rotación de  $40^\circ$ . Después de un giro de  $120^\circ$ , el tiempo de espera nuevamente se debe a la pausa para unir ATP en el sitio previamente desocupado. Se han determinado valores de energía para el trabajo realizado en cada  $120^\circ$  de 80 a 90 pN nm<sup>-1</sup>.<sup>(2, 20)</sup> Mutantes con defectos en la unión de productos e hidrólisis de ATP tienen un efecto sobre los tiempos de espera catalítica y de liberación de ATP (Figura 5C).

## **1.4. Sitios de unión de nucleótidos en F<sub>1</sub>**

### **1.4.1 Sitios intercambiables y no intercambiables**

Antes de que se resolviera la primera imagen cristalográfica de F<sub>1</sub>, y se conocieran los sitios de unión de nucleótido, ya se sabía de la existencia de 3 sitios catalíticos y 3 no catalíticos. Esto se logró mediante varias técnicas como intercambio de nucleótidos marcados, derivatización química de residuos de cisteína y lisina, diálisis al equilibrio, fluorescencia intrínseca de triptófano en el sitio de unión y resonancia magnética de protón.<sup>(30, 42, 47, 59, 60, 82, 94, 96, 121, 124, 168, 171, 173, 175, 205, 206)</sup> Los primeros estudios sobre los diferentes sitios los clasificaron en intercambiables, que liberan rápidamente los nucleótidos al medio, y no intercambiables, con velocidades de liberación lentas. Es decir, se clasificaron por su capacidad de retención de los nucleótidos durante diversos lapsos de tiempo, desde segundos en los primeros hasta horas en los segundos.<sup>(44, 105)</sup> Posteriormente, se identificó que los sitios no intercambiables eran los no catalíticos, y los intercambiables eran los catalíticos. Éstos presentaban efectos distintos en presencia

de varios inhibidores.<sup>(6, 8, 44, 80)</sup> Para los sitios no catalíticos se ha encontrado que el grado de ocupación de nucleótidos depende del organismo de origen de la ATPasas. Para la enzima de *E. coli* (EF<sub>1</sub>), Weber *et al*, (1995) observaron una ocupación de 2.8 y 2.6 de los 3 sitios no catalíticos con ATP y ADP, respectivamente. También se observó que una molécula de GTP que no intercambia con ATP.<sup>(172)</sup> En cloroplasto, un sitio no catalítico de CF<sub>1</sub> se encuentra con ADP fuertemente unido y los otros dos pueden unir ATP o ADP,<sup>(134, 135)</sup> siendo la disociación de ADP más rápida que la de ATP. También se ha observado que tienen la capacidad de unir nucleótidos de guanosina con afinidad similar a los de adenina.

Experimentos de derivatización en la enzima mitocondrial muestran que se puede hacer una distinción entre los sitios catalíticos y no catalíticos, ayudando a determinar que ambos tipos de sitios se encuentran en las zonas de contacto entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Estudios con 8-azidoATP y 8-azidoADP han indicado que dos sitios catalíticos y dos sitios no catalíticos son marcados. En los sitios catalíticos el residuo  $\beta$ Y<sup>345</sup> es marcado, este residuo también es modificado con otros compuestos como el FSBA. En este tipo de sitios también se ha modificado la  $\beta$ Y<sup>311</sup> con 8-nitreno-ATP y Nbf-Cl. En los sitios no catalíticos la  $\beta$ Y<sup>368</sup> es derivatizada con 8-azidoATP y 8-azidoADP, estos compuestos también modifican los residuos  $\beta$ G<sup>72</sup> y  $\beta$ D<sup>83</sup>, en el mismo sitio. Además con el uso de [<sup>3</sup>H]oxADP se ha observado su unión covalente a la subunidad  $\alpha$  de este tipo de sitios, sin identificarse el o los residuos involucrado.<sup>(59, 108)</sup> Las observaciones obtenidas por la derivatización de residuos fue corroborada con la primera estructura cristalográfica, en donde se puede observar la posición de los sitios catalíticos en las zonas de contacto  $\alpha$ - $\beta$ , con la mayoría de los residuos que participan directamente en la catálisis pertenecientes a la subunidad  $\beta$  y los sitios no catalíticos en una zona de interacción  $\alpha$ - $\beta$  diferente, con la mayoría de los residuos que contribuyen a la unión pertenecientes a la subunidad  $\alpha$ .<sup>(5, 59, 73, 94)</sup>

Una de las características importantes que diferencian los sitios catalíticos y no catalíticos es la especificidad que existe por los nucleótidos entre estos sitios. El sitio catalítico tiene diversas afinidades por diferentes bases nitrogenadas, uniendo nucleótidos de inosina, guanina y adenosina, en forma difosfatada y trifosfatada. El sitio no catalítico une preferentemente ATP y GTP, pero no nucleótidos difosfatados con una base nitrogenada distinta a la adenina.<sup>(133)</sup> Esta propiedad se ha explicado a través de un reconocimiento por módulos del ligando. En primer lugar, reconoce el motivo de

pirofosfato del ATP, dirigiendo un cambio conformacional para poder unir los módulos de ribosa y adenina/guanina con mayor especificidad.

### 1.4.2 Interacción cooperativa entre los sitios de unión

Conjuntando estas y otras observaciones recabadas durante varias décadas al investigar la catálisis realizada por la ATP sintasa, Boyer propone a finales de la década de los 70 el concepto de cooperatividad catalítica para la síntesis e hidrólisis del ATP. Este modelo considera un mecanismo alternante de cambio de unión, en donde la ocupación de los tres sitios catalíticos actúan de forma cooperativa para alcanzar la velocidad de catálisis máxima en la ATP sintasa.<sup>(29)</sup>

La cooperatividad entre sitios fue observada en experimentos de catálisis con la  $F_1$  ATPasa de mitocondria de corazón de bovino, *E. coli*, *Bacillus PS3* y cloroplasto, en presencia de distintas concentraciones de nucleótidos. En condiciones donde la concentración de ATP es muy baja y solo se permite la unión a uno de los sitio catalíticos en  $F_1$ , la disociación de los productos ADP y  $P_i$  es muy lenta, denominándose este modo de recambio catálisis unisitio. De otra manera, cuando la concentración de ATP se incrementa hasta permitir la unión en dos o tres sitios se acelera la velocidad de disociación por arriba de  $10^5$  veces la velocidad máxima de la reacción.<sup>(44)</sup> En este modo acelerado denominado catálisis multisitio (bisitio o trisito dependiendo de los sitios catalíticos presumiblemente ocupados) se asume una interacción cooperativa entre sitios que resulta en la aceleración de la velocidad de recambio de  $0.04s^{-1}$  a  $>500s^{-1}$ .<sup>(33)</sup> Además del llenado de las interfaces catalíticas, la cooperatividad observada en *Bacillus PS3* y mitocondria depende del llenado de las interfaces no catalíticas. En la hidrólisis realizada por  $MF_1$  se ha mostrado que la aceleración con la presencia de 30-2000  $\mu M$  de ATP presenta una  $K_m$  de 440  $\mu M$ , similar a la  $K_d$  aparente de 430  $\mu M$  para la unión de ATP a los sitios no catalíticos. La unión previa de ATP a estos sitios no catalíticos o su modificación con FSBA eliminan la fase lag observada en gráficos de Lineweaver-Burk con concentraciones de ATP menores a  $<120 \mu M$ , incapaces de alcanzar la velocidad máxima en estado estacionario.<sup>(56, 60, 127, 140)</sup> En la enzima de *E. coli*, de forma contraria el llenado de los sitios no catalíticos parece no afectar el fenómeno de cooperatividad observado para la hidrólisis. <sup>(118)</sup>

Un fenómeno importante en la hidrólisis es el papel del ADP como inhibidor de los sitios catalíticos. En mitocondria, a través de experimentos del entrecruzamiento de

análogos hidrolizables de ATP, se ha comprobado esta inhibición, que se debe posiblemente a que el ADP permanece unido al sitio de intercambio con ATP.<sup>(27, 130, 134, 136, 201)</sup> La azida y fluoroaluminato son inhibidores que favorecen selectivamente la conformación de  $F_1$  con MgADP-inhibitorio. Con experimentos de mutagénesis en *Bacillus PS3* se determinó que la T $\beta$ T<sup>165</sup> mutada por serina genera una enzima que no permanece atrapada en el estado inhibitorio, por lo que este residuo está involucrado en la inhibición por ADP.<sup>(95)</sup> En mitocondria también se ha observado que el residuo homólogo tiene participación en la interacción con Mg(II) y la inhibición,<sup>(27)</sup> a través de la liberación del fosfato, producto que necesita permanecer unido para no presentar inhibición. En *Bacillus PS3*, cloroplasto y mitocondria, varios estudios experimentales revelaron que la ocupación de sitios no catalíticos puede participar en la liberación del estado inactivo, estimulando la actividad.<sup>(56, 126)</sup> La unión de pirofosfato a los mismos sitios no catalíticos tiene un efecto similar.<sup>(101, 105, 140, 201)</sup> En cambio, se ha reportado que posiblemente la ocupación de sitios no catalíticos no tiene un efecto regulatorio en la catálisis que realiza la  $F_1$  de *E. coli* como lo sugieren datos de catálisis unisitario.<sup>(172)</sup>

En el caso de la síntesis, para los sectores  $F_0F_1$  presentes en partículas submitocondriales o membranas lipídicas, se ha mostrado que la unión de ADP y  $P_i$  es importante como control de la rotación. Evidencias muestran que la translocación protón motriz no ocurre si el ADP y  $P_i$  no están listos para formar el ATP. Esto es apoyado por lo observado en la fotofosforilación limitada por baja concentración de ADP, en donde el ADP,  $P_i$  y ATP fuertemente unidos se interconvierten cerca de 50 veces antes de que el ATP sea liberado. Adicionalmente un control fuerte se ha observado en la reconstitución de la ATP sintasa en presencia de una fuerza protón-motriz, en esta no se observa movimiento de la subunidad  $\beta$  marcada, hasta que el ADP y  $P_i$  son agregados.<sup>(14, 29)</sup> También se ha observado que la afinidad por ADP cambia dependiendo del potencial transmembranal. En  $F_1$  de cloroplasto, se observa una  $K_{mADP} = 6-10 \mu M$  con un potencial bajo en condiciones de oscuridad y otra  $K_{mADP} = 50-100 \mu M$  con un potencial formado en condiciones de iluminación. Estas constantes están asociadas a velocidades máximas de 500 y  $> 1800 \text{ nmol de ATP min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ , respectivamente. En *Bacillus PS3* la síntesis es bifásica, una fase lenta inicial que se acelera a la velocidad final en estado estacionario. En experimentos cinéticos se mostró que la presencia de ATP en el medio hace desaparecer la fase lenta, por lo que se ha propuesto que el llenado de los sitios con este nucleótido modula la síntesis hacia la velocidad máxima.<sup>(162)</sup> Así, en esta enzima termofílica, una concentración mayor a  $10 \mu M$  de ATP permite la aceleración de la

velocidad, con cambios en la  $V_{\max}$  de  $124 \text{ nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  a  $302 \text{ nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ . Aunque no es clara la participación de los sitios no catalíticos y catalíticos, se ha propuesto que este efecto de aceleración se debe a la unión en los sitios no catalíticos.

Además de la cooperatividad positiva que se presenta en la actividad sintética, en la hidrólisis las afinidades con las que se unen los nucleótidos va disminuyendo de forma subsecuente, mostrando una cooperatividad de unión negativa. Inicialmente esto se observó en la actividad catalítica, que presentaba distintos valores de  $K_m$ . El primer sitio que une un nucleótido es una subunidad catalítica. Metodológicamente fue difícil obtener la afinidad de este sitio. En las concentraciones de ATP más pequeñas usadas en experimentos de actividad catalítica ya se encuentra ocupado. Fue con el uso de determinaciones radiactivas, mutantes fluorescentes y ultracentrifugación que se dio luz al conocimiento de la afinidad de los diferentes sitios de unión. En particular las determinaciones de saturación de los sitios en mutantes fluorescentes de *E. coli* y *Bacillus PS3* termofílico, que funciona como sensor de la ocupación de los sitios <sup>(104, 188)</sup> ha permitido determinar la afinidad por nucleótidos. Weber *et al*, (2004) <sup>192</sup>, Löbau *et al*, (1997, 1998) <sup>117, 118</sup> y Bulygin *et al*, (2007) <sup>34</sup> estudiaron una mutante fluorescente en la subunidad  $\beta$  ( $\beta Y^{331}W$ ) dentro de los complejos  $F_1$  ( $EF_1$ ) y  $F_0-F_1$  ( $EF_0F_1$ ) de *E. coli*, determinando constantes de unión para nucleótidos con y sin magnesio. Los datos de fluorescencia fueron ajustados a un modelo de sitios independientes para la unión de MgATP generando tres constantes de unión para los sitios catalíticos con valores de  $K_{d1} < 50 \text{ nM}$ ,  $K_{d2} = 1.1 \text{ }\mu\text{M}$ ,  $K_{d3} = 30 \text{ }\mu\text{M}$ . Para la unión de MgADP a  $EF_0F_1$  los valores se calcularon con un modelo de dos sitios independientes con valores de  $K_{d1} = 0.18 \text{ }\mu\text{M}$  y  $K_{d2} = 13 \text{ }\mu\text{M}$ . Para su comparación, los valores para sectores  $F_1$  aislados de diferentes fuentes se pueden observar en la Tabla 1. De manera similar con la mutante  $\alpha R^{365}W$  en el sector  $EF_1$ , se estudió la unión en las interfaces no catalíticas. Los datos se ajustaron satisfactoriamente a un modelo de un solo tipo de sitio con estequiometría de 3, con una sola  $K_d$  de muy alta afinidad para la unión de MgATP (Tabla 1).<sup>(113)</sup> Estos resultados llevaron a la propuesta de que en *E. coli*, los 3 sitios no catalíticos tienen la misma afinidad. En la enzima de *Bacillus PS3* solo se han realizado estudios con la mutante  $\beta Y^{345}W$ . Los datos generados también se ajustaron a un modelo de tres sitios independientes. Con estos estudios el magnesio ha sido considerado el factor que inducía distintas afinidades en la enzima. Estudios posteriores mostraron que el ion sulfato ( $SO_4^{2-}$ ), comúnmente usado en la preparación de soluciones de  $F_1$  como  $MgSO_4$ , se une de manera débil y competitiva en una zona similar a la de los fosfatos de los

nucleótidos.<sup>(34)</sup> Los experimentos muestran que en ausencia de sulfato la dependencia del apagamiento de la fluorescencia con respecto a la concentración de nucleótidos ADP, ATP y MgADP en la mutante E $\beta$ Y<sup>331</sup>W, es bifásico. Esto revela dos clases de sitios de unión, donde cada uno contribuye equitativamente en el apagamiento total. Estos resultados contrarios a los reportes previos muestran que el Mg(II) no es requerido para expresar sitios de diferente afinidad en los tres sitios catalíticos. Esta asimetría de unión sin la presencia de magnesio también se observa para la mutante fluorescente  $\alpha_3\beta$ (Y<sup>341</sup>W) $_3\gamma$  de *Bacillus PS3*(Tabla 1).<sup>(15, 56)</sup>

**Tabla 1.** Constantes de disociación ( $K_d$ ,  $\mu$ M) para los sitios catalíticos y no catalíticos (NC) del sector F<sub>1</sub> en *E.coli* (EF<sub>1</sub>), *Bacillus PS3* (TF<sub>1</sub>) y mitocondria de corazón de bovino (MF<sub>1</sub>). <sup>a,b</sup>

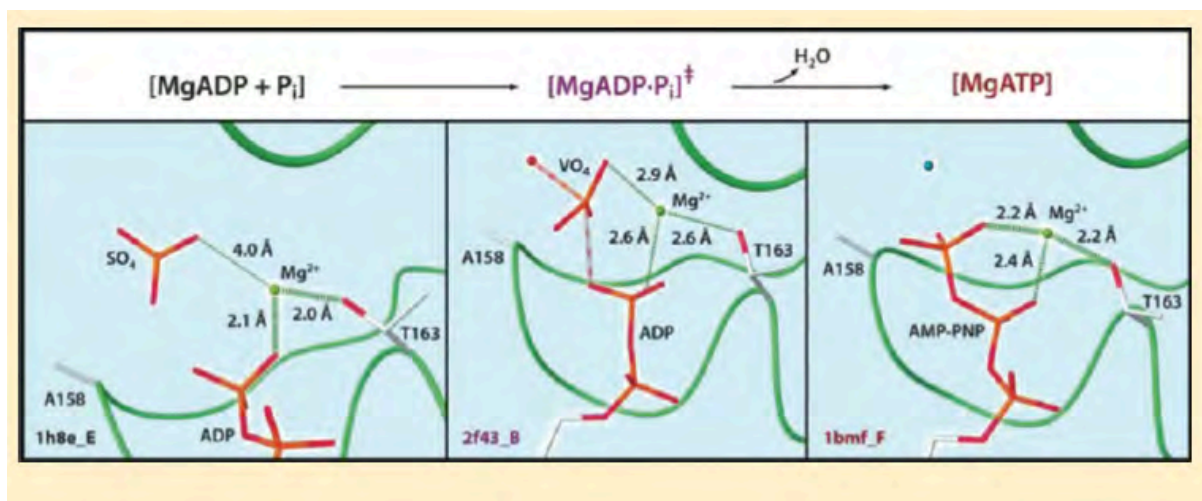
	EF <sub>1</sub>				TF <sub>1</sub>			MF <sub>1</sub>			
	Catalíticos			NC	Catalíticos			Catalíticos		NC	
	K <sub>d1</sub>	K <sub>d2</sub>	K <sub>d3</sub>	K <sub>d1</sub>	K <sub>d1</sub>	K <sub>d2</sub>	K <sub>d3</sub>	K <sub>d1</sub>	K <sub>d2</sub>	K <sub>d1</sub>	K <sub>d2</sub>
MgATP	<0.02	0.8	26	55	< 0.05	0.25	24	0.015	78	25	125
ATP	53(0.19)	53(200)	53	3500	0.01	8	74				
MgADP	0.4(0.01)	1.8(8.1)	35	105	< 0.05	0.21	20				
ADP	83(0.04)	83(37)	83	1300	0.01	1.6	27				
MgAMP -PNP	0.11	36	36								
PPi	>1,000	>5,000	>5,000	20							

<sup>a</sup> Tabla compilada a partir de datos publicados para: EF<sub>1</sub> Webber *et al*, (1995B)<sup>191</sup>, Webber *et al*, (2004)<sup>192</sup>; TF<sub>1</sub>, Bandyopadhyay *et al*, (2002)<sup>15</sup>, Dou *et al*, (1998)<sup>56</sup> y MF<sub>1</sub>, Murataliev *et al*, (1992)<sup>140</sup>. Los valores en paréntesis corresponden a determinaciones independientes de Bulygin *et al*, (2007)<sup>34</sup> obtenidos en ausencia de iones de sulfato en el medio. <sup>b</sup> K<sub>d1</sub>, K<sub>d2</sub>, K<sub>d3</sub> corresponden a las afinidades alta, media y baja, respectivamente, para cada tipo de sitio en F<sub>1</sub>.



### 1.4.3 El Mg(II) en la unión de nucleótidos

Además de las diferencias de unión entre los nucleótidos difosfato y trifosfato, la presencia de magnesio es un factor importante en el reconocimiento y la cinética, ya que sólo en su presencia se genera el intermediario penta-coordinado necesario para llevar a cabo las reacciones catalíticas (Figura 6). En donde la orientación del ATP y su coordinación con  $Mg^{2+}$  son aspectos importantes para la operación del mecanismo catalítico. En la hidrólisis el confinamiento deshidrata al ATP en la cavidad catalítica, promoviendo el ataque electrofílico del fosfato y por una molécula de agua que actúa como base, seguido por la ruptura del motivo trifosfato. El estado más estable es cuando el  $Mg^{2+}$  coordina dos o tres oxígenos de este motivo, con energías de entre -0.65 a -0.83 kcal/mol. La capa de hidratación de  $Mg^{2+}$  formada por moléculas de agua en solución cambia dentro del sitio de unión, siendo reemplazados algunos enlaces por contactos directos con la proteína y los fosfatos del nucleótido. Se ha identificado un residuo específico de unión al  $Mg^{2+}$ . Esta es la treonina 165 de la subunidad  $\beta$  de *Bacillus PS3* ( $T\beta T^{165}$ ) o en la posición 163 para bovino ( $M\beta T^{163}$ ) y 156 en *E. coli* ( $E\beta T^{156}$ ), que forma parte del motivo conservado Walker A.<sup>(95, 109)</sup> Las moléculas de agua que aún permanecen dentro del sitio catalítico, se acomodan de tal forma que sus dipolos son orientados hacia fosfatos,  $Mg^{2+}$  y los átomos de residuos de aminoácidos, creando una capa de hidratación que facilita la catálisis.<sup>(24)</sup> La presencia o ausencia de magnesio también genera cambios en la unión de nucleótidos a los distintos sitios de  $F_1$  de diferentes fuentes. En el sector  $F_1$ -ATPasa de *Bacillus PS3* ( $TF_1$ ), se ha identificado que la presencia del metal promueve la existencia de tres sitios que se saturan con una  $K_d = 10 \mu M$  y se intercambia rápidamente con los nucleótidos del medio a través de una filtración en gel. En ausencia del metal se observa la presencia de un segundo tipo de sitio que une ADP con una  $K_d 100 \mu M$  y lo intercambia lentamente. Por dicroísmo circular se han relacionado el primer tipo de sitio a la subunidad  $\alpha$  y el sitio estable a la filtración en gel a la subunidad  $\beta$ , este sitio es capaz de formar ATP en presencia de  $P_i$  y 50% de dimetilsulfóxido.<sup>(54)</sup> En ausencia de magnesio también desaparece el sitio intercambiable de alta afinidad y solo el sitio no intercambiable puede unir ADP con una afinidad mayor a la presentada en presencia de magnesio. Para el sector  $F_0$ - $F_1$ , la ausencia del  $Mg^{2+}$  muestra una sola  $K_d$  para ATP de  $105 \mu M$ , similar a la del complejo  $F_1$  de  $71 \mu M$ .<sup>(201)</sup> En  $F_0$ - $F_1$  de mitocondria ( $MF_0$ - $F_1$ ) se ha observado la existencia de un sitio de  $Mg^{2+}$  con afinidad de  $1.1 \times 10^{-4} M$ .<sup>(32)</sup>



**Figura 6.** Cambios en la interacción del magnesio con ADP, Pi, ATP y la treonina 163 ( $M\beta T^{163}$ ), en mitocondria, durante el mecanismo de síntesis de ATP. Distancias de los enlaces entre los distintos sustratos y el  $Mg^{2+}$  (esfera verde) para diferentes estados del mecanismo representados en diferentes estructuras cristalográficas (1h8e\_E, 2f43\_B, 1bmf\_F). En listón se observa el asa polar quien en un extremo presenta a la  $M\beta T^{163}$ , único residuo que interacciona directamente con el metal. En palitos se observan los fosfatos del ADP y ATP (AMP-PNP). EL  $SO_4$  representa al fosfato que se ha de unir y el  $VO_4$  al fosfato en el estado de transición formado por el metal., antes de formar el ATP.

#### 1.4.4 Eventos de unión y su efecto cinético

Aun con las discrepancias existentes entre los datos de diferentes fuentes, algunos valores de las constantes de unión para los sitios catalíticos y no catalíticos se han relacionado con las características cinética observadas durante la hidrólisis. En concentraciones subestequiométricas ( $10/1$ ;  $F_1/ATP$ ), la ocupación del primer sitio es el sitio catalítico de alta afinidad, presentando un recambio catalítico unisitio ( $V_{max} < 10^{-3} s^{-1}$ ) con constantes de disociación en el intervalo de  $= 0.5nM$  a  $1pM$  ( $K_d, (EF_1) \approx 0.2 nM$ ,  $K_d, (MF_1) \approx 1 pM$ ). En la enzima de mitocondria  $MF_1$ , la reacción en estas concentraciones de ATP muestra un mecanismo de Michaelis-Menten simple, con una sola  $K_m$  alrededor de  $10^{-4} M$ . El segundo evento de unión aún no está del todo claro. Algunos datos muestran que se da en un sitio catalítico ( $K_d = 1-30 \mu M$ ) para ATP.<sup>(148)</sup> Pero también en esas concentraciones se presenta la unión a los sitios no catalíticos. En  $TF_1$  el efecto de este evento de unión se ha asociado a la liberación de los productos (ADP inhibitorio) del primer evento que catalizó la ruptura del ATP. En Mitocondria se ha encontrado que el segundo evento de unión a un sitio no catalítico ( $K_m = 25 \mu M$ ) promueve la activación de la enzima inhibida.<sup>(42, 141)</sup> El efecto inhibitorio de la ocupación del sitio catalítico por ADP desaparece al aumentar la concentración de  $MgATP$ , ayudando la ocupación de los siguientes sitios a la liberación de este.

El llenado de los siguientes sitios tampoco es completamente conocido. Actualmente no se sabe si la unión en las subunidades  $\alpha$  es simultánea en los 3 sitios de este tipo o si existen eventos de unión en concentraciones mayores a 30  $\mu\text{M}$ . Usando mutantes con subunidades  $\alpha$  incapaces de unir nucleótido en *Bacillus PS3*, el llenado de un sitio no catalítico con una  $K_m$  de 100-300  $\mu\text{M}$  ha mostrado un efecto regulatorio que activa el estado inhibido por MgADP, desplazamiento del equilibrio hacia una menor formación del complejo inactivo  $F_1^*\text{-MgADP}$ .<sup>(126, 148)</sup> La promoción de la liberación del ADP inhibitorio por los sitios no catalíticos también se ha observado en la  $\text{CF}_1\text{-ATPasa}$ .<sup>(131)</sup> Estos resultados sugieren que la cooperatividad negativa observada experimentalmente el intervalo de  $\mu\text{M}$  a  $\text{mM}$  de ATP tiene una contribución de los sitios no catalíticos.<sup>(126)</sup> Como ya se mencionó, en *E. coli* no se observa este efecto, por lo que quizás el llenado de los tres sitios no catalíticos en esta enzima se lleve a cabo en un solo evento de unión y en donde el llenado del tercer sitio catalítico es el que provoca el aumento en la velocidad. Para la unión en los siguientes sitios catalíticos de  $\text{MF}_1$  y  $\text{TF}_1$  se ha reportado un intervalo amplio de valores de  $K_d$  (100 a 300  $\mu\text{M}$ ). Cíneticamente, el llenado de la segunda subunidad catalítica se ha asociado al aumento en la actividad. En mitocondria la primera  $K_m=130\mu\text{M}$  se asocia a la unión en el segundo sitio catalítico, evento que se cree podría alcanzar la máxima velocidad en el modelo cinético de tipo bisitio. En este intervalo también se encuentra la segunda  $K_m$  de 250  $\mu\text{M}$ , observada en la hidrólisis. Esta  $K_m$  se ha asociado al llenado del tercer sitio catalítico (cinética trisitio).<sup>(44, 144)</sup>

Los efectos de la ocupación de sitios no catalíticos sobre la síntesis han sido menos estudiados. En cloroplasto y bacterias se observa un comportamiento similar. El MgADP se une con una  $K_m < \mu\text{M}$  y una velocidad cercana a la máxima se alcanza con la saturación de segundo sitio catalítico con una  $K_m$  de entre 30-50 $\mu\text{M}$ . Los pocos e indirectos datos que existen sugieren que posiblemente los sitios no catalíticos no contribuyen significativamente en la velocidad de síntesis.<sup>(14, 140, 165)</sup>

### 1.4.5 Cambios conformacionales entre subunidades

El objetivo de estudiar los cambios conformacionales ha sido entender las interacciones que generan el acoplamiento de energía entre las distintas subunidades durante el mecanismo catalítico. En  $F_1$ , las interacciones entre  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  conducen a cambios conformacionales dentro de la interfaz catalítica. En la síntesis ayudan a poner en posición el ADP y Pi para formar ATP y disminuyen la afinidad de la enzima por el ATP permitiendo su liberación.<sup>(67)</sup> En la hidrólisis permiten posicionar correctamente el ATP para romperlo y permiten la liberación de productos.

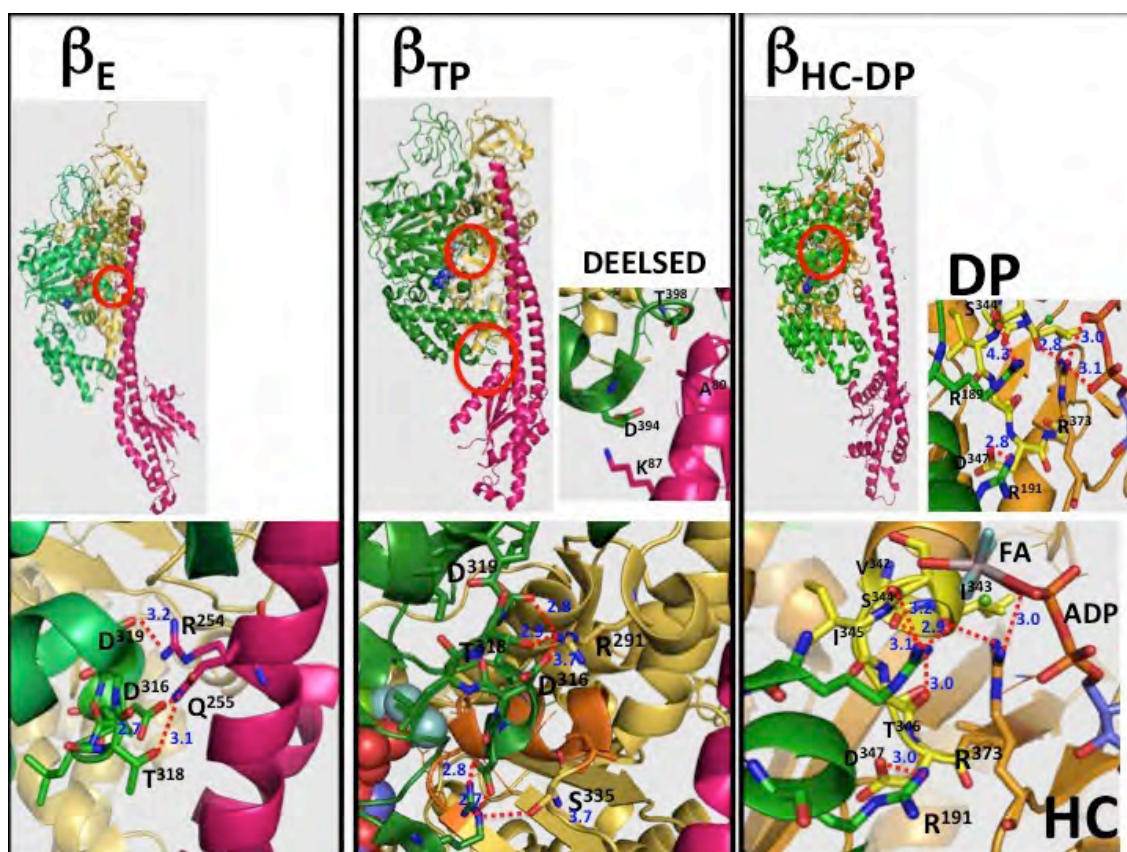
La primera estructura cristalográfica para el sector  $F_1$  de la ATP sintasa de corazón de bovino, fue obtenida por Abrahams *et al*, (1994) <sup>(1)</sup> a una resolución de 2.8 Å. Se observó que las tres subunidades  $\beta$  presentan tres conformaciones diferentes ( $\beta_{TP}$ ,  $\beta_{DP}$ ,  $\beta_E$ ) con ocupación desigual de nucleótidos:  $\beta_{TP}$ , unida a AMPPNP, un análogo no hidrolizable del ATP,  $\beta_{DP}$ , unida a ADP, y  $\beta_E$ , libre de nucleótido. En la conformación abierta de la subunidad catalítica ( $\beta_E$ ), el dominio helicoidal C-terminal gira lejos del dominio de unión, generando una cavidad entre los dos dominios. En las conformaciones cerradas ( $\beta_{TP}$ ,  $\beta_{DP}$ ,  $\beta_{HC}$ ), el sitio de unión está cerrado y el nucleótido se encuentra atrapado adentro. La diferencia conformacional es significativa entre los estados cerrado y abierto, lo que implica que la subunidad  $\beta$  lleva a cabo un cambio conformacional grande. Las conformaciones cerradas no muestran diferencias significativas de manera global, presentando una gran similitud estructural que ha hecho difícil el conocer los pasos del mecanismo molecular que ocurren durante la catálisis.

La asimetría entre sitios ya había sido observada previamente mediante experimentos de entrecruzamiento de las subunidades catalíticas.<sup>(8)</sup> Cuando se utilizan diferentes nucleótidos en presencia de DCCD, Nbf-Cl, cada una de ellas entrecruza de manera diferente con la subunidad  $\epsilon$ . Resultados similares se han observado con mutantes de cisteína de las subunidades  $\alpha$ - $\beta$ ,  $\gamma$ - $\epsilon$  y  $\beta$ - $\epsilon$ .<sup>(52, 80)</sup> Otros cristales indican que la asimetría de los sitios no se debe a su estado de ligación sino a las interacciones de cada sitio con la subunidad  $\gamma$ . En la estructura del hexámero  $\alpha_3\beta_3$  en ausencia de  $\gamma$  de *Bacillus PS3* se observa a las tres subunidades  $\beta$  en conformación abierta e idéntica entre ellas, es decir simétricas. En el caso de la estructura de  $F_1$  de *S. cerevisiae* cristalizada en ausencia de nucleótidos la asimetría de los sitios catalíticos esta determinada por la orientación relativa de la subunidad  $\gamma$ . Estos dos cristales apoyan la idea de que la

asimetría interna de los sitios de  $F_1$  dependen de las interacciones con la subunidad  $\gamma$ .<sup>(100, 175)</sup> Para las subunidades  $\alpha$  esta idea de asimetría no ha sido considerada debido a que cristalográficamente el sitio no catalítico siempre presenta el mismo estado de unión, ocupado por AMPPNP o pirofosfato, con una conformación cerrada. Otras estructuras se han obtenido con distintos sustratos en los sitios catalíticos en complejos  $F_1$  de corazón bovino, hígado de rata y *E. coli*. En estas estructuras se encuentran sustratos como ADP y AMPPNPP, también análogos del estado de transición (ADP- $AlF_4$ , MgADP- $SO_4$ ) o inhibidores como azida, NBD y DCCD; y permiten visualizar estados conformacionales durante distintos pasos del mecanismo catalítico.<sup>(147)</sup>

También a pesar de la dificultad para observar diferencias en las conformaciones cerradas, la existencia gran variedad de estructuras de  $F_1$  ha permitido hacer un análisis detallado de la posición de distintas cadenas laterales, durante distintos pasos del mecanismo. Utilizando los datos cristalográficos, datos bioquímicos y con base en los pasos del mecanismo catalítico, se han logrado asociar las conformaciones a diferentes eventos como son la unión de MgATP a la conformación  $\beta_{TP}$ , la liberación de  $P_i$  con la conformación  $\beta_{DP}$  y posterior a la liberación de los productos ADP y  $P_i$  con la conformación  $\beta_E$ . La conformación  $\beta_{HC}$  representa el estado de transición, es decir, el estado de mayor energía por el cual debe pasar la ruptura del ATP para formar los productos. Particularmente se han determinado interacciones claves para cada conformación dentro de las interfaces catalíticas, constituidas por dímeros  $\alpha\beta$ , y el cambio de éstas en el paso de una conformación a otra (Figura 7).

Para la conformación abierta  $\beta_E$  en *E. coli* (E), se han identificado puentes de hidrógeno entre  $E\gamma R^{268}$  y  $E\gamma Q^{269}$  con el asa de anclaje de  $E\beta^{(301-305)}$ , y que se sugiere previenen la rotación hasta que se una el nucleótido a esta conformación. Estas interacciones son vitales para el funcionamiento de la enzima. Las bacterias con mutaciones en estas interacciones se observan incapaces de sobrevivir a partir de la fosforilación oxidativa, es decir, se desacopla la producción de ATP a partir de la rotación de la subunidad  $\gamma$ .<sup>(25)</sup> En las estructuras cristalográficas de mitocondria también se observaron las interacciones de puentes de hidrógeno entre los residuos de la subunidad catalítica abierta  $M\beta_E D^{316}$ ,  $M\beta_E T^{318}$   $M\beta_E D^{319}$  y los residuos de  $\gamma$   $M\gamma R^{254}$  y  $M\gamma Q^{255}$  del carboxilo terminal. Otra característica observada para la conformación abierta es que no existe la interacción entre las hebras  $\beta_3$  y  $\beta_7$  del dominio de unión, encontrándose a  $30^\circ$  de rotación entre la parte baja de este dominio y el dominio helicoidal, comparado con la posición observada en conformación cerrada  $\beta_{TP}$ .



**Figura 7.** Diferencias conformacionales de los sitios de unión en  $F_1$ , tomadas del pdb: 1H8E. **Conformación  $\beta_E$ .** Se observan los residuos de la subunidad  $\beta$ :  $D^{316}$ ,  $T^{318}$ ,  $D^{319}$  que forman interacción con los residuos  $R^{254}$  y  $Q^{255}$  de la subunidad  $\gamma$ . **Conformación  $\beta_{TP}$ .** El recuadro de la derecha se muestra la sección del DELSEED en verde que ha perdido las interacciones con la subunidad  $\gamma$  presentes en la conformación  $\beta_E$  los residuos involucrados en la interacción. En el recuadro inferior se muestran los cambios asociados a la zona señalada en  $\beta_E$ , en naranja se resalta la secuencia VISITDG. **Conformación  $\beta_{HC-DP}$ .** Muestra los residuos involucrados en la interacción de los dedos de arginina  $M\alpha R^{373}$ ,  $M\beta R^{189}$  y  $M\beta R^{191}$ . Las interacciones se señalan con líneas punteadas rojas y el valor de la distancia en números azules. Figura realizada con Pymol.

En el caso de la conformación cerrada  $\beta_{TP}$  de mitocondria, las interacciones de  $M\beta D^{316}/M\beta T^{318}/M\beta D^{319}$  con  $M\gamma R^{254}$  y  $M\gamma Q^{255}$  se pierden, y los residuos  $M\beta D^{318}/D^{319}/D^{322}$  ahora interactúan con  $M\alpha_{TP} R^{291}/S^{335}$  y  $\beta_{TP} R^{337}$ , formando una red de contactos que continúa hacia los residuos del asa polar  $M\beta(156GGAGVGKTV164)$  que acomoda el nucleótido hacia los residuos  $M\beta_{TP} R^{191}$  y  $M\alpha_{TP} R^{373}$  (dedos de arginina) en el sitio de unión a los fosfatos dentro de la interfaz catalítica  $\beta$ - $\alpha$ . Estos últimos residuos son críticos en la interacción con el estado de transición. Además, existen otras interacciones con la secuencia de  $MF_1$   $^{341}VISITDG^{348}$ , muy conservada dentro de las subunidades  $\alpha$ , y con una participación directa en el posicionamiento correcto de los dedos de arginina, presentes en el sitio de unión. Mutaciones en estos residuos llevan a la pérdida de la fosforilación oxidativa y una actividad de ATP-asa reducida.<sup>(63, 113)</sup> Junto a estas

interacciones también se encuentra un puente salino entre  $M\alpha_{TP}D^{333}$  y  $M\gamma R^{252}$ . En la conformación  $\beta_{TP}$  se localiza una zona de anclaje entre su dominio C-terminal ( $M\beta_{TP}D^{394}$  y  $M\beta_{TP}E^{398}$  del motivo  $^{394}DEELSEED^{400}$  y la hélice corta de la subunidad  $\gamma$  (residuos  $M\gamma K^{87}$ ,  $M\gamma K^{90}$  y la amida de  $M\gamma A^{80}$ ).<sup>(1, 77)</sup> El segmento de la subunidad  $\beta$  funciona como leva, siendo empujada por la parte asimétrica y voluminosa de la subunidad  $\gamma$  a través del impedimento estérico. Este lugar es considerado como uno de los puntos del acoplamiento de energía.

La conformación  $\beta_{HC}$  es un intermediario entre la conformación abierta  $\beta_E$  y las conformaciones cerradas  $\beta_{DP}$  y  $\beta_{TP}$ . Algunos autores han postulado que es una conformación post-hidrólisis, aunque existen controversias.<sup>(119, 129)</sup> En  $\beta_{HC}$  se observa que conforme avanza la catálisis, los puentes de hidrógeno que conectan  $M\beta_{TP}D^{316}$  con  $M\alpha_{TP}S^{335}$ ;  $M\beta_{TP}R^{337}$  con  $M\alpha_{TP}S^{335}$  y  $M\beta_{TP}T^{318}/D^{319}$  con  $M\alpha_{TP}R^{291}$  se rompen conforme se forma el estado de transición. Los residuos  $M\alpha_{DP}R^{373}$  y  $M\beta_{DP}R^{189}$  están unidos al análogo del fosfato y  $M\beta_{DP}R^{191}$  interactúa con la secuencia VISIT en las posiciones  $M\alpha I^{342}$  y  $M\alpha T^{345}$ .

En la conformación  $\beta_{DP}$ , la liberación del Pi provoca el movimiento de los dedos de arginina  $M\beta_{DP}R^{189}$  y  $M\alpha_{DP}R^{373}$ , cambiando las conexiones de puentes de hidrógeno con la secuencia  $^{342}VISITDG^{348}$  como con ADP y Pi. Ahora  $M\beta R^{191}$  forma un puente de hidrógeno con  $E\alpha_{DP}D^{347}$  y el puente salino  $M\beta_{DP}R^{189}-M\alpha_{DP}I^{345}$  se rompe.<sup>(25)</sup>

Las características estructurales de  $F_1$  descritas son consistentes con la catálisis rotatoria que asume que cada sitio catalítico se encuentra siempre en un estado de reacción diferente y que la interconversión entre estados se acompaña de la rotación mecánica de la subunidad  $\gamma$ .<sup>(115)</sup>

#### **1.4.6 Correlación Estructura y Energía (función)**

A pesar de la existencia de gran cantidad de datos bioquímicos y estructurales que apoyan el mecanismo de cambio de unión secuencial propuesto por Boyer y que ha permitido asociar las conformaciones a diferentes eventos, no podemos entender cómo estos eventos se asocian energéticamente para realizar la función catalítica. ¿Cómo el proceso de catálisis se acopla a la rotación? ¿Cómo se origina el proceso de cooperatividad entre subunidades? ¿Cuáles son las barreras energéticas y las fuerzas

que dirigen la eficiente reacción de conversión de energía mecánica a energía química? Esto se debe a que la energética de la enzima es compleja e involucra distintos procesos dentro del mecanismo. En general, en cada parte de  $F_0F_1$  hay diferentes zonas que realizan trabajo y por ende guardan energía. En  $F_0$ , la energía asociada al potencial electroquímico  $\Delta\mu$  dirige la rotación del eje (subunidad  $\gamma$ ). En  $F_1$ , la transducción de energía depende de manera compleja de la interacción  $\gamma$ -hexámero  $\alpha/\beta$ , (Figura 8) las interacciones de las intercaras entre distintas subunidades, la unión de sustratos, la liberación de productos y de la formación del estado de transición. Para poder arrojar luz sobre estas interrogantes, se han desarrollado distintos acercamientos que investigan la relación estructura-función, con el objetivo de explicar la alta eficiencia de conversión de energía en este nanomotor.

Basados en la información estructural, el primer acercamiento fue mapear las mutantes de diferentes residuos en las estructuras, especulando sobre las implicaciones funcionales de su localización.<sup>(78, 95, 114, 161, 174)</sup> También se relacionaron las constantes de afinidad y catalíticas con la suma de la energía de las interacciones entre sustratos y residuos de la subunidad  $\beta$ , en sus diferentes conformaciones. Así, Mao y Weber en 2007 determinaron que el estado de mayor afinidad por ATP en cristalografía es el de la conformación  $\beta_{TP}$ .<sup>(124)</sup> En el 2000, Oster y colaboradores desarrollaron un modelo para explicar la alta eficiencia mecánica de la ATP sintasa, basado en los movimientos de las subunidades de  $F_1$  y las fuerzas mecánicas que dirigen los cambios conformacionales.<sup>(149)</sup> Su análisis mostró que para que exista esa eficiencia son necesarias ciertas propiedades: 1) un acoplamiento mecánico hermético que acople la flexibilidad de la subunidad  $\beta$  con el eje rotacional (subunidad  $\gamma$ ); 2) Estrecha coordinación mecanoquímica entre la rotación de  $\gamma$  y el ciclo hidrolítico con: una fuente de poder que genere un torque casi constante y que tanto la caída de energía libre que acompaña la unión de ATP como la de la liberación del Pi sean usadas para generar el torque. Este modelo fue nombrado mecanismo de cierre de unión. En este mecanismo una parte de la energía proviene de la unión del ATP que se almacena en el movimiento de rotación de  $30^\circ$  de la hebra  $\beta$  que se encuentra entre las hélices B y C de la zona de la bisagra en la subunidad  $\beta$ , actuando como resorte. Otra parte de la energía proviene de la hidrólisis del enlace del fosfato  $\gamma$  que es usada para debilitar la unión fuerte de los productos. Sus resultados muestran que este mecanismo se ajusta a los medidas cinéticas y termodinámicas observadas para el motor  $F_1$ . Sin embargo, los procesos dinámicos no pueden ser estudiados solamente observando la imagen estática de las conformaciones

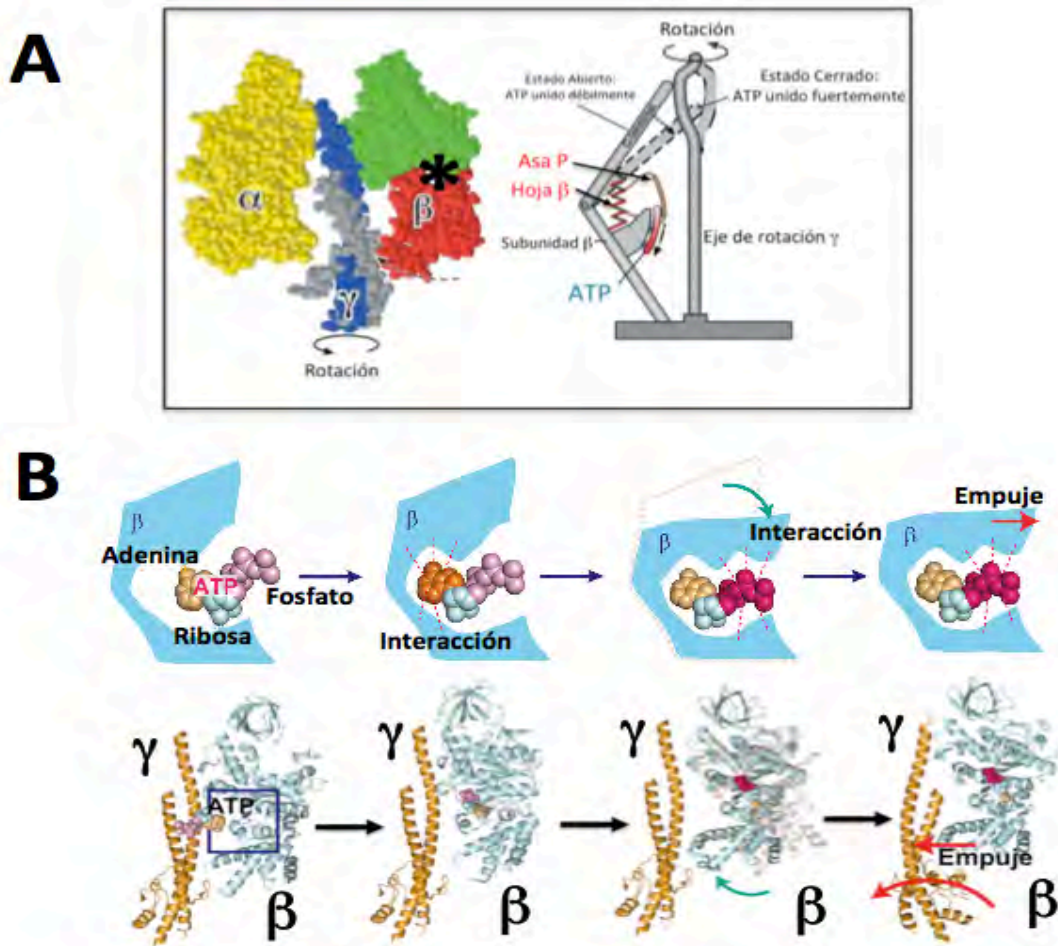


cristalográficas, haciendo difícil identificar a que estado y afinidades corresponde cada sitio y cómo generan el movimiento de rotación.<sup>(55)</sup>

Esta falta de conocimiento sobre el proceso de contactos moleculares y la interacción de las distintas subunidades a lo largo del ciclo catalítico se ha abordado con estudios computacionales de dinámica molecular (DM). Para el modelado de mecanoenzimas se han presentado diferentes acercamientos: A) Dinámica molecular, intenta considerar el movimiento de cada átomo, a veces con moléculas de agua y otras especies químicas. B) Los modelos cinéticos o de estados de Markov representan la transición entre estados químicos con mecánica molecular, con un acercamiento estadístico. C) Modelos Markov-Fokker-Plank, que trabajan entre los detalles atómicos de DM y la fenomenología de modelos cinéticos. Éstos describen los movimientos geométricos a lo largo de una colección pequeña de coordenadas que describen los mayores movimientos de las proteínas.<sup>(196)</sup> y D) Los modelos de grano grueso, que permiten simular la serie de eventos que ocurren en la ATP sintasa durante tiempos largos. En estas simulaciones, pequeños grupos de átomos son tratados de manera colectiva como partículas grandes, reduciendo los grados de libertad.

En las simulaciones para determinar la eficiencia del motor durante la transducción de energía de  $F_0$  a  $F_1$  a través de  $\gamma$ , se ha considerado la fluctuación de movimiento browniano del motor contra el estator; ésta es una característica común de los nanomotores moleculares. Las fluctuaciones dependerán de si la concentración de protones es más grande en alguno de los dos lados de la membrana y esto determinará si es la síntesis o la hidrólisis es el proceso espontáneo favorecido. El rotor dará vueltas en sentido de las manecillas de reloj o en sentido contrario, y bombeará los protones correspondientemente en el sentido determinado. Este proceso se ha estudiado con medidas termodinámicas del poder de transducción de energía del motor (transmisión elástica) a través de dinámicas de Langevin con estados que implican tener fluctuaciones al azar o una fuerza electroquímica dirigida.<sup>(97, 98, 128, 138)</sup> Con este tipo de dinámicas, se han realizado explicaciones fenomenológicas que proponen un paisaje energético de las trayectorias de rotación, simulando el llenado de las subunidades *c*. Estas dinámicas no usan modelos estructurales, por lo que es incierto saber el detalle estructural de cómo ocurre el proceso.<sup>(62)</sup> No obstante, han provisto de detalles sobre cómo se realiza la apertura del sitio de unión de protón en el residuo ácido de la subunidad *c* por cambios en el pH. En 2012, Mukherjee y Warshel <sup>(139)</sup> usaron un modelo de grano grueso para modelar la rotación de  $F_0$  y la transferencia de protones para un anillo de 10 subunidades *c* ( $F_0$  bacteriano); calcularon una tasa de transferencia de 42,000 protones

(H<sup>+</sup>)/iones por segundo en un pH de 8, equivalente a 103 revoluciones por segundo y una potencia eléctrica de 200 mV. Eso compara bien con los valores experimentales determinados por Feniuk *et al*, (2004) de 12,500 H<sup>+</sup> por segundo.<sup>(65, 98, 128)</sup>

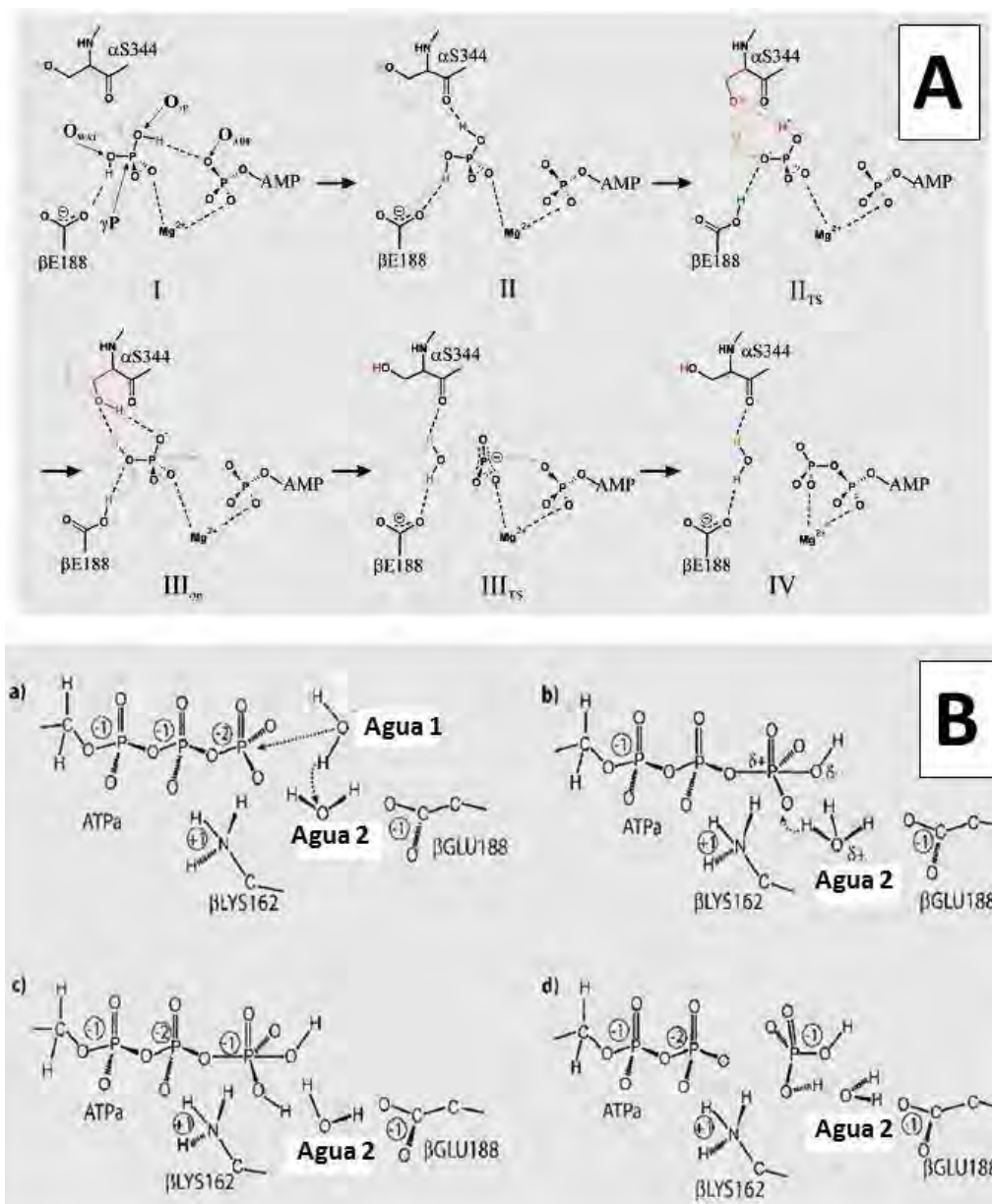


**Figura 8.** Sitios de transmisión elástica entre el rotor y estator del sector F<sub>1</sub>. **A)** Izquierda, corte transversal del ensamble F<sub>1</sub> que muestra la zona de doblado (asterisco) de la subunidad β marcada en colores rojo y verde. Subunidad α en amarillo, subunidad γ en gris. En azul se muestran las zonas de contacto y de transmisión de fuerza entre el rotor (γ) y el estator (β). Derecha, Esquema que muestra la transmisión del impulso en la subunidad β, el doblado de la subunidad es dirigido por el deslizamiento del asa P sobre los fosfatos del ATP. El motivo Hélice-Vuelta-Hélice (HTH) del C-terminal empuja sobre la subunidad gama excéntrica para producir la torsión rotatoria. Tomada de Sun *et al*, (2004). **B)** Cambios conformacionales de la subunidad β, de acuerdo al estado de unión (Superior) y a la rotación de la subunidad γ (inferior). El proceso de unión de ATP consiste de dos pasos. Primero: la entrada y unión transitoria, originada por el reconocimiento de la adenina del ATP. Segundo, generación de un ajuste inducido, dirigido por el reconocimiento de los fosfatos y que contribuye a la generación de torque (empuje). Las flechas azules indican cerrado de la subunidad beta, mientras que la flecha roja indica rotación de la subunidad γ. Tomada de Arai *et al*, (2014).

Las simulaciones también han generado información importante del mecanismo dentro de F<sub>1</sub>. Por dinámica molecular y mecánica cuántica (DM/MC) a través de modelos de Markov, se ha descrito el proceso y los cambios de energía en la reacción de hidrólisis de ATP dentro del sitio catalítico.<sup>(16, 54, 72, 83, 177, 178)</sup> De acuerdo a estos estudios, el camino con una barrera mínima de energía potencial involucra una molécula de agua polarizada

por la  $M\beta E^{188}$  que realiza el ataque nucleofílico al fosfato  $\gamma$ , ocurriendo la hidrólisis de ATP endotérmicamente en  $\beta_{TP}$ . Para la disociación del enlace  $\gamma P-O\beta$  se calculó una energía de 9.56 kcal/mol. El valor obtenido tiene similitud con el valor de activación de ATP calculado mediante experimentos de una sola molécula.<sup>(55)</sup>

Para la síntesis de ATP, simulaciones basadas en mecánica cuántica indican que existen dos estados de transición cruciales. i) la formación de un enlace entre el fosfato  $\beta$  del ADP ( $O_{ADP}$ ) y un ión metafosfato ( $PO_3^-$ ) y ii) una transferencia doble de protón o transprotonación del  $P_i$ , preparando la configuración apropiada par la formación del enlace  $\gamma P-O_{ADP}$  (Figura 9); en este proceso está involucrada directamente la  $E\alpha S^{344}$  de la secuencia VISITDG.<sup>(16)</sup>



**Figura 9.** Representación esquemática de la reacción para la síntesis (A) e hidrólisis (B) de ATP, determinados por simulaciones de mecánica cuántica. El número de residuo corresponde a la enzima de *E.coli*. Tomadas de Beke-Somfai *et al*, (2011) y Dittrich *et al*, (2003), respectivamente.

Otros resultados muestran cómo la rotación de la subunidad  $\gamma$  induce cambios estructurales en la subunidad  $\beta$ .<sup>(23, 45, 46, 51, 71, 92, 122)</sup> Aplicando una fuerza externa para provocar la rotación de  $120^\circ$  de la subunidad  $\gamma$  durante un tiempo de 3 a 7 ns, se observó el cierre espontáneo de la subunidad  $\beta_E$  a  $\beta_{TP}$ , formando el sitio de unión para que se una otra molécula de ATP.<sup>(22, 23)</sup> Estos resultados apoyan la idea de que la subunidad  $\beta$  funciona como un resorte con la ayuda de las interacciones con las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$ , que es consistente con un modelo de selección conformacional observado en la síntesis.<sup>(46)</sup> Donde la unión de ADP es precedida por la transición del sitio activo de  $\beta_E$  a  $\beta_{HC}$ . De forma contraria, los resultados de otros grupos, mostraron que la subunidad  $\beta$  sólo presentaba el cambio conformacional al unir los nucleótidos, similar a lo observado por NMR. Así, la subunidad  $\beta$  en solución asume una conformación que se parece a la abierta en  $F_1$  y por lo que la transición al estado cerrado necesita de la unión de nucleótido, como en el modelo de ajuste inducido.<sup>(89, 106, 122)</sup> Otras simulaciones han demostrado que los cambios conformacionales de la subunidad  $\beta$  inducen la rotación de la subunidad  $\gamma$ , determinando el siguiente mecanismo rotacional: El remodelamiento del sitio 1 de la subunidad  $\beta_{HC}$  por la liberación de Pi dirige la rotación de  $30^\circ$  de la subunidad  $\gamma$ . A continuación la unión de ATP al sitio 2 induce el cerrado de la subunidad  $\beta$ , que empuja a la subunidad  $\gamma$ , dirigiendo su rotación. Este movimiento posteriormente induce la apertura de la subunidad  $\beta$  en el sitio 1, acelerando la liberación de ADP. Este desplazamiento es crucial para formar el espacio que necesita la subunidad  $\gamma$  para completar la rotación de  $80^\circ$ .<sup>(107)</sup>

En 2014, Ito e Ikeguchi, suponiendo que la controversia se debía a los tiempos cortos de las dinámicas, realizaron dinámicas de las subunidades  $\beta$  de *Bacillus PS3* y de mitocondria, a tiempos largos de 100 ns. Las simulaciones muestran que la subunidad  $\beta$  se cierra sólo en presencia del nucleótido, observaciones consistentes con los datos de NMR. Sin embargo, Czub *et al*, (2014) con simulaciones de 300 ns para la rotación durante la síntesis observaron una transición espontánea de cerrado de la conformación  $\beta_E$  al estado  $\beta_{HC}$ .

Un efecto importante determinado al estudiar estos procesos es la propagación de los cambios conformacionales que se llevan a cabo a través de la subunidad  $\alpha$ , que generan asimetría en  $\alpha_3\beta_3$  y permiten la rotación de  $\gamma$ . En simulaciones de 30 ns se correlacionaron las fluctuaciones de residuos intrasubunidades mediante una matriz de

correlación entre los pares  $\beta/\alpha$ ,  $\beta/\gamma$  y  $\alpha/\gamma$ .<sup>(90)</sup> Los mapas generados por la matriz de correlación muestran patrones distintos para  $\beta_{DP}$  y  $\beta_{TP}$ . La conformación  $\beta_{DP}$  interactúa más fuertemente con las subunidades  $\alpha$  adyacentes  $\alpha_{DP}$  y  $\alpha_E$ , de hecho los residuos de unión de ATP en  $\beta_{DP}$  se mueven de forma concertada con los dominios C-terminal de  $\alpha_{DP}$  y  $\beta_{DP}$ . Los contactos principales entre el par de subunidades  $\beta/\gamma$  es de dos giros en el dominio de unión a nucleótido y la parte HTH del dominio C-terminal. El mayor número de contactos estables se generan entre el dominio C-terminal y la porción HTH de las subunidades  $\beta_{TP}$  y  $\beta_{DP}$ . En particular una amplia área de  $\beta_{DP}$  realiza relativamente movimientos correlacionados con la subunidad  $\gamma$ . Esto sugiere que el subsecuente cambio conformacional de  $\beta_{DP}$  dentro del ciclo rotatorio es un factor central para la rotación de la subunidad  $\gamma$ . Las observaciones también indican que hay diferencias entre cada interfaz  $\alpha$ - $\beta$ , las cuales cambian cíclicamente conforme avanza la catálisis, propuesta referida como el mecanismo de intercambio de empaquetamiento. Estos estudios encontraron que las interfaces de  $\beta_{DP}$  son debilitadas debido a perturbaciones como la hidrólisis o liberación de Pi, esto sucede mientras las otras interfaces se empaquetan más. Este mecanismo derivado de cálculos teóricos está apoyado por experimentos en donde la subunidad  $\gamma$  rota en la dirección correcta incluso cuando la mayor parte del tallo de la subunidad  $\gamma$  es eliminado. Por estudios de microscopía de fuerza atómica, se ha observado que los cambios conformacionales de la subunidad  $\beta$  son unidireccionales incluso sin la presencia de la subunidad  $\gamma$ .<sup>(69)</sup>

Los cambios conformacionales del sitio catalítico en respuesta a la rotación de subunidad  $\gamma$  son también regulados de manera muy fina por pequeños cambios en la subunidad  $\alpha$  durante el cambio de  $\beta_{TP}$  a  $\beta_{DP}$ . El primer cambio es el desplegamiento parcial de un fragmento de 6 residuos ( $M\alpha Q^{385}$ - $M\alpha K^{391}$ ) en la larga hélice- $\alpha$  formada por el segmento  $M\alpha S^{370}$ - $E^{393}$ , denominado motivo de sintonización. Esta región, junto a la  $M\alpha Ser^{344}$  en la secuencia  $M\alpha^{341}N$ VISIT<sup>346</sup>, participa en la estabilización del estado de transición.<sup>(17)</sup>

Actualmente, los modelos de dinámica han logrado dar un vistazo de los pasos, el almacenamiento transitorio de energía elástica y los controles del motor.<sup>(26)</sup> Sin embargo, aunque las dinámicas moleculares pueden proveer de cálculos para las energías de activación de distintos procesos asociados al mecanismo catalítico y en ocasiones se pueden asociar a observaciones experimentales, existen limitaciones. Estas son: las escalas temporales que pueden muestrear no proveen de las energías de unión

macroscópicas que contienen todos los pasos de un proceso, y en ocasiones es difícil relacionar los valores obtenidos de las simulaciones con valores experimentales.

## 1.5. Termodinámica del reconocimiento molecular

Para entender el proceso de reconocimiento molecular entre pequeños ligandos y macromoléculas biológicas, se requiere una completa caracterización de la energética de unión y su correlación con los cambios estructurales involucrados en la interacción. Una descripción completa requiere de conocer el paisaje de energía, definido por las probabilidades de ocupación relativas de los diferentes estados conformacionales (termodinámica) y las barreras energéticas entre estos (cinética). En biología, este concepto es tomado para extender el paradigma de estructura-función.<sup>(84)</sup> Así, todo intento para entender los detalles de la actividad de cada proteína requerirá la investigación de la dinámica de las fluctuaciones de estructura y su relación con la actividad catalítica.<sup>(31)</sup>

La Termodinámica se puede aplicar a sistemas de trabajo o energía, incluyendo los sistemas clásicos (en equilibrio) de temperatura, volumen y presión, y los que no se encuentran al equilibrio como los sistemas vivos y sus procesos químicos subyacentes. En 1824, Carnot en Francia inició lo que se conoce como la Termodinámica clásica, intentando entender el funcionamiento de las máquinas de vapor, fuerza que denominó como potencia motriz del fuego. Posteriormente, Clausius, entre 1840 y 1860, tomando el trabajo de Carnot, formalizó las dos primeras leyes de la termodinámica.<sup>(171)</sup>

La primera ley establece que los cambios en la energía interna  $dU$  es igual a los cambios de calor en el sistema,  $dQ$ , y el trabajo realizado en el sistema,  $dw$ , como se muestra en la ecuación 1. Enuncia que la energía no se crea ni se destruye, en lugar de eso es transformada. La transformación es constante y ocurre con dirección río abajo en la naturaleza.<sup>(111)</sup>

$$dU = dQ - dw \quad (1)$$

La segunda ley surge del reconocimiento por parte de Carnot de que no es posible convertir todo el calor generado en trabajo. La segunda ley observa que el trabajo puede disiparse en calor, pero no es posible convertir todo el calor en trabajo, proveyendo la

existencia de la irreversibilidad en la naturaleza. La medida de la irreversibilidad se puede describir formalmente en términos de cambio de entropía.<sup>(111, 171)</sup>

Todos los procesos naturales pueden dilucidarse en términos de la segunda ley. El calor siempre fluye espontáneamente de un reservorio caliente a uno frío hasta que ya no existe una diferencia o gradiente de temperatura, el gas fluye de altas presiones a bajas presiones hasta que ya no hay diferencia. Si uno mezcla agua caliente y agua fría, el agua resultante tendrá una temperatura intermedia y no puede separarse en las partes iniciales espontáneamente. Boltzman lo describió así: Es altamente improbable que el agua se separe espontáneamente en las porciones caliente y fría, pero no es imposible. La creación de entropía se da en todo proceso real y solo puede tomar la dirección en la que se formará más entropía, dibujando una "línea del tiempo" con dirección a donde existe mayor concentración de ésta. Sin embargo en la naturaleza, saber que tanta energía se ha convertido en entropía, es azaroso. Con estas ideas, Boltzman reformuló la termodinámica en términos de microestados de energía de la materia. En este contexto, la entropía refleja el número de diferentes caminos o microestados que se pueden combinar para generar un macroestado particular. Entre más microestados se tengan para un estado determinado, mayor entropía. La entropía puede ser vista como una medida de incertidumbre. Para una función energética con múltiples pozos de energía para varios microestados, existen dos formas de incertidumbre. Una surge de los movimientos dentro de un mismo pozo, el segundo, de las transiciones entre diferentes pozos. En la práctica, la contribución entrópica para los fenómenos de unión en proteínas es abordada usualmente de dos maneras. La primera involucra un muestreo exhaustivo de conformaciones (vía simulación molecular) en donde se obtienen entropías y entalpías aproximadas. El segundo acercamiento aplica un factor de corrección estadístico a la energía interna. El muestreo es generalmente caro en términos de tiempo, porque existen muchos aminoácidos que se deben considerar. Los métodos estadísticos con apoyo computacional, por otro lado, ignoran detalles de interacciones atómicas, sobreestimando el cambio de la entropía de unión.<sup>(171, 102)</sup>

### 1.5.1 El reconocimiento de proteína-ligando y su energía asociada

La descripción cuantitativa de las fuerzas que dominan el reconocimiento molecular requiere de la determinación de la energía libre de Gibbs de unión ( $\Delta G_u$ ), la entalpía ( $\Delta H_u$ ), la entropía ( $\Delta S_u$ ) y la capacidad calorífica ( $\Delta C_{p_u}$ ).<sup>(31)</sup>

A partir de la fuerza del reconocimiento o afinidad entre una proteína y su ligando, que está dada por la constante de equilibrio ( $K_u$ ) (o su inverso, la constante de disociación,  $K_d$ ), se refleja el cambio de energía libre de Gibbs de la asociación ( $\Delta G_u$ ):

$$\Delta G_u = -RT \ln(K_u) \quad (2)$$

Subyacentes al cambio de energía libre se encuentran el cambio de entalpía y de entropía con la relación:

$$\Delta G_u = \Delta H_u - T \Delta S_u \quad (3)$$

La contribución entálpica en el proceso de unión de una proteína se debe principalmente a la formación de puentes de hidrógeno, puentes salinos e interacciones de van der Waals entre la proteína y el ligando, a la desolvatación de las superficies interactuantes y a los cambios en las interacciones solvente-solvente.<sup>(12)</sup>

El cambio de entropía asociada a la interacción con el ligando puede expresarse como la suma de las entropías de solvatación ( $\Delta S_{solv}$ ), conformacional ( $\Delta S_{conf}$ ) y de roto-traslación ( $\Delta S_{r-t}$ ) de las moléculas que se asocian:

$$\Delta S_u = \Delta S_{solv} + \Delta S_{conf} + \Delta S_{r-t} \quad (4)$$

$\Delta S_{solv}$  es el término que refleja la restructuración del agua debido al cambio de exposición de las superficies (tanto polar y no polar) de la proteína y el ligando,  $\Delta S_{conf}$  contiene el cambio de los grados de libertad de rotación de los ángulos de torsión. En proteínas, los dos mayores contribuyentes a este término son la restricción de ángulos de torsión de cadenas laterales y la inmovilización de la cadena principal del polipéptido. El  $\Delta S_{r-t}$  involucra la reducción de grados de libertad traslacionales/rotacionales cuando el complejo se forma a partir de dos moléculas para formar solo una; es un término de mezclado de moléculas de soluto y solvente. El acercamiento de la separación de los términos entrópicos en múltiples componentes es aproximado dependiendo de que puedan acoplarse directamente. Sin embargo la separación de esta manera se comporta bien para reproducir los cambios entrópicos experimentales, siempre y cuando cada componente esté acoplado a los demás.<sup>(110)</sup>



En la formación de complejos proteína-ligando se observa comúnmente un fenómeno de compensación entálpica-entrópica, lo cual generalmente significa que la contribución de unión  $\Delta\Delta H \equiv \Delta H_2 - \Delta H_1$  es parcialmente o totalmente eliminada por un cambio en el componente entrópico de unión similar  $T\Delta\Delta S \equiv (T\Delta S_2) - (T\Delta S_1)$ . El origen físico de la compensación puede ser de dos tipos: La primera es la reorganización del solvente. Lumry sugiere que el comportamiento de la compensación es un proceso fundamental de las propiedades que ocurren en el agua cuando el número de aguas que interactúan en la capa de solvatación de una molécula disminuyen o aumentan. La segunda es la restricción conformacional que genera la unión. El ejemplo más simple es que el incremento de interacciones proteína-ligando favorables en el estado unido causa una restricción conformacional adicional, disminuyendo su entropía conformacional.<sup>(38)</sup>

El cambio en la capacidad calorífica,  $\Delta C_{p_u}$ , determina la dependencia que existe entre  $\Delta H_u$  y  $\Delta S_u$  con la temperatura. En eventos de reconocimiento molecular tipo cuerpo rígido,  $\Delta C_{p_u}$  presenta un comportamiento lineal hasta temperaturas alrededor de 100 °C. Sin embargo, trabajos teóricos recientes han mostrado que esto no siempre es el caso. Las compensaciones entálpico-entrópicas son una consecuencia natural de valores finitos de  $\Delta C_{p_u}$  y generalmente surgen de efectos cuánticos de confinamiento y múltiples interacciones débiles con una ventana limitada de energía libre. En la compensación, existen grandes efectos del  $\Delta C_{p_u}$ , así, las variaciones de  $\Delta H_u$  y  $\Delta S_u$  con la temperatura tienden a cancelarse para dar lugar a cambios de  $\Delta G_u$  relativamente pequeños y consecuentemente pequeños cambios en la constante de equilibrio  $K_u$ . Esta compensación confiere una estabilidad termodinámica y de amortiguamiento contra retos ambientales y mutaciones. Cuando no existe una compensación el  $\Delta H_u$  y  $\Delta S_u$  son constantes ( $\Delta C_{p_u}=0$ ), provocando que el  $\Delta G_u$  y  $K_u$  varíen mucho más con la temperatura.<sup>(40)</sup>

### 1.5.2 $\Delta C_p$ , acoplador entre energética y estructura

En el proceso que se lleva a cabo para formar un complejo durante la unión de dos o más moléculas, el cambio en la capacidad calorífica resulta ser una función sensible a la reorganización del solvente alrededor de la proteína y el ligando, funcionando generalmente como un sensor de los cambios conformacionales que acompañan la reacción.<sup>(155, 157)</sup> Además, la solvatación de grupos polares y apolares

ocurre con contribuciones de signo contrario, por lo que el valor global de  $\Delta C_{p,u}$  es un excelente indicador del grado de hidrofobicidad o polaridad de la interacción. La estructuración del agua alrededor de los grupos no polares o polares es un factor importante en la solubilidad diferencial y efecto en la capacidad calorífica. Los cambios en esta función se han analizado ampliamente a partir de las contribuciones que surgen de la hidratación polar o hidrofóbica de los grupos expuestos u ocultos al formarse el complejo. La solvatación de los grupos no polares se comenzó estudiando a través de su efecto en la disminución de entropía, después se demostró que el  $C_p$  es un mejor parámetro para entender la solvatación hidrofóbica. El  $C_p$  describe la dependencia de la entalpía y la entropía con la temperatura,<sup>(70)</sup> afectando por lo tanto el cambio de energía libre (ecuación 5). La capacidad calorífica ( $C_p$ ) se puede definir de diferentes maneras, la primera es la relación entre la entalpía ( $\Delta H$ ) con la temperatura. Otras son: la dependencia de la entropía con la temperatura, la segunda derivada o curvatura de la energía libre y la fluctuación media al cuadrado de la energía escalada por  $kT^2$ .<sup>(155)</sup>

$$C_p = \frac{dH}{dT} = \frac{T dS}{dT} = -T \left( \frac{d^2G}{dT^2} \right) = \frac{\langle \delta H^2 \rangle}{kT^2} \quad (5)$$

La contribución de los grupos no polares a la capacidad calorífica se puede interpretar principalmente en términos geométricos. Estos grupos ocupan volumen dentro del seno acuoso, pero interactúan débilmente con las moléculas de agua. Estas últimas tienden a formar interacciones más fuertes entre ellas, las cuales no son perturbables térmicamente. Por tanto, los nuevos puentes de hidrógeno representan una barrera para el incremento de energía cinética del sistema, dando origen a un incremento en la capacidad calorífica. Los grupos polares, en contraste, interactúan con las moléculas de agua más fuertemente, favoreciendo la orientación de los dipolos alrededor de las interacciones electrostáticas fuertes.<sup>(70)</sup> Estas interacciones agua-soluto polar son tan energéticas, que térmicamente son menos perturbables que los puentes de hidrógeno agua-agua en el seno acuoso. Por tanto, la solvatación de grupos polares generalmente causa un decremento en la capacidad calorífica de la solución.

Modelos actuales basados en áreas accesibles al solvente (ASA) utilizan relaciones empíricas que han sido parametrizadas a partir del análisis de datos del desplegamiento de proteínas y de transferencia de solutos. Estos modelos utilizan mediciones precisas de la solvatación de moléculas modelo y de proteínas, mostrando inequívocamente que la hidratación de grupos no polares y polares es acompañada por un incremento y disminución en el  $C_p$ , respectivamente. Por lo tanto, los cambios observados son

descritos como una función simple de los cambios de área accesible al solvente de tipo no polar y polar,  $\Delta A_{np}$  y  $\Delta A_p$ , respectivamente:

$$\Delta C_p^{hidratación} = \alpha \Delta A_{np} + \beta \Delta A_p \quad (6)$$

En donde  $\alpha$  y  $\beta$  son los coeficientes de proporcionalidad por unidad de área del cambio de capacidad calorífica, asociado a compuestos no polares y polares, respectivamente.

A través del uso de estructuras cristalográficas y de la ecuación 6, es posible calcular un  $\Delta C_p$  teórico que correspondería a la asociación tipo cuerpo rígido entre las moléculas interactuantes. Este valor se puede comparar con el  $\Delta C_{pu}$  determinado experimentalmente a partir del cambio de entalpía respecto a la temperatura ( $\Delta H/T$ ). De esta manera puede conocerse más sobre la interacción. Este acercamiento se ha realizado previamente en muchas ocasiones con resultados congruentes o contradictorios entre valores determinados experimentalmente y calculados a partir de datos estructurales.<sup>(40, 69)</sup> En general, las asociaciones de tipo cuerpo rígido correlacionan bien. En otros casos, se debe considerar la ocurrencia de equilibrios acoplados que proveen una fuente potencial de cambios en la capacidad calorífica o cambios dinámicos que no se observan en las estructuras cristalográficas.

### 1.5.3 Técnicas calorimétricas

Las modernas técnicas calorimétricas permiten medir directamente los cambios de calor y la termodinámica asociada a procesos biomoleculares en solución acuosa. El desarrollo de estas técnicas tiene una larga historia. La calorimetría es una ciencia muy vieja que se desarrolló desde el siglo 17, época en la cual se inventó el termómetro y se comenzó a experimentar con los cambios de temperatura.<sup>(153)</sup>

Las técnicas calorimétricas aplicadas a la investigación de la estabilidad y las interacciones de las macromoléculas son la calorimetría diferencial de barrido (CDB) y la de titulación isotérmica (CIT), respectivamente. La CDB mide la entalpía y la capacidad calorífica de la desnaturalización térmica. La CIT mide la evolución del calor durante la asociación molecular. Los calorímetros de tipo CIT (Figura 10A) consisten de dos celdas idénticas hechas de un material altamente eficiente en la conducción térmica. Las dos celdas están contenidas dentro de una cubierta adiabática. Un arreglo de termopares sensibles detectan la diferencia de temperatura en ambas celdas y aportan una fuente de potencia se mantiene la temperatura de las dos celdas iguales.

Un experimento típico involucra una molécula receptora es titulada con un ligando, ocupando progresivamente todos los sitios de unión a través de adiciones secuenciales de ligando. Al inicio del experimento la molécula receptora es situada en la celda de reacción, mientras que la celda de referencia, se llena con agua o amortiguador de trabajo. Por otra parte, el ligando es introducido en una jeringa giratoria acoplada a un motor preciso que esta controlado por computadora y que permitirá hacer inyecciones de pequeños volúmenes (del orden de microlitros). Antes de iniciar un experimento, el instrumento da energía a las dos celdas en forma de potencia eléctrica, manteniendo la temperatura de las dos con una diferencia de temperatura ( $\Delta T$ ) de  $\sim 10^{-6}$  °C. La diferencia de potencia entre las dos celdas corresponde al gráfico calorimétrico (Figura 10B, arriba). Durante la interacción entre las dos moléculas se llevará a cabo la absorción o liberación de calor, es decir una reacción endotérmica o exotérmica, respectivamente. Para mantener el  $\Delta T=0$  constante, la energía suministrada es disminuida o aumentada de acuerdo a el calor intercambiado en cada adición. En la titulación el ligando L es agregado secuencialmente en pequeñas alícuotas a la macromolécula M hasta lograr la saturación del receptor. En un experimento ideal, la concentración de las dos especies moleculares interactuantes es tal que al final de la titulación, los sitios de unión son saturados al menos en un 90%. Los datos crudos de salida son una gráfica de la diferencia de potencia requerida y administrada para mantener las dos celdas a la misma temperatura, con respecto al tiempo, generando un diferencial de potencia medida en  $\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$  (Figura 10B arriba). La integración del diferencial de potencia durante el tiempo proporciona el calor  $q$  liberado o absorbido durante la unión de  $i$  moles de ligando a la macromolécula, en cada inyección. (Figura 10B, abajo). Así, cuando la cantidad de moles de ligando (L) unido es conocida, la relación de  $q$  con respecto al número de moles de complejo formado corresponde a la entalpía molar de unión ( $\Delta H_u$ ) a temperatura y presión constantes. En la práctica, este valor es conocido a partir de un proceso de ajuste de las curvas de unión. El experimento de titulación también permite determinar la  $K_u$ . Durante las inyecciones secuenciales del ligando L a la macromolécula M, se lleva a cabo el incremento de relación  $[L]_T/[M]_T$  de  $<0.1$  a arriba de 2-3. Por lo que los calores observados representan el grado de saturación durante la titulación. Después de correcciones por calores inespecíficos de dilución, cambios en la concentración de L y M y el cambio de volumen en cada inyección, el pico detectado en cada inyección es proporcional a la entalpía molar, de acuerdo a:

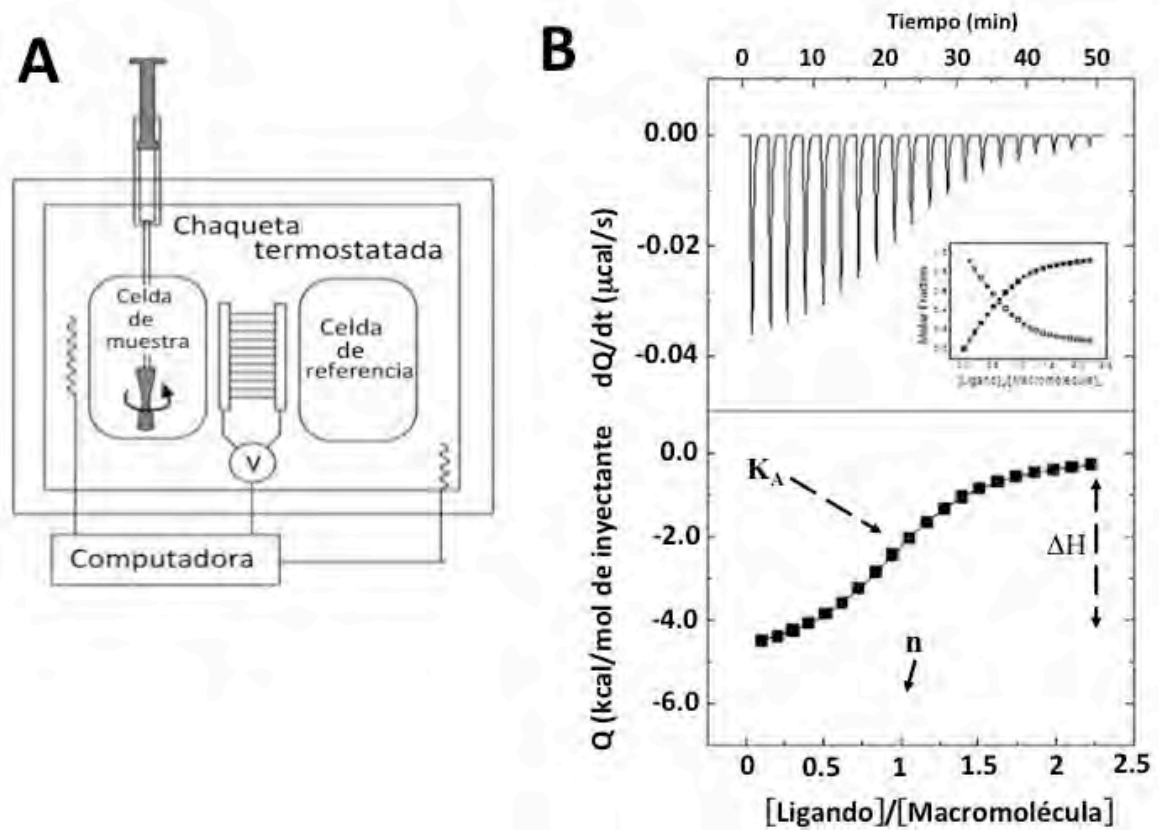
$$q = V_{cell} \Delta H[M]_{tot}(Y_i - Y_{i-1}) \quad (7)$$

en donde  $V_{cell}$  es el volumen de la celda,  $Y$  es el grado de saturación. El producto  $[M]_{tot}(Y_i - Y_{i-1}) = [ML]_i$ , es la concentración de complejo formado durante la inyección  $i$ . El cálculo de  $Y$  requiere de conocer a  $[ML]$ , lo cual implica la solución de una ecuación cuadrática en el caso más simple de unión 1:1 sería:

$$\frac{[L]}{[M_T]} = \frac{X_R - 1 - r + \sqrt{(X_R + 1 + r)^2 - 4X_R}}{2} \quad (8)$$

Donde  $r$  es una constante sin unidades que describe las condiciones de un determinado experimento. Wiseman <sup>(188)</sup> usando la variable  $c$ , que es igual a  $1/r$ , determino que solo en el intervalo de valores de  $c$  entre 1 y 1000 las isothermas se pueden deconvolucionar para obtener valores precisos de  $K_u$ . Por otra parte  $X_R$  es la relación  $[L_T]/[M_T]$ .<sup>(88, 184)</sup>

La combinación de las ecuaciones 7 y 8 permite ajustar los datos experimentales para calcular  $K_u$  y  $\Delta H_u$ . Una vez conocidas  $K_u$  y  $\Delta H_u$ , los otros parámetros termodinámicos se pueden obtener de manera directa. El  $\Delta G$  de la relación mostrada en la ecuación 2 y el cambio de entropía por la relación  $\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T$ . Adicionalmente realizando experimentos a diferentes temperaturas, es posible determinar con precisión el  $\Delta C_p$  haciendo uso de la ecuación 5.



**Figura 10. A.** Esquema de la constitución de un calorímetro de titulación isotérmica. Se señalan las dos celdas separadas por termopares a los que se les puede suministrar una potencia en forma de voltaje. La celda de muestra tiene acoplada una jeringa que rota para generar una buena difusión de las moléculas. La chaqueta que contiene a las dos celdas es colocada a la misma temperatura del experimento (termostatada). **B.** Arriba, potenciograma obtenido del cambio de potencia en cada inyección (cada pico) con respecto al tiempo. La integración de las inyecciones genera la isoterma de unión (abajo) de donde se pueden obtener a través del ajuste a un modelo de unión los parámetros mostrados. Tomada de Velázquez-Campoy *et al*, (2004).

## 2. Antecedentes de este trabajo

El mecanismo de acoplamiento de la disipación del gradiente de protones a la formación de ATP por la  $F_0F_1$ -ATP sintasa ha sido un tema de gran interés por su importancia en la producción de ATP. A la misma vez es un gran desafío establecer una correlación estructura-función en la enzima, debido a la complejidad que manifiesta su arreglo multimérico. Si bien en términos estructurales han existido progresos importantes en nuestra comprensión del funcionamiento de la ATP sintasa, para develar las bases moleculares del mecanismo rotatorio de esta enzima es crucial tener una profunda comprensión de las fuerzas que subyacen en la coordinación y comunicación entre las diferentes subunidades. Una estrategia pertinente para el estudio de sistemas complejos es su disección en subsistemas más pequeños, siempre y cuando los componentes conserven propiedades valiosas para descifrar el comportamiento global. Afortunadamente, éste es el caso para la ATP sintasa. La enzima se disocia reversiblemente en sus dos sectores. De manera aislada,  $F_0$  es capaz de translocar protones, mientras que  $F_1$  muestra plena actividad de ATPasa. El subcomplejo  $\alpha_3\beta_3\gamma$  es el núcleo catalítico/rotor mínimo, <sup>(126)</sup> mientras que  $\alpha_3\beta_3$  también exhibe cambios conformacionales dinámicos inducidos por la asimetría de unión de ATP.<sup>(110)</sup> De manera aislada, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son monómeros con un plegado tipo nativo, capaces de unir nucleótidos con considerable afinidad.<sup>(152, 158)</sup> Estas características brindan una excelente oportunidad para un escrutinio profundo de los determinantes moleculares de la interacción e interdependencia entre subunidades en los diferentes niveles de ensamblaje de la enzima. Actualmente, un aspecto importante es que debido a la asimetría observada en las subunidades catalíticas, la explicación del mecanismo catalítico con un enfoque estructural ha considerado en la mayoría de los casos el paso de los tres sitios activos por diferentes conformaciones. Esta diferencia asimétrica de las subunidades  $\beta$  y la simetría de las subunidades  $\alpha$  ha sesgado el estudio hacia modelos que sólo incluyen a la subunidad  $\beta$  y ha conducido a suponer que las subunidades  $\alpha$  juegan exclusivamente un papel estructural, manteniendo el hexámero estable. Sin embargo, como se menciona en la introducción, se ha observado para las subunidades

no catalíticas un papel regulatorio y de participación directa en la catálisis a través de residuos de arginina y serina conservado.

Conocer las afinidades y energías asociadas a la unión de las subunidades con los distintos sustratos y a la interacción con otras subunidades ayudará a lograr una mejor comprensión sobre el mecanismo rotatorio de la ATP sintasa. La determinación de constantes de unión para las subunidades aisladas se ha realizado mediante dicroísmo circular o fluorescencia de análogos de sustrato (Tabla 2). Sin embargo, el uso de análogos no lleva a evaluar la afinidad para los verdaderos sustratos. También la determinación de las afinidades a partir de cambios en señales espectroscópicas como el dicroísmo circular o fluorescencia, pueden variar debido a desviaciones en la absorción de luz según la ley de Beer-Lambert por muestras con una alta absorbencia o eventos moleculares como dimerización de cromóforos, que resulten en propiedades espectroscópicas distintas.<sup>(86)</sup> Además la complejidad que representa la unión de nucleótidos a los diferentes sitios del sector F<sub>1</sub>, impide que la determinación de valores para la afinidad por nucleótido de los distintos sitios sea precisa. Por otro lado, el uso de la calorimetría, como se ha mencionado, ha mostrado ser una técnica robusta para obtener valores de unión, permitiendo medir las afinidades (K<sub>u</sub>) de forma precisa, permitiendo además conocer en conjunto el  $\Delta H_u$ , el  $\Delta S_u$ , el  $\Delta G_u$  y el  $\Delta C_{p,u}$ . Este conjunto de parámetros proporciona más información acerca del proceso de unión, y la posibilidad de realizar asociaciones estructurales con respecto a la pérdida/ganancia de interacciones y el cambio de solvatación de las superficies y/o liberación de moléculas de agua.

Por calorimetría se han determinado las afinidades de unión por nucleótidos de las subunidades  $\beta$  aisladas de *Bacillus PS3* (Tabla 2).<sup>(144, 152, 158)</sup> Odaka *et al*, (1994) fueron los primeros en reportar las firmas termodinámicas para la unión de los nucleótidos a la subunidad  $\beta$  de *Bacillus PS3*, observando que la unión de MgATP y MgADP es similar, con contribuciones entálpicas y entrópicas muy semejantes (Tabla 3). Posteriormente, Pérez-Hernández *et al*, (2002) describieron la unión de MgADP a la misma subunidad. A partir de evaluar el  $\Delta H_u$  con respecto a la temperatura, se obtuvo el  $\Delta C_{p,u}$ , con un valor de  $-36 \pm 7$  cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>. Este valor pudo ser asociado mediante el modelo de área expuestas al solvente (ASA), al cambio conformacional  $\beta_E \rightarrow \beta_{DP}$  de la estructura del pdb 1BMF de mitocondria. Se observó que existía un cambio conformacional caracterizado por ocultamiento y exposición de áreas en diferentes zonas de la proteína, que generan un cambio total de exposición en la proteína casi nulo



( $\Delta ASA=40 \text{ \AA}^2$ ). La determinación del  $\Delta C_{p_u}$  con este modelo mostró ser parecido al experimental ( $\Delta C_{p_{calc}}= 65 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), y que al ser pequeño, refleja el efecto de rearrreglo de áreas que existe en la subunidad  $\beta$  al unir el ligando. La buena correlación entre los valores experimentales y calculados muestra que el acercamiento que considera el efecto de las áreas expuestas sobre el  $\Delta C_{p_u}$  de una solución puede funcionar adecuadamente para explicar el reconocimiento entre proteínas y nucleótidos.

**Tabla 2.** Constantes de disociación determinadas por calorimetría y técnicas espectroscópicas para los dos tipos de sitios en el subcomplejo  $F_1$  de *Bacillus PS3* ( $TF_1$ ) y *E. coli*, ( $EF_1$ )

	Catalítico					No catalítico		
	$EF_1$ ( $\mu\text{M}$ )	$TF_1$ ( $\mu\text{M}$ )			$EF_1$ ( $\mu\text{M}$ )	$TF_1$ ( $\mu\text{M}$ )		
Técnica	Diálisis	CD	FL	Calorimetría		FL	CD	
MgATP	0.1	22		15		10	55	10
ATP		15				7.69	3500	18
MgADP	0.9	11		11	10.9		105	18
ADP		8.5				16 <sup>a</sup>	1300	120
MgAMPP NP								
Ref.	58	145	199	144	146	158	192	145

CD: Dicroísmo circular. FL: Fluorescencia. <sup>a</sup>Valor obtenido por <sup>(166)</sup>

De manera similar, Pulido *et al*, (2010) describieron la unión de MgATP, ATP y ADP a la subunidad  $\beta$  de *Bacillus PS3*. Los valores de unión mostraron que con magnesio la afinidad es 7 veces mayor para MgATP contra el nucleótido sin magnesio. De igual manera, para ADP se observa un aumento en la afinidad por la presencia del metal, aunque este incremento es mucho menor que con ATP. Haciendo uso de la Ley de Hess, también se obtuvieron los valores energéticos asociados al efecto de la presencia del magnesio para cada nucleótido, mostrándose que tiene  $3 \text{ kcal mol}^{-1}$  más de interacciones favorables en presencia de ATP comparado con ADP. Aunque este efecto no se observa en la diferencia de afinidad entre los dos nucleótidos, la participación del  $\text{Mg}^{2+}$ , además de su papel coadyuvante en la catálisis, también ayuda a lograr la estereoquímica propicia

para albergar al fosfato- $\gamma$  del ATP. Esto lleva al reacomodo de los residuos catalíticos, las moléculas de agua y los fosfatos del ATP dentro del sitio catalítico, para lograr formar el estado de transición.

**Tabla 3.** Parámetros termodinámicos para la unión de nucleótidos a la subunidad catalítica del sector hidrosoluble ( $F_1$ ) de la ATPasa.

<b>Nucleótido</b>	$\Delta H$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$T\Delta S$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	<b>Ref.</b>
MgATP	-12	-5.5	-6.5	144
	-10.4	-3.6	-6.8	158
MgADP	-9.8	-3.5	-6.5	144
	-9.47	-2.7	-6.77	152
ATP	-3.4	2.2	-5.6	158
ADP	-7.1	-0.6	-6.5	166

Una gran diferencia se observó en los valores de  $\Delta C_p$  entre nucleótidos. El valor para la unión de MgATP es de -150 cal mol K<sup>-1</sup>, casi cuatro veces el valor observado para MgADP. Sin embargo, al comparar los valores experimental y calculado mediante modelos ASA asociados al  $\Delta C_p$ , no se observó una buena correlación para MgATP, como si se observó para MgADP. Por lo tanto, aunque el cambio de áreas para las conformaciones  $\beta_{TP}$  y  $\beta_{DP}$  son muy similares, el paso de la conformación  $\beta_E$  a  $\beta_{TP}$  en el cristal de Abrahams *et al*, (1994) no explica la unión de MgATP observada en la subunidad  $\beta$  aislada. Esta falta de correlación puede deberse a una diferencia entre la conformación cerrada de la subunidad aislada al unir el ligando y la capturada en la estructura cristalográfica del complejo  $F_1$ . Esta diferencia fue observada en un análisis de NMR de los cambios conformacionales en la subunidad  $\beta$  aislada de *Bacillus PS3*. Usando un marcaje isotópico por segmentos en ésta subunidad se encontró que la orientación relativa del dominio C-terminal en los complejos MgATP y MgADP difieren en 10°, indicando que la subunidad  $\beta$  aislada adopta una conformación más cerrada al

unir MgATP en solución, a la conformación cerrada que adopta esta subunidad dentro del complejo  $F_1$  en las estructuras cristalográficas.<sup>(197, 198, 199)</sup>

A diferencia de las subunidades  $\beta$ , el papel que juegan las subunidades  $\alpha$  en el funcionamiento rotatorio de la ATP sintasa sigue siendo poco comprendido. En particular, se desconoce el efecto que tiene la unión de nucleótidos sobre el estado conformacional de las subunidades no catalíticas y las implicaciones que ello tiene sobre la propagación de cambios conformacionales a lo largo del ciclo catalítico de la enzima. Para arrojar nueva luz al respecto, en este estudio realizamos un análisis energético y estructural detallado de la interacción de la subunidad  $\alpha$  aislada con nucleótidos de adenina. Mediante ITC, obtuvimos las firmas termodinámicas de formación de los complejos con ATP y ADP. Realizando un análisis estructural a partir de parámetros energéticos similar al efectuado previamente para la subunidad  $\beta$  aislada, obtuvimos evidencia de que el comportamiento conformacional de la subunidad no catalítica es sustancialmente diferente al de la catalítica. Adicionalmente, exploramos la posibilidad de obtener información de la titulación calorimétrica del núcleo catalítico de  $F_1$ .

### **3. Hipótesis**

Las subunidades catalíticas y no catalíticas del subcomplejo  $F_1$  de la ATP sintasa, surgidas a partir de un fenómeno de duplicación génica, comparten una estructura tridimensional global muy parecida. No obstante, la forma en que interactúan con nucleótidos difiere considerablemente, reflejándose en firmas termodinámicas de unión y comportamientos conformacionales divergentes. Estas diferencias les permiten comportarse diferencialmente en la propagación de cambios conformacionales a lo largo del ciclo catalítico de la enzima.

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo General

Evaluar la termodinámica de reconocimiento de los nucleótidos de adenina a la subunidad  $\alpha$  aislada y al núcleo catalítico  $F_1$  de la ATP sintasa del termófilo *Geobacillus kaustophilus*, con el fin de entender con mayor precisión el papel que juegan las subunidades no catalíticas en el ciclo catalítico rotatorio de la enzima.

### 4.2. Objetivos particulares

- Purificar la subunidad  $\alpha$  aislada de la ATP sintasa de *Bacillus PS3* ( $T\alpha$ ) y *Geobacillus kaustophilus* ( $G\alpha$ ).
- Determinar los cambios energéticos involucrados en la asociación de la subunidad  $G\alpha$  y diferentes nucleótidos de adenina en presencia y ausencia de magnesio mediante calorimetría de titulación isotérmica.
- Purificar el complejo  $\alpha_3\beta_3\gamma$  (denominado Cys/Trp less) de *G. kaustophilus*.
- Determinar la energía de unión de nucleótidos de adenina al núcleo catalítico de la  $F_1$ -ATPasa de *G. kaustophilus*.
- A partir de un análisis de los parámetros energéticos de unión, inferir los cambios conformacionales inducidos por la unión de MgATP a la subunidad  $\alpha$ .

## 5. Métodos

### 5.1. Clonación de las Subunidades $\alpha$ de ( $T\alpha$ ) y *Geobacillus kaustophilus* ( $G\alpha$ )

Para este estudio, se trabajó inicialmente con tres diferentes plásmidos codificantes para la subunidad  $\alpha$ , los cuales, putativamente, correspondían a la secuencia de *Bacillus PS3* ( $T\alpha$ ). El plásmido PTZR18<sup>(146)</sup> contenía a  $T\alpha$ , lo cual fue corroborado por secuenciación. El plásmido pUC57\* contenía el gen sintético construido a partir de la secuencia depositada en la base de datos nucleótido de NCBI. Finalmente, a partir del gen codificante para el sector  $F_1$  (donado por el Dr. M. Yoshida del Departamento de Biociencia Molecular, Universidad de Kyoto, Sangyo, Japón) en el plásmido pAGB que contiene la construcción del complejo  $GF_1$  ( $\alpha_3\beta_3\gamma$ ) se obtuvo la secuencia de la subunidad  $\alpha$ , utilizando las enzimas de restricción NdeI y BamHI, la secuencia del gen fue clonada en los plásmidos pET3a y pET28. No obstante, al secuenciarse esta construcción, el gen resultó codificar para la subunidad  $\alpha$  de *G. kaustophilus* ( $G\alpha$ ), la cual presenta una identidad a nivel de aminoácidos del 97% con  $T\alpha$ .

Los genes de  $T\alpha$  y de  $G\alpha$  se amplificaron con PCR utilizando oligonucleótidos complementarios a las secuencias de inicio y término, con secuencias de restricción para las enzimas NdeI y BamHI, usados para ligar a los plásmidos acarreadores. La ligación se llevó a cabo durante 12 horas a 4 °C. Para  $G\alpha$  la ligación se llevó a cabo en los plásmidos pET3a y pET28; el gen de  $T\alpha$  sólo se ligó al plásmido pET28. Los plásmidos ligados con el gen se introdujeron en la cepa competente DH-10B de *E. coli* mediante choque térmico y después de incubar al menos 12 h, se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina. Las colonias seleccionadas se incubaron durante la noche en medio LB suplementado con el antibiótico. Se obtuvieron a través de miniprep los plásmidos de las colonias seleccionadas, y por digestión con las enzimas NdeI y BamHI se seleccionaron las que contenían el fragmento de alrededor de 1,500 pb, tamaño que corresponde al gen de la subunidad  $\alpha$ . Los plásmidos identificados con la subunidad  $\alpha$  se utilizaron para transformar las cepa DK8 que no contiene genes del operón de la ATP sintasa. Además la construcción con pET28 que contiene la etiqueta de histidinas se uso para transformar

las cepas Rossetta y BL21 que si contienen los genes de la ATP sintasa, seleccionándose la proteína deseada a partir de la etiqueta de histidinas.

## 5.2. Ensayos de expresión

Las cepas transformadas con la subunidad  $G\alpha$ ,  $G\alpha$ -His,  $T\alpha$  y  $T\alpha$ -His (His, que presenta etiqueta de histidinas), se crecieron a 37 °C y 250 rpm de agitación en 50 mL de medio LB complementado con ampicilina para PET3a y pTZR18 y con kanamicina para pET28 a una concentración de 100  $\mu$ g/L y de 30  $\mu$ g/L, respectivamente. Al alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm, se indujo la expresión con 0.5 mM de IPTG. Se tomaron muestras cada 2 h, hasta las 24 h durante la inducción. Para cada muestra se cosecharon las células por centrifugación a 6,500 rpm por 1 min. Las pastillas de células fueron resuspendidas en amortiguador de lisis y sonicadas con 8 ciclos de 45 s de sonicación y 1.15 min de descanso. La producción de proteína se observó en geles de poliacrilamida-SDS teñidos con azul de Coomassie.

## 5.3. Purificación de la subunidad $\alpha$

Para las subunidades sin colas de histidina, la pastilla de células obtenida fue lavada con amortiguador de lisis (Tris- $SO_4$  50 mM, EDTA 1 mM, 50 mM NaCl, 60 mM PABA, 10% glicerol, pH 8) y resuspendida de forma homogénea en 50 mL. Las células se rompieron en baño de hielo por sonicación en 10 ciclos de 45 s con intervalos de 1 min. El lisado se ultracentrifugó a 100,000 g por 1 h a 4 °C.

El sobrenadante fue cargado en la columna Dietil-amino-etil (DEAE) macroprep, equilibrada con el amortiguador: Tris- $SO_4$  50 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM y se lavó con 1 L de amortiguador. Se realizó una elución lineal de 0 a 500 mM de NaCl, colectándose fracciones de 5 mL.

Las fracciones ricas en la subunidad  $\alpha$  se dializaron contra Tris-HCl 50 mM, 1 mM EDTA, pH 7.3, durante 24 h y se cargaron en la columna Mono Q, previamente equilibrada con Tris-HCl 50 mM, 1 mM EDTA, pH 7.3 y eluidas con un gradiente lineal de

0-200 mM de sal. El grado de pureza fue observado por electroforesis, en geles de poliacrilamida al 12%.

La subunidad  $\alpha$  se concentró por centrifugación a 8,000 rpm x 15 min en centricones (Millipore YW-30,000), hasta un volumen de entre 2.5 a 3 mL. La concentración de proteína se determinó por los métodos del ácido bicinconínico (BCA) y Bradford, usando albúmina bovina como estándar.

#### **5.4. Purificación de la subunidad $\alpha$ con colas de histidina**

Se inocularon 3 ml de medio LB-ampicilina (100  $\mu$ g/ml) con una colonia de DK8-T $\alpha$  o BL21-G $\alpha$ , y se dejó crecer durante toda la noche. Se tomó un pre-inóculo de 1 mL para inocular un litro de medio de cultivo LB, y se creció hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm, en donde la producción de la subunidad se indujo con 0.5 mM/L de IPTG por 8 h. Las células se cosecharon por centrifugación a 6,500 rpm y se lisaron por sonicación en 10 pulsos de 45 s con espacios de 2 min en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM de imidazol, 10% glicerol.

Para la subunidad T $\alpha$ -His, el lisado se centrifugó a 15,000 rpm por 30 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla se solubilizó mediante sonicación con 5 pulsos de 30 s en el amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8, 500 mM NaCl, 1% v/v Tritón, 2 M Urea. Posteriormente, se centrifugó a 15,000 rpm por 30 min, repitiéndose el paso de lavado una vez más. La pastilla con los cuerpos de inclusión se solubilizó con 5 pulsos de sonicación en Tris-HCl 50 mM, pH 8, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, 1 mM DTT y 8 M urea. La muestra solubilizada se cargó en una columna de Ni-NTA equilibrada con el mismo amortiguador de 8 M de urea, se eluyó la proteína de manera lineal con amortiguador Tris-HCl, pH 8, 500 mM NaCl y 500 mM de imidazol.

La proteína eluida (5 mL) se dializó contra 2 cambios de 1 L de amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8, 250 mM NaCl, 0.5 mM EDTA y 1 mM DTT. El corte de las colas de histidina se realizó a 4 °C con la enzima TEV, en una relación de 3 a 1 de subunidad T $\alpha$ -His contra proteasa.

Para la subunidad G $\alpha$ -His, el sobrenadante obtenido de la centrifugación se aplicó a una columna de Ni-NTA, y se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 500 mM de imidazol en 5 volúmenes de columna. Las fracciones ricas en la proteína se juntaron y dializaron una proporción de 1:1000 contra Tris-HCL 50 mM, pH 7.3, 1 mM EDTA y 10% glicerol



con 2 cambios de 8 h cada uno y cargadas en la columna Mono Q equilibrada con el mismo amortiguador. La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de 0 a 150 mM de NaCl en 10 volúmenes de columna (80 mL). La subunidad  $\alpha$  pura se concentró por centrifugación en centricones con un poro de corte de 10 kDa.

## 5.5. Estado de agregación de la subunidad T $\alpha$

El estado de agregación a 25 °C se determinó por dispersión dinámica de luz (DLS) en un equipo DLS Nano S (Malvern, USA), y mediante el cambio de absorbencia a 410 nm con agitación continua en un espectrofotómetro Cari 150.

En los experimentos de DLS, se realizaron 8 mediciones de 120 s, para la subunidad sola y en presencia de ATP<sup>4-</sup>, Mg(II) y MgATP<sup>2-</sup>. Posteriormente, las muestras se agitaron y se volvieron a hacer 3 mediciones.

Para los experimentos espectrofotométricos se realizaron mezclas de la subunidad  $\alpha$  con los ligandos ATP (2.5 mM), Mg(II) (10 mM) y MgATP (2.5 mM) en amortiguador Tris 50 mM, pH 8. Se realizaron mediciones cada 2 min en intervalos de entre 90 y 150 min. La agregación de T $\alpha$  en presencia de MgATP se observó en diferentes condiciones. En el amortiguador Tris 50 mM fueron modificados el pH (7, 7.5 y 8), la fuerza iónica (250 mM NaCl) y la viscosidad (20% glicerol).

## 5.6. Expresión y purificación del complejo GF<sub>1</sub> (Cys/Trp lees)

Se llevó a cabo la expresión y purificación del complejo GF<sub>1</sub> denominado Cys/Trp lees porque presenta las mutaciones  $\alpha$ Cys<sup>193</sup>Ser y  $\alpha$ Trp<sup>463</sup>Phe, donada amablemente por el Dr. Yoshida. Es considerada como una segunda enzima silvestre por su comportamiento cinético similar al de la enzima silvestre.<sup>(125)</sup>

La cepa Dk8 con la construcción del complejo se sembró en caja durante una noche; a partir de una colonia se generaron pre-inóculos de 50 mL de Terrific Broth con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina que fueron crecidos durante la noche. Se inocularon cultivos de un litro del mismo medio con los pre-inóculos nocturnos y se crecieron a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 1.5.

Las células se cosecharon mediante centrifugación a 6,500 rpm por 15 min, obteniéndose 4 g por litro de cultivo. Se lisaron las células por sonicación en amortiguador de Tris-SO<sub>4</sub> 50 mM, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8; se agregó un cocktail de inhibidores de proteasa (Complete de Roche).

El lisado se incubó a 60 °C durante 30 min y se centrifugó a 35,000 rpm por 30 min. El sobrenadante fue concentrado y adsorbido a la resina DEAE (80 mL) en columna, equilibrada previamente con Tris-SO<sub>4</sub> 50 mM pH 8, 1 mM EDTA (Amortiguador A). El complejo se eluyó con un gradiente discontinuo de 0-500% de NaCl en el mismo amortiguador y se colectaron fracciones de 8 ml. Las fracciones con el complejo se concentraron y precipitaron con sulfato de amonio al 0.75 M. El sobrenadante se cargó en la columna hidrofóbica butyl-Toyopearl (24 x 1.4 cm, 28 cm) equilibrada con Tris-SO<sub>4</sub> 50 mM pH 8, 1 mM EDTA, 0.75 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se eluyó con la disminución de sulfato de amonio (de 0.75 a 0 M a 1 mL/min en 240 min). Posteriormente, las fracciones ricas en GF<sub>1</sub> se concentraron y pasaron a través de la columna de exclusión molecular Superdex 200 (10/300GL, GE lifescience) con 24 mL de volumen de cama, con un flujo de 0.5 mL/min.

## 5.7. Pureza y concentración

La pureza de las proteínas recombinantes se siguió a través de geles nativos con actividad, desnaturalizantes y segunda dimensión. La concentración se determinó con los métodos del ácido Bicinónico y Bradford, usando albúmina sérica bovina como estándar.

## 5.8. Calorimetría de Titulación Isotérmica (CTI)

Se determinaron los parámetros termodinámicos de unión de nucleótidos a la subunidad  $\alpha$ . Para la unión de Mg•ATP/ATP, se determinaron a 20 °C, 25 °C, 30 °C y 35 °C, en el amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8, 250 mM NaCl, 10% glicerol y 5 mM MgCl<sub>2</sub> o 3 mM de EDTA. Las uniones de Mg•ADP/ADP se determinaron solamente a 25 °C. Todas las mediciones fueron realizadas en un calorímetro ITC200 (Malvern, USA), usando un

amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8, 250 mM NaCl y 10% glicerol. También se determinaron parámetros termodinámicos de unión de ADP al núcleo catalítico de *G. kaustophilus* (GF<sub>1</sub>) a 25 °C, en el mismo amortiguador que la subunidad G $\alpha$ -His aislada con 3 mM de EDTA. El calor de dilución de cada inyección fue eliminado mediante un experimento de titulación a la celda de muestra llenada solamente con amortiguador.

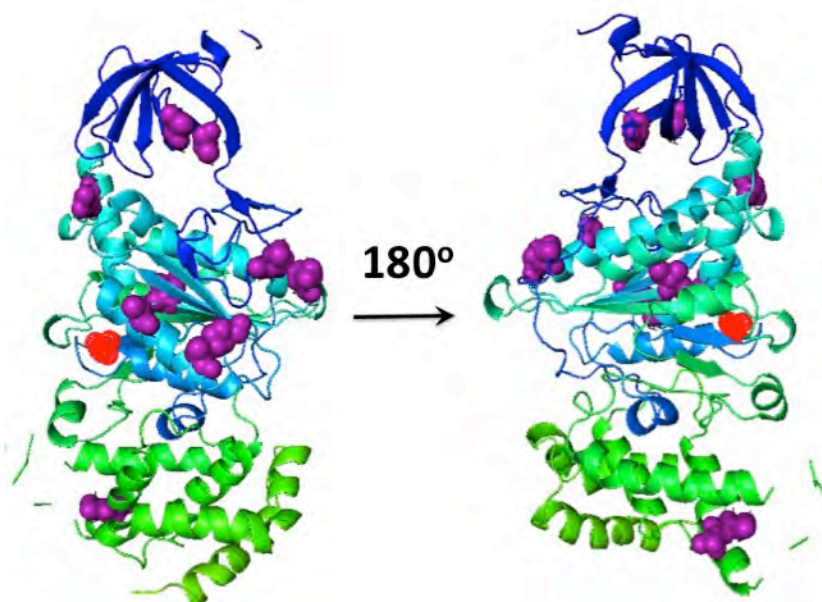
## 6. Resultados

Inicialmente, nuestro propósito fue trabajar con la subunidad  $\alpha$  *Bacillus PS3*, para lo cual se trabajó con un gen sintético clonado en el plásmido pUC57, y otro clonado en el plásmido pTZR18, que fue donado por el laboratorio del Dr. M. Yoshida. Un tercer gen, clonado en los plásmidos pET28 y pET3a, fue obtenido a partir de extraer la secuencia correspondiente del gen que codifica para el núcleo catalítico de TF<sub>1</sub>, con las mutaciones  $\alpha$ Cys<sup>193</sup>Ser,  $\alpha$ Trp<sup>463</sup>Phe, posteriormente mutadas a su aminoácido inicial.<sup>(125)</sup> Se lograron expresar en forma soluble los tres productos polipeptídicos de los tres genes. No obstante, observamos de manera sistemática que las proteínas recombinantes clonadas en los plásmidos pUC57 y pTZR18 tendían a agregarse en solución a concentraciones mayores de 0.6 mg/ml, fenómeno que se acentuaba con la agitación de la muestra y/o con la adición de nucleótidos. En cambio, las proteínas recombinantes provenientes de los plásmidos pET3a y pET28 (sin y con cola de histidinas, respectivamente), mostraron una tendencia mucho menor a la agregación, permitiendo obtener soluciones estables de proteína a concentraciones mayores de 5 mg/ml. Por tanto, estas proteínas fueron elegidas para su caracterización calorimétrica. No obstante, cuando se envió a secuenciar el gen obtenido a partir del núcleo catalítico, se encontró que la secuencia correspondía a la subunidad  $\alpha$  de *G. kaustophilus* (Figura 11).

El género *Geobacillus* fue originalmente identificado como *Bacillus stearothermophilus*. En los últimos 5 años, se ha identificado un número creciente de especies de este género en condiciones similares a las del hábitat de *Bacillus PS3*, por lo que se ha sugerido el renombramiento taxonómico. En este trabajo, optamos por trabajar y renombrar a la subunidad  $\alpha$  de *G. kaustophilus* de acuerdo a la secuencia obtenida en las bases de datos y por el comportamiento de su estabilidad en solución, como se explica en el texto más arriba.<sup>(85, 193)</sup> Las diferencias en 12 posiciones de la secuencia de residuos se encuentran en diferentes zonas de la estructura tridimensional de la proteína (Figura 12), haciendo difícil poder proponer algún modelo de estabilidad asociado al área polar y no polar, como se observa en proteínas termofílicas.

1	NYESQIQVSDVGTVIQVGDGIARAHGLDNVMSGE	VEFAN	VMGMALNLEENN	VGIVILG	60				
18	NYESQIQVSDVGTVIQVGDGIARAHGLDNVMSGE	VEFAN	VMGMALNLEENN	VGIVILG	77				
61	PYTGIKEGDEVRRRTGRIMEVPVGE	LIGRVMNPLGQPV	DGLGPVETTE	TRPIESRAPGVM	120				
78	PYTGIKEGDEVRRRTGRIMEVPVGE	LIGRVMNPLGQPV	DGLGPVETTE	TRPIESRAPGVM	137				
121	DRRSVHEPLQTGIKAIDALVP	IGRGQRELII	IGDRQTGKTSVA	IDTIINQKDQNMIC	180				
138	DRRSVHEPLQTGIKAIDALVP	IGRGQRELII	IGDRQTGKTSVA	IDTIINQKDQNMIC	197				
181	IGQKESTV	TVVETL	KHGA	DYTIIVVTASASQPAPLLFLAPYAGVAMGEYFM	240				
198	IGQKESTV	TVVETL	KHGA	DYTIIVVTASASQPAPLLFLAPYAGVAMGEYFM	257				
241	VV	DDL	SKQAAA	YR	LSLL	RRPP	GREAYPGDIFYLHSRLLERA	AKLSDAKGGGSLTALP	300
258	VV	DDL	SKQAAA	YR	LSLL	RRPP	GREAYPGDIFYLHSRLLERA	AKLSDAKGGGSLTALP	317
301	FVETQAGDISAYIPTNVISITD	GQIFLQSDLFFSGVRPAINAGLSVSRVGGAAQIKAMKK	360						
318	FVETQAGDISAYIPTNVISITD	GQIFLQSDLFFSGVRPAINAGLSVSRVGGAAQIKAMKK	377						
361	VAGTLRLDLAAAYRELEAF	AQFGSDDLKATQA	KL	ARGARTVEVLKQDLHQPIPVEKQVLI	420				
378	VAGTLRLDLAAAYRELEAF	AQFGSDDLKATQA	NV	ARGARTVEVLKQDLHQPIPVEKQVLI	437				
421	YALTRGFLDDIPVEDVRRFEKEF	YLWLDQNGQHLL	EHIRTTKDL	PNEDDLNQAIEAFKKT	480				
438	YALTRGFLDDIPVEDVRRFEKEF	YLWLDQNGQHLL	EHIRTTKDL	PNEDDLNQAIEAFKKT	497				
481	FWWSQ	485							
	FWWSQ								
498	FWWSQ	502							

**Figura 11.** Comparación de las secuencias de *G. kaustophilus* (arriba) y el termófilo *Bacillus PS3* (abajo). La secuencia de en medio es la similitud entre las dos. En rojo se resaltan las diferencias.

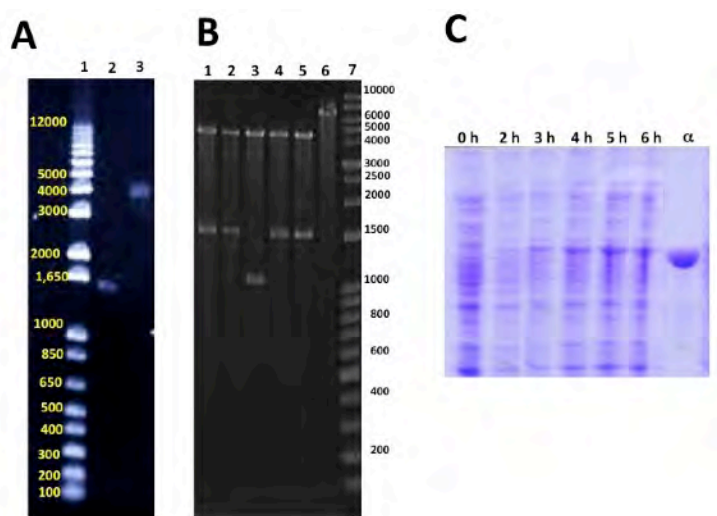


**Figura 12.** Representación esquemática de la estructura tridimensional de la subunidad  $\alpha$  obtenida a partir del pdb: 1SKY para *Bacillus PS3*. Las posiciones que presentan cambios de residuo entre  $G\alpha$  y  $T\alpha$  se muestran en esferas moradas, el sitio catalítico presenta un  $SO_4$ , representado en color rojo.

## 6.1. Clonación y Purificación

### 6.1.1 Clonación de $G\alpha$

El plásmido pET3a con el gen incorporado genera un producto de 6140 pb. Los plásmidos obtenidos de las colonias transformadas con la ligación, se utilizaron para transformar a la cepa de *E. coli* DK8 que tiene eliminado el operón de la ATP sintasa (Figura 13).

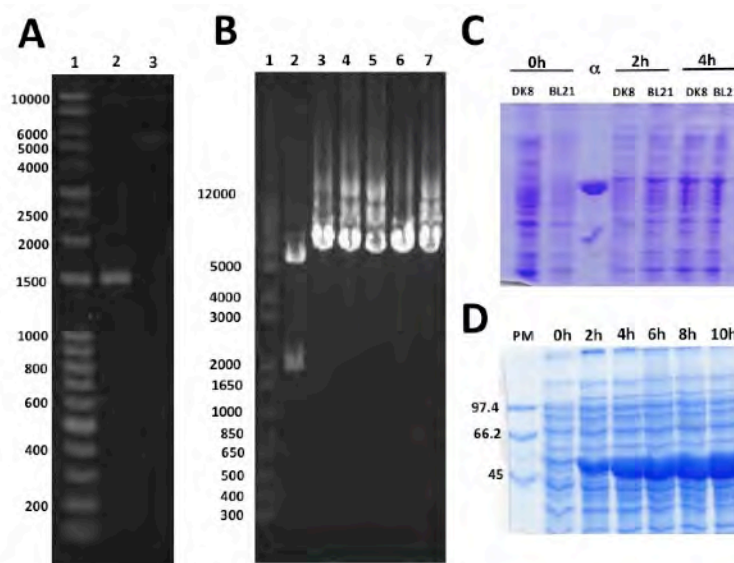


**Figura 13.** Clonación y ensayo de expresión de  $G\alpha$ . **A)** Digestión del gen de  $G\alpha$  amplificado del plásmido pAGB. Carriles 1: Estándar de peso molecular (Thermo Fisher 1 kb plus DNA ladder), 2: DNA Amplificado y digerido del gen de  $\alpha$  con el peso molecular esperado de 1500 pb, 3: Digestión del plásmido pET3a con un peso de 4600 pb. **B)** Digestión del DNA plasmídico obtenido de colonias seleccionada después de la ligación, Carriles 1 a 6: colonias digeridas, las que presentan el gen tienen una banda en 1500 pb y arriba de 4000 correspondiente al plásmido pET3a, Carril 7: Estándar de peso molecular (Fisher BioReagents™ exACTGene™ DNA Ladders), del lado derecho se muestra el peso de cada banda. **C)** Producción de la subunidad  $G\alpha$  en la fracción soluble del lisado celular, muestras tomadas cada 2 h, Carril 7: Estándar de la subunidad  $\alpha$ .

### 6.1.2 Clonación de $G\alpha$ -His

El fragmento del gen ligado dentro de la secuencia de multiclonación adyacente a la secuencia de poli-histidinas en el plásmido pET28 generó un producto de 6869 pb. Los plásmidos obtenidos de las colonias transformadas con la ligación, se utilizaron para

transformar a la cepa de *E. coli* BL21 que mostró tener la mayor producción de proteína (Figura 14).

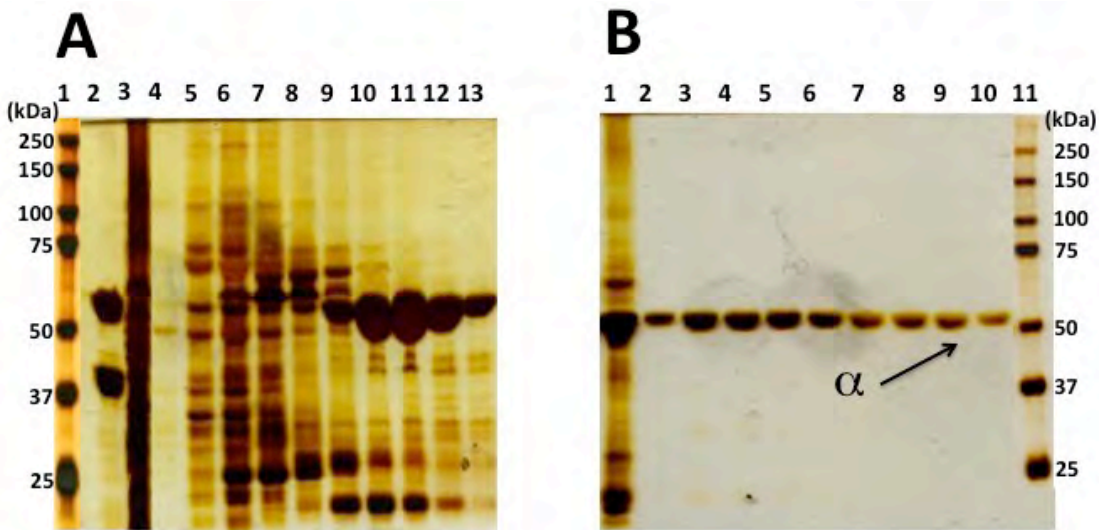


**Figura 14.** Clonación y ensayo de expresión de la subunidad  $\alpha$  con etiqueta de histidinas **A)** Digestión del gen de  $\alpha$ -His amplificado del plásmido pAGB. Carriles 1: Estándar de peso molecular (Fisher BioReagents™ exACTGene™ DNA Ladders), 2: DNA Amplificado y digerido del gen de  $\alpha$  con el peso molecular esperado de 1500 pb, 3: Digestión del plásmido pET28 con un peso aproximado de 5370 pb. **B)** Digestión del DNA plasmídico obtenido de colonias seleccionada después de la ligación. Carril 1: Estándar de peso molecular (Thermo Fisher 1 kb plus DNA ladder), del lado izquierdo se muestra el peso de cada banda. Carriles 2 a 7: colonias digeridas, las que presentan el gen tienen una banda en 1500 pb y arriba de 5000 correspondiente al plásmido pET28. **C)** Sobreexpresión de la subunidad  $\alpha$  en la fracción soluble del lisado celular de DK8 y BL21. Las muestras tomadas antes y después de la inducción, en las horas indicadas muestran la expresión de una banda con el mismo peso molecular que el estándar de la subunidad  $\alpha$  (carril 3). **D)** Producción de proteína en la cepa BL1. Los carriles muestran el contenido de proteínas de las muestras tomadas a la hora indicada antes (0 h) y después de la inducción. Carril 1: marcador de peso molecular (Bio Rad low range protein estándar).

### 6.1.3 Purificación de Ga-His

La proteína  $\alpha$ -His presente en el sobrenadante de células BL21 lisadas y centrifugadas que se unió a la columna de Ni-NTA es eluida en un intervalo de 250-400 mM de imidazol (Figura 15A). Posteriormente las fracciones de  $\alpha$ -His obtenidas de la columna Ni-NTA se concentraron y cargaron en la columna Mono-Q. La elución de esta columna muestra que la proteína se encuentra pura (Figura 15B). Las fracciones obtenidas con los dos pasos cromatográficos se concentraron y dializaron contra Tris-HCl 50 mM, 250 mM NaCl, 10% glicerol, pH 8 y, dependiendo de los experimentos, en presencia de 5 mM de  $\text{MgCl}_2$  o de 3 mM EDTA.





**Figura 15.** Geles SDS-Page (12%) teñidos con plata de la purificación de la subunidad  $\alpha$ -His. **A)** Cromatografía de afinidad Ni-NTA. Carriles: 1, Marcador de Peso molecular (Kaleidoscopic, BioRad), 2, Estándar de  $\alpha$  (banda superior; obtenido en purificación previa), 2, Lisado celular, 3, Lavado de la columna, 4 a 13, Fracciones obtenidas con concentraciones crecientes de imidazol. La banda correspondiente a  $\alpha$  se observa muy concentrada en los carriles 9 a 13. **B)** Cromatografía de intercambio aniónico Mono Q. Carriles: 1, fracciones de Ni-NTA conjuntas y cargadas a la columna de resina Mono Q, 2 a 10, fracciones de mono Q que presentan la subunidad  $\alpha$ , a concentraciones crecientes de sal, 11, Marcador de peso molecular

#### 6.1.4 Caracterización de la subunidad $\alpha$ por espectrometría de masas

La identificación de péptidos por espectrometría de masas realizada usando la base de datos Mascot coincidió con la subunidad  $\alpha$  de la  $F_0F_1$  ATP sintasa de *G. kaustophilus*, con una cobertura de secuencia de 60% (Figura 16). De acuerdo con su secuencia primaria, ésta presenta una masa molecular de 54,808 Da y un punto isoeléctrico de 5.48, similar al punto isoeléctrico teórico de 5.59.

```

1 MSIRAEIISA LIKQQIENYE SGIQVSDVGT VIQVGDGIAR AHGLDNVMSG
51 ELVEFANGVM GMALNLEENN VGIVILGPYT GIKEGDEVRR TGRIMEVPVG
101 EALIGRVVNP LGQPVDGLGP VETTETRPTE SPAPGVMDRR SVHEPLQTGI
151 KALDALVPIG RGQRELIIGD RQTGKTSVAI DTIINQKDQN MICIYVAIGQ
201 KESTVTRVVE TLRKHGALDY TIVVTASASQ PAPLLFLAPY AGVAMGEYFM
251 YKGQHVLVVY DDLSKQAAAY RELSLLLRP PGREAYPGDI FYLHSRLLER
301 AAKLSDAKGG GSLTALPFVE TQAGDISAYI PTNVISITDG QIFLQSDLFF
351 SGVRPAINAG LSVSRVGGAA QIKAMKKVAG TLRDLAAYR ELEAFAQFGS
401 DLKATQAKL ARGARTVEVL KQDLHQPIPV EKQVLIITYAL TRGFLLDDIPV
451 EDVRRFEKEF YLWLDQNGQH LLEHIRTTKD LPNEDDLNKA IEAFKKTFFV
501 SQ

```

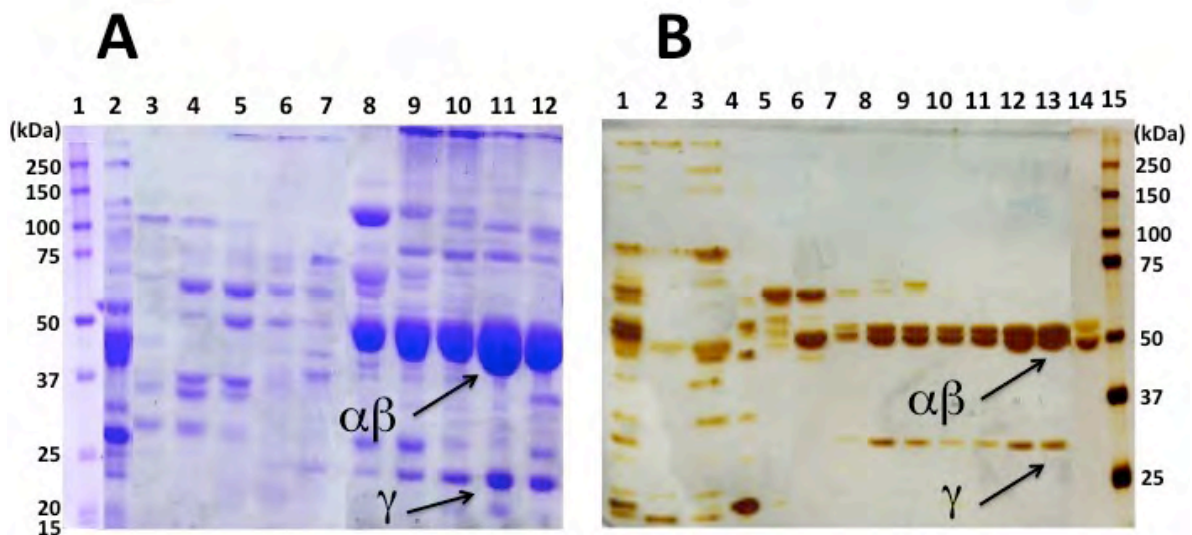
**Figura 16.** Cobertura de los péptidos (en rojo) determinados por masas para la secuencia de la subunidad  $\alpha$  de *Geobacillus kaustophilus*



### 6.1.5 Purificación del complejo GF<sub>1</sub> ( $\alpha_3\beta_3\gamma$ )

Para la expresión del complejo GF<sub>1</sub>, se usó la cepa DK8 transformada con el plásmido pAGB, donado también por el Dr. Yoshida. Sin embargo, después de la inducción en medio LB, no se observó ningún indicio de producción de proteína recombinante. Por el contrario, se observó que el crecimiento bacteriano se veía disminuido, lo cual pudo deberse a la falta de los genes de la ATP sintasa en la cepa DK8, permitiendo que el complejo recombinante expresado, que presenta la capacidad de hidrolizar ATP, disminuyera los niveles de éstos hasta la inanición en la bacteria, como se había observado anteriormente.<sup>(125, 126)</sup>

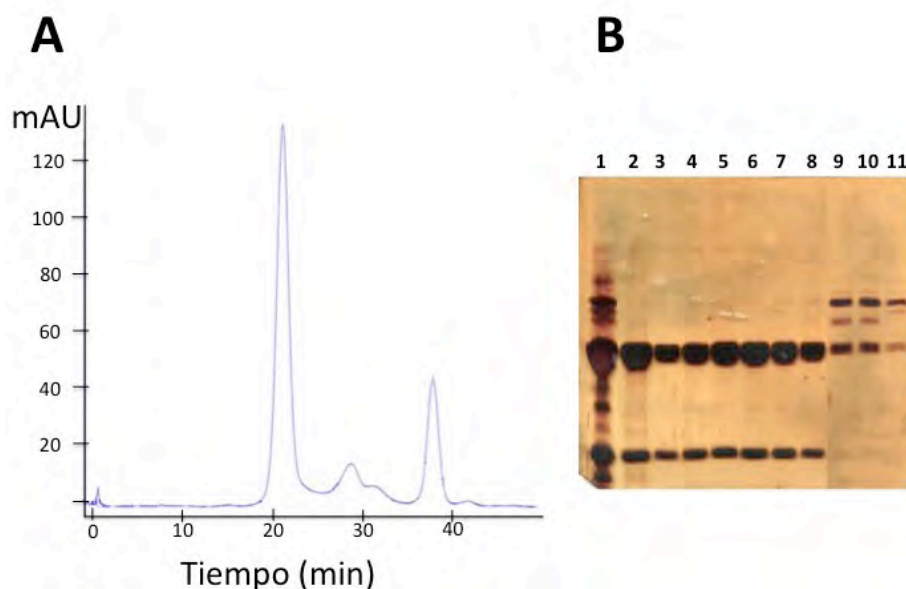
Se obtuvo una inducción adecuada en medio Terrific. El sobrenadante del lisado fue calentado a 60 °C por 30 min, para eliminar térmicamente las proteínas propias de *E. coli*.<sup>(125)</sup> La fracción soluble de la centrifugación cargada y eluida en la columna de intercambio aniónico DEAE. Se observó que el paso de calentamiento ayuda a obtener un extracto con menores impurezas. Un gradiente discontinuo (con una mayor pendiente entre 300 y 500 mM de NaCl, permitió concentrar y limpiar las fracciones de GF<sub>1</sub>. (Figura 17).



**Figura 17.** Geles SDS de poliacrilamida al 10% de la Purificación de GF<sub>1</sub>. **A)** Cromatografía de intercambio aniónico DEAE con gradiente escalonado. Carriles: 1, marcador de peso molecular (kaleidoscopic BioRad), 2, carga, 2-6, fracciones con concentraciones de sal menores a 300mM, 7, estándar de GF<sub>1</sub>, 8-12 fracciones con concentraciones de sal de 300mM a 500mM. **B)** Cromatografía de intercambio hidrofóbico Butil-Tyoppearl. Carriles: 1, carga de fracciones concentradas de DEAE, 2, lavado, 3-6, Fracciones con 4% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 7-14, fracciones con 0% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Se señalan las bandas correspondientes a  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ .

Las fracciones obtenidas en DEAE se cargaron y eluyeron en la columna butil-Tyoppearl. El uso de un gradiente escalonado de 0.75 M a 0 M de sulfato de amonio, con

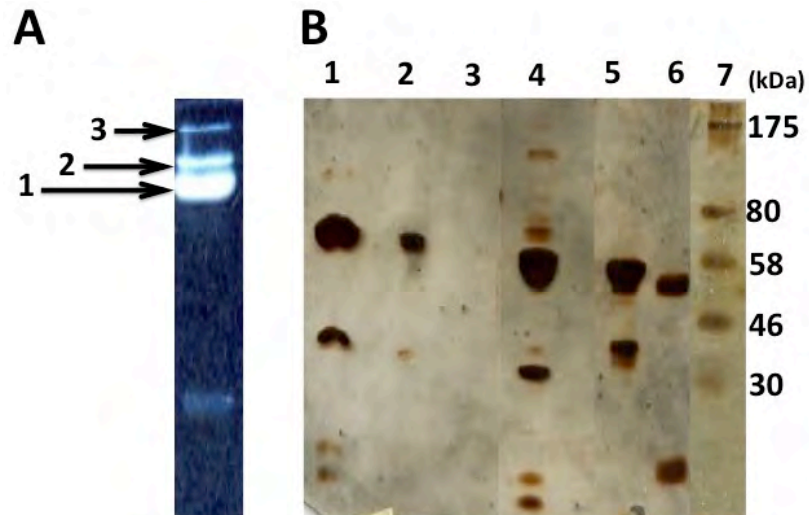
una pendiente menor de 0.075 M a 0 M de sal, permite obtener fracciones puras (Figura 17B). La elución del complejo se lleva a cabo con un 0 % de sulfato de amonio. Las fracciones no puras y ricas en GF<sub>1</sub> se concentraron por separado hasta 500 µL y pasaron por cromatografía de exclusión molecular en la columna Superdex 200 (Figura 18).



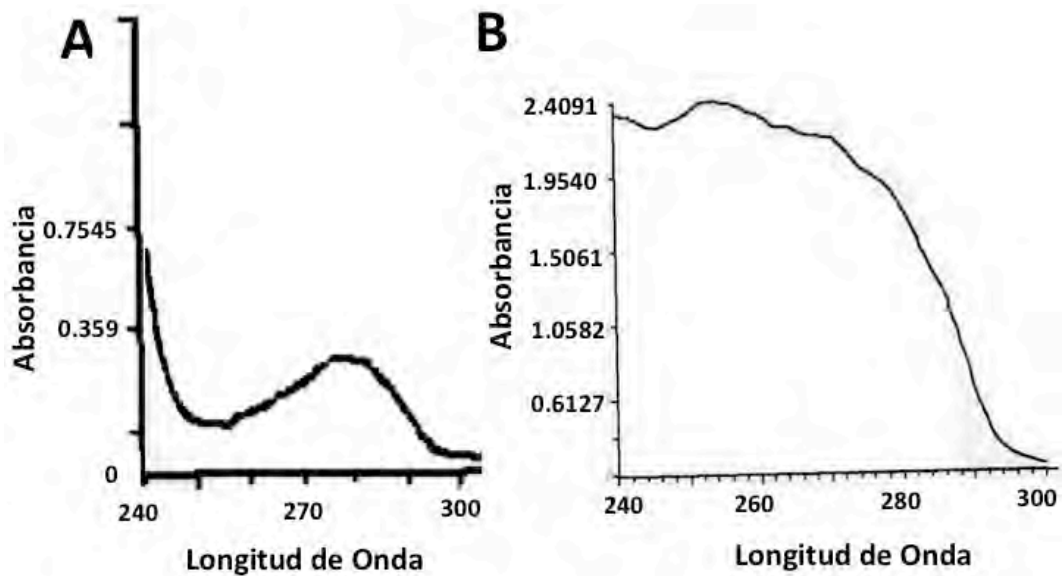
**Figura 18.** Cromatograma de exclusión molecular Superdex 200 de GF<sub>1</sub>. Flujo de 0.5 mL por min **A)** Cromatograma de elución con respecto al tiempo. **B)** Gel SDS-Page (10%) de la cromatografía de exclusión molecular. Carriles: 1, carga, 2-8 fracciones que corresponden al primer pico en un tiempo de elución de 20 min, 9-10, fracciones del pico de elución de 30 min, 11, fracción del pico de elución de 38 min. Las fracciones de GF<sub>1</sub> pura se observan en el pico de 20 min.

Al finalizar los tres pasos de purificación por cromatografía, el rendimiento fue de 6 mg/mL por cada 8 gramos de células (2 litros de medio de cultivo). A las muestras que presentan el complejo se les determinó actividad en geles nativos mediante la precipitación de fosfato de plomo (Figura 19A). Las bandas con actividad se corrieron en una segunda dimensión en gel desnaturizante, observándose la presencia de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Figura 19B).

El contenido de nucleótido se determinó por el método descrito por Warburg and Christian a partir de la relación entre la absorbencia 280 nm/260 nm con valores menores o iguales a 1.7, El aumento de la relación indica presencia de nucleótidos, en mitocondria se han determinado valores de 1.3 (Figura 20).<sup>(73)</sup>



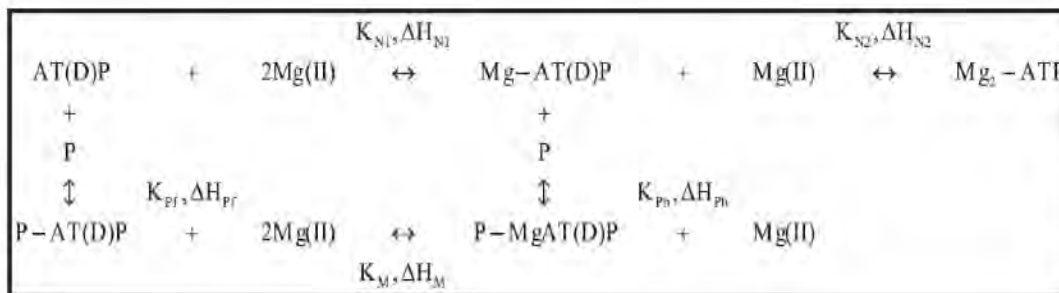
**Figura 19.** Actividad de GF<sub>1</sub> observada en gel y segunda dimensión. **A)** Gel nativo de poliacrilamida al 8% teñido por actividad de hidrólisis de ATP. **B)** Segunda dimensión del gel de actividad. Los carriles 1 a 3 corresponden a las bandas señaladas en el gel de actividad. Estándares de GF<sub>1</sub> (4), subunidad  $\alpha$  (5) y subunidad  $\beta$  (6).



**Figura 20.** Espectro de absorción de G $\alpha$  antes (A) y después (B) de un experimento de CTI. Se observa que el pico correspondiente a 280 nm en el panel A, es ocultado por la absorbancia del nucleótido (relación 260/280 en A = 0.103 y en B = 1.092)

## 6.2. Calorimetría de Titulación Isotérmica (CTI) para la subunidad Gα-His aislada

En este estudio se caracterizaron las firmas termodinámicas de unión de los nucleótidos Mg•ATP/ATP y Mg•ADP/ADP a la subunidad Gα-His, que presentó una menor tendencia a agregarse comparada con la subunidad α de Bacillus PS3. Los parámetros para la unión de Gα-Mg•ATP/ATP, se determinaron en función de la temperatura, mientras que para la unión de Gα-Mg•ADP/ADP se determinaron solamente a 25 °C. Las isotermas en ausencia del metal se ajustaron a un solo sitio de unión independiente fijando la estequiometría a 1 con el fin de obtener convergencia en el análisis (ecuaciones 7 y 8, Figura 21A). Las isotermas de unión obtenidas en presencia de Mg(II) (Figura 21B) fueron analizadas usando un modelo de polinomiales de unión para un equilibrio ternario (Esquema 1), similarmente a lo realizado en estudios previos para la subunidad β.<sup>(158)</sup> La consideración de este equilibrio es necesaria con el fin de describir correctamente la interacción de la proteína con los nucleótidos en presencia del metal. El esquema considera que el AT(D)P puede unir un magnesio (MgAT(D)P), mientras que el ATP puede asociarse a dos magnesios (Mg<sub>2</sub>ATP), y la subunidad α (P) puede unir AT(D)P o MgAT(D)P.



**Esquema 1.** Equilibrio de unión ternario entre la subunidad α (P), Mg (II) y AT(D)P . La habilidad del ATP para formar un complejo bidentado con el Mg(II) también se indica.

Las constantes de unión  $K_{N1}$  y  $K_{N2}$  representan las constantes de la asociación secuencial de Mg(II) al AT(D)P y Mg(II)<sub>2</sub> al ATP.  $K_{pf}$  y  $K_{pb}$  son las constantes de asociación para la unión de ATP y Mg-ATP a la subunidad Gα-His, y  $K_M$  es la constante de asociación de Mg(II) a Gα-AT(D)P. El efecto de calor asociado con cada inyección,  $q_i$  (ecuación 8), puede ser calculado a través del cambio en la concentración de cada complejo después

de cada inyección calorimétrica y su cambio de entalpía asociado para la formación de complejo:

$$\begin{aligned}
q_i = V_0 & \left\{ \left( [P \cdot ATP]_i - [P \cdot ATP]_{i-1} \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right) \right) \cdot \Delta H_{pf} \right. \\
& + \left( [P \cdot MgATP]_i - [P \cdot MgATP]_{i-1} \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right) \right) (\Delta H_{pb} + \Delta H_{N1}) \\
& + \left( [MgATP]_i - [MgATP]_{i-1} \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right) - F_{MgATP} [ATP]_0 \frac{v}{V_0} \right) \Delta H_{N1} \\
& \left. + \left( [Mg_2ATP]_i - [Mg_2ATP]_{i-1} \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right) - F_{Mg_2ATP} (ATP)_0 \frac{v}{V_0} \right) (\Delta H_{N1} + \Delta H_{N2}) \right\} + q_{dil}
\end{aligned} \tag{9}$$

donde  $\Delta H_{pf}$  y  $\Delta H_{pb}$  son los cambios de entalpía asociados con la unión de ATP y MgATP a la subunidad  $\alpha$ , respectivamente;  $\Delta H_{N1}$  y  $\Delta H_{N2}$  son el cambio de entalpía asociado con la unión de primer y segundo Mg(II) al ATP, respectivamente, y  $q_{dil}$  es un término de ajuste introducido para considerar el efecto del calor de dilución no corregido experimentalmente. El modelo incluye a  $F_{MgATP}$  y  $F_{Mg_2ATP}$  que corresponden a las fracciones de ATP en forma de MgATP y Mg<sub>2</sub>ATP introducidas en la celda solo por la inyección y no por un balance del equilibrio. La concentración de cada especie está dada por el correspondiente balance de masas, que depende de las constantes de equilibrio en cada paso del ciclo:

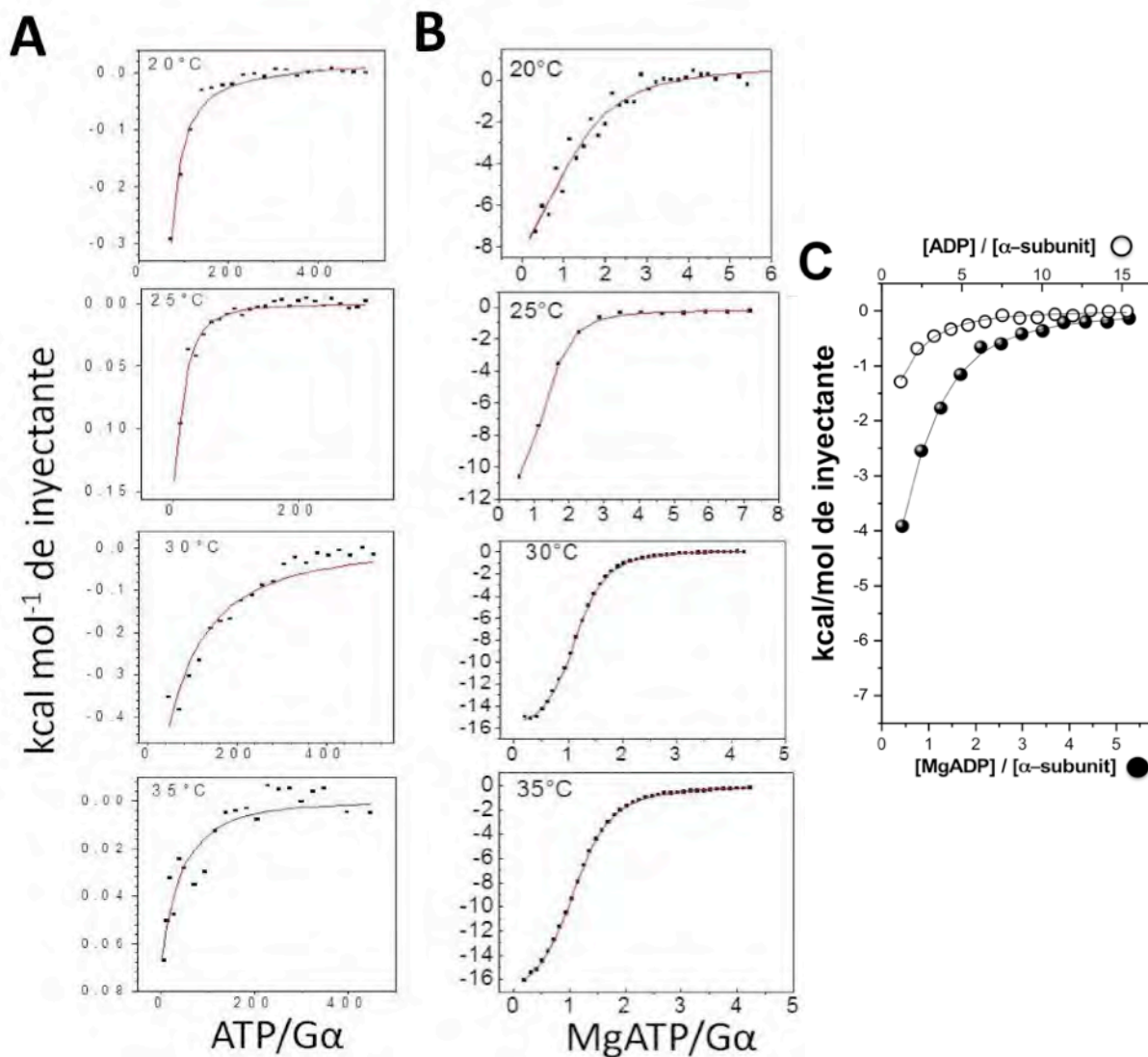
$$\begin{aligned}
[ATP]_T &= [ATP] + K_{N1} [ATP] [Mg(II)] + K_{N1} K_{N2} [ATP] [Mg(II)]^2 + K_{pf} [P] [ATP] + K_{pb} K_{N1} [P] [ATP] [Mg(II)] \\
[Mg]_T &= [ATP] + K_{N1} [ATP] [Mg(II)] + 2K_{N1} K_{N2} [ATP] [Mg(II)]^2 + K_{pb} K_{N1} [P] [ATP] [Mg(II)] \\
[P]_T &= [P] + K_{pf} [P] [ATP] + K_{pb} K_{N1} [P] [ATP] [Mg(II)]
\end{aligned} \tag{10}$$

Como un primer paso para resolver el equilibrio complejo descrito en el Esquema 1, se realizaron caracterizaciones directas de la interacción de la subunidad  $\alpha$  con nucleótidos libres de Mg(II) (Figura 21A). Por otro lado, los parámetros de interacción de nucleótidos de adenosina con Mg(II) fueron reportados previamente por nuestro grupo de trabajo.<sup>(152, 158)</sup> Este conjunto de datos fue alimentado al modelo descrito por las ecuaciones 9 y 10, con el fin de resolver de manera robusta los parámetros para la interacción de la subunidad con el nucleótido previamente unido al ion metálico (Figura 21B).

## 6.2.1 Afinidad de los complejos Ga-ATP y Ga-MgATP

La Tabla 4 resume el conjunto de resultados obtenidos para la formación de los diferentes complejos caracterizados calorimétricamente. Los ajustes muestran que la afinidad para los nucleótidos con magnesio es grande, con valores de  $K_d$  entre  $1 \mu\text{M}$  y  $15 \mu\text{M}$  para MgATP a las diferentes temperaturas y de  $16 \mu\text{M}$  para MgADP a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . En particular, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  la diferencia entre no presentar el metal y sí presentarlo es de un aumento de 300 veces en la constante de disociación del nucleótido trifosfato. Para el nucleótido difosfato, se observa el mismo comportamiento, aunque la diferencia por presentar el metal es solamente de 2 veces a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Los valores de afinidad hacia los nucleótidos por parte de la subunidad  $\alpha$  determinados anteriormente por espectrofotometría son en general similares a los determinados en el presente estudio por calorimetría.<sup>(137, 145, 173)</sup> Sin embargo, para la subunidad  $\alpha$  de *E. coli* se reportó una afinidad 5 veces mayor por MgATP y una pérdida de afinidad mucho menor por la substracción del metal (Tabla 5). Estas diferencias se pueden deber a varios factores entre los que están el organismo del que proviene la subunidad y las condiciones experimentales. La subunidad de *E. coli* muestra diferencias en el comportamiento de las subunidades  $\alpha$  en la regulación de  $F_0F_1$ , asociadas en la velocidad de recambio de nucleótidos unidos a esta subunidad y que podrían estar asociadas a diferencias en la afinidad. La diferencia experimental más clara es la temperatura: los experimentos con la subunidad  $\alpha$  de *E. coli* se llevaron a cabo a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatura similar a la que se encuentra el organismo, mientras que los experimentos llevados a cabo en este estudio está a más de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  debajo de la temperatura en la que habita *G. kaustophilus* ( $>80 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Es claro que  $G\alpha$  presenta afinidades por ATP que se encuentra en el orden de las centenas de  $\mu\text{M}$ , observándose por tanto en las isotermas de unión calores muy pequeños y similares a la dilución del ligando. Para el MgADP la diferencia es menor, con valores 4 veces más afín para *E. coli* y con valores para la unión de ADP en el mismo intervalo de concentración.



**Figura 21.** CTI de unión de nucleótidos en ausencia y presencia de magnesio a la subunidad  $\alpha$ . **A)** Isothermas de unión de nucleótido sin magnesio a la subunidad  $\alpha$  en función de la temperatura. **B)** Isothermas de unión de MgATP a la subunidad  $\alpha$  en función de la temperatura. **C)** Isothermas de unión para ADP sin Mg a la subunidad  $\alpha$  (círculos vacíos) y MgADP (círculos llenos) a 25°C. La unión de nucleótido con el metal se determinó en amortiguador Tris-HCl 50mM, pH 8, 250mM NaCl, 10% glicerol y 5mM MgCl<sub>2</sub>. Para el nucleótido en ausencia del metal se utilizó el mismo amortiguador, pero se le agregó 3mM de EDTA y no se agregó el metal. La línea continua para A es el ajuste a un solo sitio de unión para el complejo  $\alpha$ -ATP. La línea continua en B y C es el ajuste generado por el modelo del esquema 1 para los complejos  $\alpha$ -MgATP o  $\alpha$ -MgADP.

**Tabla 4.** Energética de unión de la subunidad G $\alpha$  con nucleótidos de adenosina en presencia y ausencia de Mg(II) determinados mediante ITC.<sup>a, c</sup>

Temperatura (°C)	K <sub>b</sub> <sup>a</sup> x 10 <sup>-3</sup> (M <sup>-1</sup> )	K <sub>d</sub> ( $\mu$ M)	$\Delta$ G <sub>b</sub> (kcal/mol)	$\Delta$ H <sub>b</sub> (kcal/mol)	-T $\Delta$ S <sub>b</sub> (kcal/mol)
<b><math>\alpha</math>-MgATP</b>					
20	303 $\pm$ 58	3.3	-7.4	-12.3 $\pm$ 0.7	4.9
25	616 $\pm$ 13	1.6	-7.9	-12.1 $\pm$ 0.4	4.2
30	220 $\pm$ 30	4.5	-7.4	-12.3 $\pm$ 0.8	4.9
35	79 $\pm$ 18	12.6	-6.9	-11.9 $\pm$ 0.7	5.0
<b><math>\alpha</math>-ATP</b>					
20	2.6 $\pm$ 0.3	380	-4.6	-4.6	0
25	1.8 $\pm$ 0.1	550	-4.5	-4.5	0
30	2.0 $\pm$ 0.5	500	-4.6	-4.5	0.1
35	1.9 $\pm$ 0.7	526	-4.6	-4.4	0.2
<b><math>\alpha</math>-MgADP</b>					
25	62 $\pm$ 16	16	-6.5	-6.4 $\pm$ 0.2	-0.1
<b><math>\alpha</math>-ADP</b>					
25	27 $\pm$ 2	37	-6.1	-4.6 $\pm$ 0.2	-0.5

<sup>a</sup> Condiciones experimentales: Solución de amortiguador 0.05 M Tris-HCl suplementado con 0.1 M NaCl y 10% glicerol (pH 8.0).

<sup>b</sup> En la presencia de Mg(II), se obtuvo un promedio de estequiometría de unión ajustada de 0.9  $\pm$  0.1. En ausencia del ion metálico la estequiometría fue fijada a 1 para obtener mayor convergencia en el ajuste.

<sup>c</sup> K<sub>b</sub> corresponde a K<sub>PF</sub> o K<sub>Pb</sub> en el esquema 1 para la unión de Mg(II)-libre o Mg(II)-unido a nucleótido a la subunidad, respectivamente.



**Tabla 5.** Comparación de las constantes de disociación de nucleótidos ( $K_d$ ) de la subunidad  $\alpha$  aislada.

Nucleótido	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )				
	$G\alpha^a$	$T\alpha^b$	$T\alpha^d$	$E\alpha^e$	
MgADP	16	18	20 <sup>c</sup>	11	4.4
MgATP	1.6	10	24 <sup>c</sup>	9	0.3
ADP	36	120	27 <sup>c</sup>	ND <sup>f</sup>	14.1
ATP	567	18	74 <sup>c</sup>	ND <sup>f</sup>	1.2

<sup>a</sup> Este trabajo, <sup>b</sup> *Bacillus PS3*. Valores de Ohta *et al*, (1980), <sup>c</sup> Bandyopadhyay *et al*, (2002), tomados a partir de la  $K_{d3}$  para cada nucleótido <sup>d</sup> Valores de Miyauchi *et al*, (1995), <sup>e</sup> *E. coli*. Valores de Senior *et al*, (2006), <sup>f</sup> No determinado

## 6.2.2 Termodinámica de unión complejos Ga-ATP y Ga-MgATP

La firma termodinámica para la unión a diferentes temperaturas de nucleótidos a la subunidad  $\alpha$  está dirigida entálpicamente, siendo este componente tres veces más favorable para la unión de MgATP en comparación al nucleótido sin el metal. También se observan cambios entrópicos significativos afectados por el metal. La unión de ATP es casi isoentrópica y en presencia del metal se observa una entropía desfavorable. Como resultado de la compensación entalpía-entropía, los cambios en la energía libre de Gibbs se asocian a cambios de afinidad por el nucleótido en presencia del Mg(II) de concentraciones milimolar a micromolar. Tanto la entalpía como la entropía de la formación de los complejos entre  $G\alpha$  con MgATP y ATP fueron prácticamente independientes de la temperatura, indicando un cambio de capacidad calorífica marginal.

### 6.3. Diferencias en la energética de unión entre la subunidad no catalítica ( $G\alpha$ ) y la subunidad catalítica ( $T\beta$ )

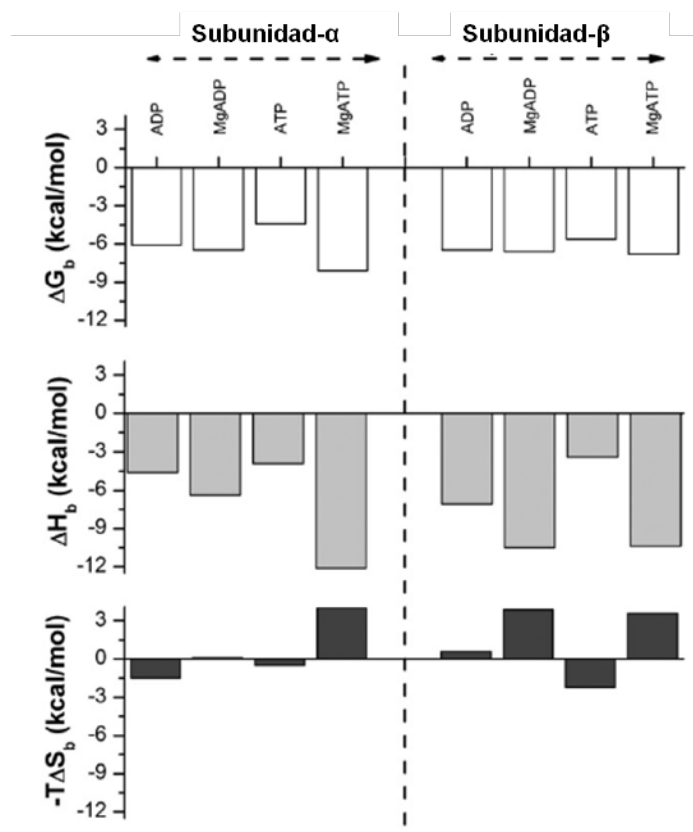
La Figura 22 muestra de manera comparativa las firmas termodinámicas de unión de nucleótidos de las subunidades  $G\alpha$  y  $T\beta$  a 25 °C. Los datos para la subunidad catalítica fueron reportados previamente por nuestro grupo de trabajo.<sup>(152, 158)</sup> Como se puede observar, las dos subunidades tienen firmas termodinámicas similares, aunque no idénticas, con el componente entálpico siendo mayoritario en la formación de los distintos complejos. El metal presenta un mayor efecto sobre el nucleótido trifosfato, con un aumento en la contribución entálpica favorable de 7.6 kcal mol<sup>-1</sup>, asociado a una ganancia en la fuerza de interacción.

La subunidad  $G\alpha$  posee una mayor afinidad al MgATP, mientras que  $G\alpha$  y  $T\beta$  unen con similar fuerza al MgADP. El ion magnesio aumenta la afinidad entre el ATP y la subunidad  $\alpha$  en alrededor 300 veces, en tanto que el incremento es de tan solo 8 veces con la subunidad  $\beta$ .

Entrópicamente, el metal es desfavorable para la unión de la subunidad a los dos nucleótidos, mientras que la unión se favorece en su ausencia. La unión de MgADP a  $\alpha$  tiene un  $\Delta S_u$  marginal, que podría asociarse a un cambio conformacional mínimo al unir este nucleótido. La unión a MgATP es el único que genera una entropía desfavorable significativa ( $T\Delta S_u = -4.2$  kcal mol<sup>-1</sup>) en la subunidad  $\alpha$ , que podría asociarse a una pérdida de flexibilidad conformacional. Para la subunidad catalítica  $\beta$ , tanto la unión de MgADP como MgATP generan cambios entrópicos desfavorables. Para los casos de entropía favorable ( $\alpha$ -ATP/ADP y  $\beta$ -ATP), intuitivamente se puede considerar que la mayor contribución proviene de las moléculas de agua liberadas de los nucleótidos polares que le ganan a la contribución negativa de formar el complejo. Para las uniones con contribuciones desfavorables de entropía ( $\alpha$ -MgATP y  $\beta$ -ADP/MgADP/MgATP) se puede asociar a las restricciones conformacionales de las subunidades y del nucleótido al acomplejarse, restricciones que no podrían ser contrarrestadas por la ganancia de entropía de la liberación de moléculas de agua.

La mayor capacidad de la subunidad  $\alpha$  para unir MgATP podría estar relacionada con su capacidad regulatoria, estando su sitio optimizado para reconocer al nucleótido

como ligando. En cambio, la subunidad  $\beta$  puede unir MgATP y MgADP con la misma afinidad, lo que puede estar asociado a la reversibilidad catalítica de hidrólisis de ATP y de síntesis de éste a partir de ADP. Por lo tanto, el sitio de la subunidad catalítica estaría optimizado para estabilizar al estado de transición de la reacción, mostrando menor afinidad por los sustratos. Otro dato importante es la afinidad similar para MgADP y ADP, que correlaciona con los datos de Bulygin *et al*, (2007) en donde la  $\beta$  no muestra preferencia por este nucleótido en presencia o ausencia de metal.



**Figura 22.** Firmas termodinámicas de unión de nucleótidos a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  aisladas a 25 °C y pH 8.0.

#### 6.4. Influencia del Mg(II) en el reconocimiento de nucleótidos

El efecto del magnesio en las diferencias de la unión de nucleótidos por parte de las dos subunidades es importante. Para conocer más acerca de este efecto, se procedió a calcular los parámetros termodinámicos para la cooperatividad de unión dirigida por la presencia del metal, utilizando el equilibrio ternario representado en el Esquema 1.

La cooperatividad intermolecular ocurre cuando más de dos moléculas se unen en un mismo evento de asociación, afectando mutuamente la interacción entre ellas. Por tanto, desde un punto de vista formal la interacción entre la subunidad  $\alpha$ , el ATP y Mg(II) puede ser descrita a través de parámetros homotrópicos y heterotrópicos de cooperatividad. Si se toma como referencia al ATP, este sistema representa un ejemplo de acoplamiento de la interacción homotrópica, en la que la asociación del segundo Mg(II) es afectada por la presencia del primer ion metálico. Esta cooperatividad no presenta ningún papel directo en la formación del complejo subunidad  $\alpha$ -MgATP, ya que la proteína no reconoce al complejo Mg<sub>2</sub>ATP. No obstante, la consideración explícita de este último complejo es necesaria para corregir los efectos debidos a cambios de concentración que se dan por la disminución de MgATP libre secuestrado en la interacción con la subunidad  $\alpha$ . Por otro lado, considerando la posibilidad de que el ATP puede unir a la subunidad  $\alpha$  y al Mg(II) simultánea o independientemente, se presenta un sistema de cooperatividad heterotrópica. De esta manera, es posible derivar parámetros de cooperatividad que describan cuantitativamente el efecto del ion metálico en el reconocimiento del nucleótido por parte de la subunidad  $\alpha$ . Los parámetros de cooperatividad  **$k$** ,  **$\Delta h$** ,  **$\Delta s$**  y  **$\Delta g$** , (ecuaciones 10-12) se pueden calcular de los parámetros termodinámicos de la unión de nucleótidos a la subunidad <sup>(158)</sup> (Tabla 6):

$$\kappa = \frac{K_{Pb}}{K_{Pf}} = \frac{K_M}{K_{N1}} \quad (10)$$

$$\Delta h = \Delta H_{Pb} - \Delta H_{Pf} = \Delta H_M - \Delta H_{N1} \quad (11)$$

$$T\Delta s = \Delta h - \Delta g = \Delta h + RT \ln(\kappa) \quad (12)$$

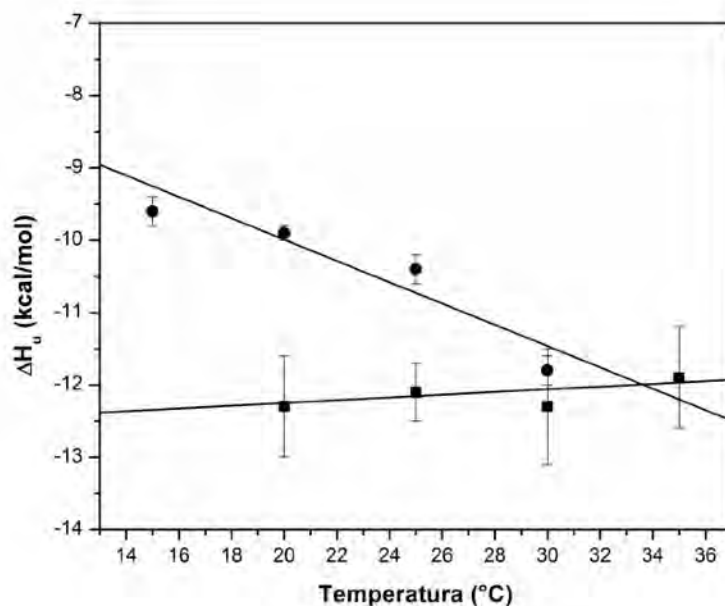
Como se hizo notar previamente, las dos subunidades presentan una fuerte dependencia del Mg(II) para unir ATP. Sin embargo,  **$k$**  para la subunidad  $\alpha$  es de 300, mientras que para la subunidad  $\beta$  es de 8. Esta diferencia se debe en parte al cambio más grande en  **$\Delta h$**  para la subunidad  $\alpha$ , parámetro en el que se observa la mayor contribución a la cooperatividad. El cambio de entalpía está asociado a la energía de interacción directa entre las moléculas que forman el complejo, lo cual implica que la presencia del magnesio genera mayor número de enlaces y/o de mayor energía. No obstante, la mayor diferencia de cooperatividad entre las dos subunidades está reflejada en el componente  **$\Delta s$** , siendo más desfavorable en el caso de la subunidad  $\beta$ , sugiriendo que esta subunidad se rigidiza más que la subunidad  $\alpha$  en presencia del metal.

**Tabla 6.** Cooperatividad de unión para la interacción heterotrópica del Mg(II) y los nucleótidos con las subunidades aisladas  $\alpha$  y  $\beta$  a 25 °C.

	$K$	$\Delta g$ (kcal/mol)	$\Delta h$ (kcal/mol)	$T\Delta s$ (kcal/mol)
$\alpha$ -MgADP	2	-0.5	-1.8	1.3
$\alpha$ -MgATP	308	-3.4	-7.6	-3.4
$\beta$ -MgADP	1	-0.1	-3.4	-3.3
$\beta$ -MgATP	8	-1.2	-7.0	-5.8

## 6.5. Cambio conformacional de la subunidad $\alpha$ al unir MgATP

El cambio en la capacidad calorífica resulta ser un parámetro altamente sensible a la reorganización del solvente alrededor de la proteína y el ligando. El cambio en la solvatación de grupos polares y apolares determina de manera mayoritaria el valor del  $\Delta C_p$ , funcionando por tanto como un sensor de los cambios conformacionales que acompañan la reacción. A partir del análisis de regresión lineal de la dependencia térmica de la entalpía  $\Delta H_u$  ( $\Delta C_{p_u} = \partial \Delta H_u / \partial T$ ), se determinó el valor de capacidad calorífica para la interacción de la subunidad  $\alpha$  con MgATP (Figura 23). El valor determinado para la unión  $G\alpha$ -MgATP es de  $20 \pm 15$  cal mol<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup>, el cual contrasta con el valor grande y negativo reportado para la subunidad  $\beta$  ( $\Delta C_{p_u} = -150 \pm 20$  cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>). Los incrementos positivos en  $\Delta C_p$  no son comunes de observar en el proceso de formación de complejos de proteína, y típicamente se han racionalizado en términos de interacciones mayoritariamente polares.<sup>(36)</sup>



**Figura 23.** Dependencia térmica del  $\Delta H_u$  de MgATP a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  aisladas, determinado calorimétricamente. La pendiente corresponde a  $\Delta C_{p_u} = \Delta H_u/T$ . Cuadros, unión G $\alpha$ -MgATP ( $\Delta C_{p_u} = 20 \text{ cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ). Círculos, vacíos unión T $\beta$ -MgATP ( $\Delta C_{p_u} = -150 \text{ cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ )

Utilizando un modelo de área superficial parametrizado con datos de transferencia de compuestos modelo (ecuación 5) y la conformación de la subunidad  $\alpha$  observada en el cristal de MF<sub>1</sub>, se realizó una estimación de  $\Delta C_p$  para la interacción con MgATP. (28) Asumiendo una asociación de cuerpo rígido, la formación del complejo está acompañada por el ocultamiento de 513 Å<sup>2</sup> y 260 Å<sup>2</sup> de área polar y no polar, respectivamente. Estos cambios de exposición en área son consistentes con un  $\Delta C_{p_u} = +7 \text{ cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ , magnitud comparable a la obtenida experimentalmente. Por tanto, este resultado sugiere que la subunidad  $\alpha$  aislada presenta un cambio conformacional limitado después de unir a su ligando.

Los resultados obtenidos mediante modelos de área superficial concuerdan plenamente con datos de simulación de dinámica molecular en solvente explícito que se han realizado en nuestro grupo de trabajo. (81) En las dinámicas de 100 ns de duración se observa que la conformación promedio de la subunidad  $\alpha$  se mantiene prácticamente invariante entre la forma apo y unida a MgATP (holo) (Figura 25). A través de la dinámica también fue posible observar que la subunidad  $\alpha$  presenta gran flexibilidad en la zona equivalente al DELSEED de la subunidad  $\beta$ , es decir, el dominio carboxilo terminal, con un intervalo de movimiento máximo de 13 Å. Esta observación permitió afirmar que la subunidad  $\alpha$  es capaz de visitar todo el espacio conformacional entre las conformaciones abierta y cerrada de la subunidad  $\beta$ , lo cual difiere de la suposición

común en la literatura de que la subunidad  $\alpha$  posee una estructura rígida. El hecho de que la subunidad  $\alpha$  transitó de manera frecuente entre conformaciones extremas en un tiempo relativamente corto de simulación, sugirió que la barrera energética de transición entre la conformación abierta y cerrada de la subunidad  $\alpha$  es pequeña. Esta flexibilidad conformacional libre de barrera es ideal para acompañar y transmitir el movimiento entre las subunidades catalíticas. De hecho, se ha demostrado por microscopía de fuerza atómica que el hexámero  $\alpha_3\beta_3$ , en ausencia de la subunidad  $\gamma$ , también sufre cambios conformacionales alternantes al unir nucleótidos. <sup>(182)</sup>

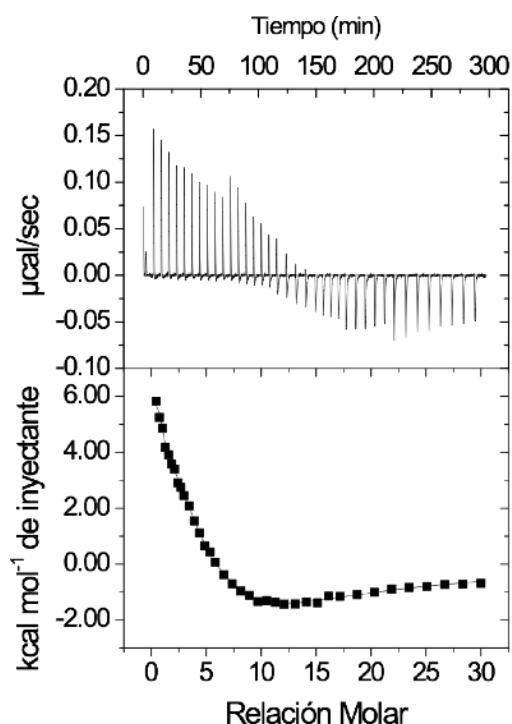


**Figura 25.** Flexibilidad conformacional del dominio carboxilo terminal de la subunidad  $\alpha$  aislada en forma apo (azul) y holo unida a MgATP (naranja). Las estructuras representadas en listones corresponden a la estructura promedio obtenida de la simulación de 100 ns de dinámica molecular. <sup>(77)</sup> Las estructuras en alambre corresponden a conformeros selectos, que ilustran la movilidad de la subunidad a lo largo de la trayectoria.

## 6.6. Calorimetría de la unión de ADP al complejo $\alpha_3\beta_3\gamma$ (GF<sub>1</sub>)

El contenido de nucleótidos del complejo  $\alpha_3\beta_3\gamma$  aislado se determinó a partir de la relación entre la absorbencia a 260 nm y 280 nm, mostrando que no existen nucleótidos en la preparación. Se realizó la titulación del subcomplejo GF<sub>1</sub> (1.04 mg/ml) con ADP a 25 °C (Figura 26). De manera general, se observan dos tipos de unión con comportamientos termodinámicos distintos, similar a los dos tipos de sitios observados en la mutante fluorescente  $\beta Y^{331W}$ .<sup>(34)</sup> Una de alta afinidad con firma endotérmica y otra de afinidad intermedia a baja con un comportamiento exotérmico. Como se ha descrito más arriba, la interacción de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  con MgATP está dirigida entálpicamente. Por tanto, la observación de unión endotérmica para el o los sitios de

alta afinidad de GF<sub>1</sub> indica que la ganancia de entalpía por la interacción per se con el nucleótido es cancelada por la ruptura de enlaces proteína-proteína que acompañan la rotación del subcomplejo. En este caso, la asociación es dirigida entrópicamente. Por otro lado, se ha descrito que la afinidad de la subunidad β aislada es parecida a la mostrada por el sitio de menor afinidad de F<sub>1</sub>, lo cual ha llevado a la sugerencia de que comparten un modo similar de unión a nucleótido. Si ese fuera el caso, la unión exotérmica de ADP observada para GF<sub>1</sub> a mayor concentración de ligando estaría dada mayoritariamente por la interacción con el nucleótido, y en menor medida por cambios en las interacciones entre subunidades adyacentes.



**Figura 26.** Calorimetría de titulación isotérmica de GF<sub>1</sub> (0.003mM) con ADP (2.5mM) a 25 °C. Arriba, termograma de unión que muestra la presencia de picos endotérmicos y exotérmicos. Abajo, isoterma de unión obtenida a partir de la unión hasta una relación molar GF<sub>1</sub>: ADP de 1:30. La línea representa el ajuste a un modelo secuencial de unión de 6 sitios.

La curva de unión de GF<sub>1</sub> con ADP fue analizada mediante un modelo de unión de 6 sitios secuenciales. Para reducir el número de parámetros a ajustar, se tomó el valor publicados por Bulygin et al, (2007) para fijar el primer sitio de unión a  $2.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  durante el ajuste. Como se muestra en la Tabla 7, los valores de  $K_u$  oscilan entre  $2.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  para el primer sitio y  $2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  para el sexto. En relación al cambio de entalpía, 4 de los sitios son endotérmicos, y los 2 restantes exotérmicos. Llama la atención que solo el sitio 4 presenta un valor de  $\Delta H_u$  comparable con el observado con las subunidades aisladas (entre -7 y -9 kcal/mol), <sup>(167)</sup> mientras que el sitio 6 presenta un valor negativo varias veces mayor. Por tanto, este primer acercamiento a la termodinámica de unión de



nucleótidos por parte de GF<sub>1</sub> sugiere que la unión de los sitios de menor afinidad no corresponde necesariamente al comportamiento de las subunidades aisladas. Es de considerar que este análisis no nos permite distinguir a qué tipo de sitio en lo particular corresponde cada evento observado durante la titulación. Para poder definir la unión a sitios catalíticos y no catalíticos, sería necesario generar mutantes de GF<sub>1</sub> que impidan la unión en sitios no catalíticos o en sitios catalíticos, de tal manera que fuera posible analizar la interacción exclusivamente con las subunidades competentes para unir.

**Tabla 7.** Constantes de unión y entalpías asociadas para los 6 sitios de GF<sub>1</sub> determinadas mediante CTI. La constante del primer sitio se fijó de acuerdo al valor reportado por Bulygin et al, (2007).

Ka <sub>1</sub> M <sup>-1</sup>	Ka <sub>2</sub> M <sup>-1</sup>	Ka <sub>3</sub> M <sup>-1</sup>	Ka <sub>4</sub> M <sup>-1</sup>	Ka <sub>5</sub> M <sup>-1</sup>	Ka <sub>6</sub> M <sup>-1</sup>
2.5x10 <sup>7</sup>	5.8±0.9x10 <sup>5</sup>	3.4±0.3x10 <sup>5</sup>	1.2±0.1x10 <sup>5</sup>	1.9±0.2x10 <sup>5</sup>	2.5±0.2x10 <sup>4</sup>
ΔH <sub>1</sub> kcal/mol	ΔH <sub>2</sub> kcal/mol	ΔH <sub>3</sub> kcal/mol	ΔH <sub>4</sub> kcal/mol	ΔH <sub>5</sub> kcal/mol	ΔH <sub>6</sub> kcal/mol
5.89±0.01	6.3± 0.6	8.9±1.2	-10.0±0.4	11±4	-65±3

## 7. DISCUSIÓN

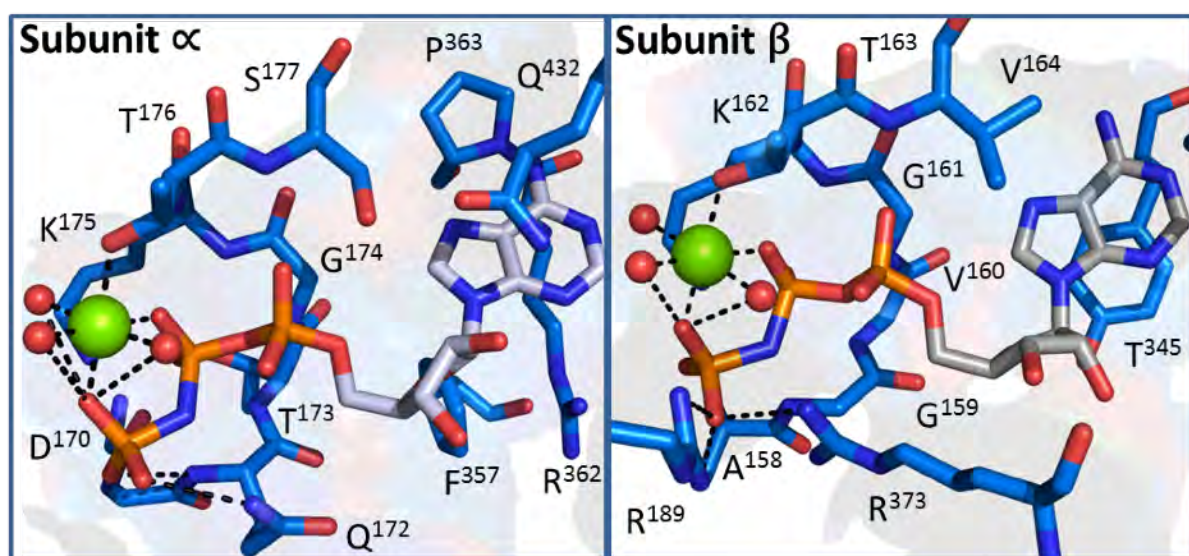
Es claro que para comprender el fenómeno de conversión de energía tan específico que ocurre en la ATP sintasa debemos conocer la función que desempeña cada elemento individual de este motor. Muchos estudios han mostrado que es posible trabajar con subcomplejos o subunidades aisladas. En este estudio caracterizamos mediante calorimetría de titulación isotérmica el comportamiento energético asociado a la unión de nucleótidos de adenina a la subunidad  $\alpha$  aislada, con el propósito de generar información sobre su funcionamiento.

La firma termodinámica de la subunidad  $\alpha$  resultó en términos generales similar a la reportada previamente para la subunidad  $\beta$  aislada.<sup>(158)</sup> Esto no es de sorprender, dado que las dos subunidades de arquitectura tridominio tienen un origen filogenético común, presumiblemente como resultado de un evento de duplicación. Las dos subunidades exhiben para MgADP y MgATP afinidades en el rango  $\mu\text{M}$  dirigidas por la entalpía, con una preferencia mayor en el caso de la subunidad no catalítica. El magnesio también lleva a cabo un efecto estabilizador sobre los nucleótidos similar en ambas subunidades. El catión genera una cooperatividad heterotrópica de unión favorecida entálpicamente en las dos subunidades en presencia de ATP, mientras que la contribución con ADP es marginal. El análisis de las firmas termodinámicas además revela detalles sobre el comportamiento conformacional de las subunidades. Es de esperarse que la desolvatación del fosfato  $\gamma$  aporte un componente favorable extra a la entropía de unión. No obstante, la unión de MgATP a la subunidad  $\alpha$  está acompañado de una entropía desfavorable ( $T\Delta S = 4.2$ , 25 °C), mientras que la unión de MgADP es isoentrópico ( $T\Delta S = -0.1$ , 25 °C). Por tanto, de forma similar a la subunidad  $\beta$ , los datos termodinámicos indican que la subunidad  $\alpha$  también adopta una conformación más rígida unida a MgATP que a MgADP. Una conformación más cerrada de la subunidad  $\beta$  se ha correlacionado con el estado catalíticamente activado que la subunidad adopta transitoriamente dentro de  $F_1$ , la cual a su vez es más compacta que cualquiera de las conformaciones cerradas observadas en las estructuras cristalográficas de  $F_1$ .<sup>(158, 198)</sup> Por otro lado, la ausencia de efectos cooperativos dependientes de Mg(II) con ADP podrían estar relacionados con requerimientos funcionales de la enzima, en particular con

aquellos relacionados a la actividad de los sitios catalíticos. Walker y colaboradores han presentado recientemente evidencia estructural de un nuevo paso intermedio durante la hidrólisis de ATP.<sup>(157)</sup> En la estructura de  $F_1$  bovina co-cristalizada con ADP y baja concentración de Mg(II), el sitio catalítico de la subunidad  $\beta$  en la conformación extendida ( $\beta_E$ ) está ocupado por ADP libre de metal. La misma interacción fue capturada en la estructura cristalográfica de  $F_1$  de levadura en complejo con IF<sub>1</sub>.<sup>(164)</sup> De acuerdo con los autores, estas estructuras permiten definir el mecanismo de liberación de productos, con la molécula de ADP siendo liberada después de la liberación de los iones de fosfato y magnesio. Experimentos unimolécula han revelado que el ATP es hidrolizado en un ángulo de rotación de 200°, mientras que el ADP es liberado alrededor de 240°.<sup>(3)</sup> El Mg(II) y el fosfato son liberados en algún lugar intermedio de rotación entre 200° y 240°. Nuestros estudios calorimétricos proveen las bases energéticas para este mecanismo secuencial, dado que la fuerza de interacción de la subunidad  $\beta$  con ADP no es afectada por Mg(II), haciendo por tanto termodinámicamente favorable la pre-liberación del catión.

Sin embargo, a pesar de las semejanzas tanto estructurales como de modo de interacción con los nucleótidos, las funciones de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son substancialmente distintas. Esta divergencia debe manifestarse en aspectos finos del reconocimiento de nucleótidos. Una clara diferencia entre las dos subunidades es el efecto cooperativo del magnesio en el reconocimiento de nucleótidos. En ausencia del ion metálico, la catálisis es abolida completamente, lo que implica que en este aspecto existe una dependencia total por parte de la subunidad  $\beta$ . Con relación a la capacidad de unión, si bien ambas subunidades presentan una cooperatividad heterotrópica positiva, la afinidad de la subunidad  $\alpha$  es incrementada 40 veces por la presencia del ion metálico, en tanto que la de la subunidad  $\beta$  se incrementa solo 8 veces. Claramente, esta diferencia está relacionada con el hecho de que la subunidad  $\alpha$  es una proteína puramente unidora, mostrando la mayor dependencia en la unión al nucleótido, mientras que la subunidad  $\beta$  muestra la mayor dependencia hacia el catión en su actividad catalítica, es decir, en la estabilización del estado activado de la reacción de hidrólisis. Interesantemente, es solo en presencia de Mg(II) que las subunidades no catalíticas unen fuertemente el ATP y liberan el ADP inhibitorio de los sitios catalíticos en  $F_1$ .<sup>(131)</sup> Este comportamiento está cualitativamente de acuerdo con la fuerte dependencia del catión que la subunidad  $\alpha$  aislada presenta para reconocer el ATP, y del papel regulatorio de esta subunidad en el mecanismo catalítico rotatorio. Es de hacer notar que la diferente dependencia energética hacia el Mg(II) no se ve reflejada en las interacciones que se observan entre

las subunidades y los nucleótidos en las distintas estructuras cristalográficas disponibles. Como se muestra en la Figura 27, la estructura cristalográfica de  $F_1$  en la conformación denominada estado basal presenta el establecimiento de interacciones idénticas entre el metal y las dos subunidades.<sup>(2)</sup> Por lo que los distintos efectos estabilizadores que el Mg(II) realiza deben ser indirectos, por ejemplo, a través del congelamiento de diferente número de enlaces rotables en cada subunidad. Sin embargo, existe también la posibilidad de que otros efectos, como la ocurrencia de equilibrios acoplados por intercambio de moléculas de agua estructurales, contraiones y protones, puedan estar operando en una forma compleja.

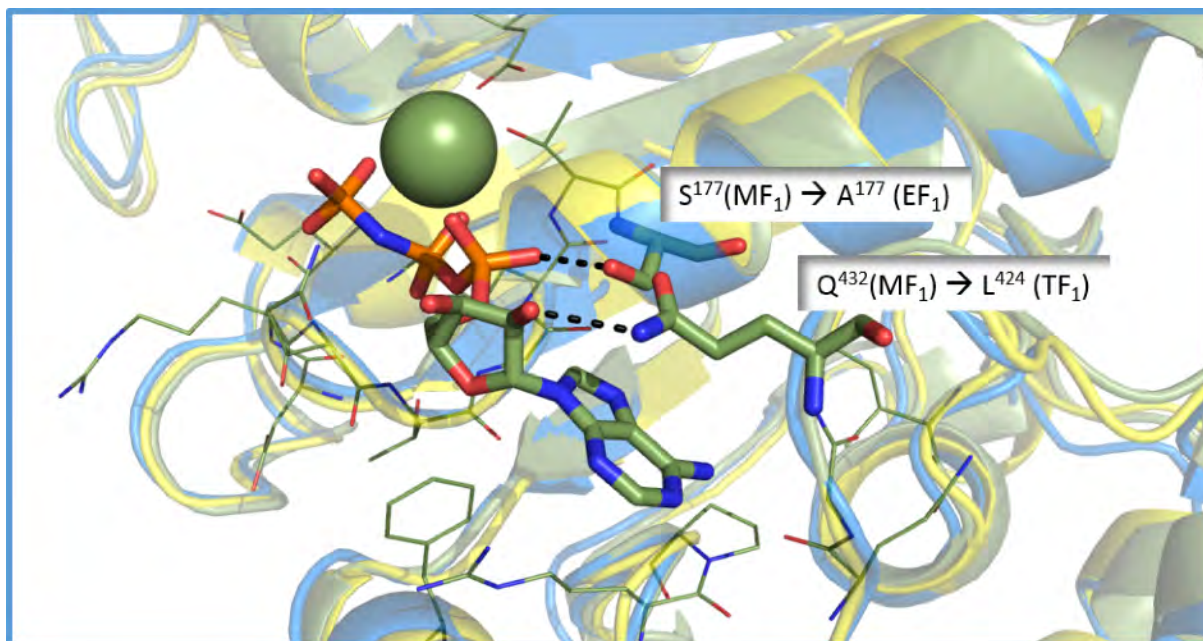


**Figura 27.** Esquema de los sitios de unión de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la  $F_1$ -ATPasa. Las coordenadas para la conformación TP en ambas subunidades con AMP-PNP unido fueron extraídas del archivo pdf JDI que corresponden a la estructura cristalográfica de la ATPasa bovina libre de azida (conformación del estado basal).

Varios estudios han reportado la fuerza de unión de nucleótidos en los sitios no catalíticos en  $F_1$ .<sup>(148)</sup> Sin embargo, la determinación de las afinidades en  $F_1$  ha sido históricamente una tarea complicada, y la mayoría de los datos disponibles deben ser considerados como valores aparentes. Uno de los muchos factores que complican las mediciones es que las subunidades no catalíticas de  $F_1$  provenientes de diferentes especies intercambian los nucleótidos muy lentamente. No obstante, como este régimen es precedido por una asociación rápida y reversible, Weber *et al*, (1995B) obtuvieron constantes de equilibrio para la asociación rápida en  $F_1$  de *E. coli* basados en experimentos fluorométricos. De acuerdo con estas mediciones, la subunidad no catalítica une más fuerte MgATP ( $K_d = 55 \mu\text{M}$ ) que MgADP ( $K_d = 105 \mu\text{M}$ ). Los autores también reportan constantes de disociación para los nucleótidos libres de magnesio de

3.5 y 1.3  $\mu\text{M}$  para ATP y ADP, respectivamente. Usando estos datos, las constantes de cooperatividad heterotrópica de Mg(II) y ATP para la unión a los sitios no catalíticos en  $\text{EF}_1$  es de 64, mientras que el valor para ADP es de 13. Estos valores son consistentes a los obtenidos en esta tesis para la subunidad  $\alpha$  aislada (308 y 2 para ATP y ADP, respectivamente). Por lo tanto, parece que, sin importar el estado cuaternario, las subunidades  $\alpha$  muestran la misma preferencia relativa por nucleótidos y el mismo efecto estabilizador dependiente de Mg(II). En contraste, estudios fluorométricos previos para la subunidad  $\alpha$  aislada de *E. coli* reportan valores de  $K_d$  de 0.3 y 1.2  $\mu\text{M}$  para MgATP y ATP, respectivamente.<sup>(173)</sup> Estas afinidades son significativamente más fuertes a las obtenidas por nosotros calorimétricamente ( $K_d = 1.6$  y 567  $\mu\text{M}$  para MgATP y ATP, respectivamente), valores de los cuales se deriva una constante heterotrópica de solo 4. No es claro hasta qué punto las diferencias entre los dos juegos de valores para la subunidad  $\alpha$  aislada sean el reflejo de diferencias de comportamiento interespecies (*E. coli* vs *G. kaustophilus*) o se deban a variaciones en las determinaciones experimentales. (ej., técnica fluorométrica vs calorimétrica, modelo de unión simple vs acoplado, pH 7 vs pH 8). El análisis de las estructuras cristalográficas de  $\text{MF}_1$ ,  $\text{EF}_1$  y  $\text{TF}_1$  revelan que los sitios no catalíticos de las tres especies son muy similares entre ellos, con identidad total entre *E. coli* y *G. kaustophilus* (Figura 28). Por lo que si existen diferencias de unión interespecie se deberían probablemente a variaciones de secuencia y conformación fuera del sitio de unión. Para lograr un análisis apropiado de este tema, es necesario realizar una caracterización termodinámica detallada de los perfiles energéticos de las subunidades  $\alpha$  aisladas de diferentes especies.

Diversos estudios han documentado el amplio cambio conformacional que sufre la subunidad  $\beta$  aislada a lo largo del mecanismo rotatorio.<sup>(22, 43, 90, 92, 106, 158, 198, 200)</sup> En ausencia de nucleótidos, la subunidad catalítica aislada es capaz de transitar a conformaciones similares a la estructura cerrada, aunque esta última conformación es estabilizada sólo en presencia de sustrato.<sup>(91, 106, 199)</sup> El dominio C terminal es una zona importante de interacciones determinantes entre  $\beta$ - $\gamma$ . Comparado con la subunidad  $\beta$ , muy poco se sabe sobre el comportamiento conformacional de la subunidad  $\alpha$  y el papel que juega esta subunidad en el mecanismo rotatorio de la ATP sintasa.



**Figura 28.** Superposición de los sitios no catalíticos de MF<sub>1</sub> (verde; pdf 2JDI), EF<sub>1</sub> (amarillo; pdb 3OAA y TF<sub>1</sub> (azul; pdb XD7). Los residuos a una distancia  $\geq 5$  Å del ligando MgATP y que son idénticos en las tres especie se muestran en líneas, los residuos mutados en relación a la subunidad bovina están en barras.

La caracterización estructural de la subunidad  $\alpha$  aislada llevada a cabo en nuestro grupo mediante dinámica molecular revela que el evento de asociación al nucleótido modifica marginalmente la conformación promedio de la proteína.<sup>(81)</sup> A su vez, la conformación que adopta como subunidad aislada es muy similar a la observada en F<sub>1</sub>, indicando que en la estructura de espera catalítica de la enzima la subunidad  $\alpha$  se encuentra en una forma relajada. Durante la simulación sin sesgo de la subunidad  $\alpha$ ,<sup>(81)</sup> también se observó una amplia flexibilidad estructural, con desplazamientos en el dominio C terminal tan grandes como los exhibidos por la subunidad  $\beta$ . Esto nos permite especular que el ancestro común de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  ya poseía la habilidad de realizar transiciones conformacionales de bisagra. Por otro lado, se ha mostrado experimentalmente que el hexámero  $\alpha_3\beta_3$ , desprovisto de la subunidad  $\gamma$  central, es también capaz de realizar cambios conformacionales alternantes en las subunidades  $\beta$  acoplados a la hidrólisis de ATP.<sup>(123)</sup> Este resultado indica que la comunicación entre subunidades  $\beta$  se logra de manera eficiente propagando a través de las subunidades  $\alpha$ . En este sentido, el hecho de que la transición entre la conformación abierta y cerrada de la subunidad  $\alpha$  sea sin barrera energética, indica que esta subunidad está optimizada para transferir de manera eficiente los impulsos conformacionales comunicados por las subunidades  $\beta$  adyacentes.

La ATP sintasa posee un mecanismo rotatorio sofisticado capaz de acoplar energía química y mecánica de forma eficiente.<sup>(81, 165, 180)</sup> Similar a un motor macroscópico, el mecanismo de optimización depende de muchos factores, incluyendo el

que los componentes individuales ofrezcan la menor resistencia a la rotación, de manera que el torque no sea disipado innecesariamente. En este sentido, no es de sorprender que los comportamientos conformacionales exhibidos por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  dentro de  $F_1$  sean una propiedad inherente que manifiesta el comportamiento de las subunidades aisladas.

## 8. CONCLUSIONES

El estudio reportado aquí da nueva luz acerca de las bases energéticas del reconocimiento de nucleótidos por las subunidades de la ATP sintasa. La unión de nucleótidos tiene una firma similar en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  en estado monomérico. Es dirigida entálpicamente y la participación del magnesio aporta un componente energético importante a la unión, en especial para el ATP. La interacción en el Asa-P o motivo Walker A es virtualmente idéntico en ambas subunidades. Nuestros datos revelan un aspecto importante del Mg(II), quien tiene un efecto sustancial en la formación del sitio de reconocimiento de nucleótidos, permitiendo un empaquetamiento mas óptimo y rígido en presencia de ATP. El análisis muestra que la subunidad  $\alpha$  está optimizada como unidora de nucleótidos unidos a  $Mg^{2+}$ , mostrando una afinidad por ATP sustancialmente mayor que la exhibida por la subunidad  $\beta$ . Estas diferencias cuantitativas en los parámetros de unión se correlacionan con el papel que juegan en  $F_1$ .

La retención de la habilidad de la subunidades  $\alpha$  para unir nucleótidos durante la evolución pueda explicarse a través de una función regulatoria. El papel regulatorio de los sitios no catalíticos en la actividad de ATPasa se ha demostrado en diferentes complejos  $F_1$ . La unión de ATP a los sitios no catalíticos en  $MF_1$  y  $TF_1$  promueven la disociación del ADP inhibitorio presente en el sitio catalítico, estimulando la catálisis en estado estacionario. En el complejo  $F_1$  de cloroplasto muestra una fuerte dependencia a la ocupación con nucleótido en los sitios no catalíticos para la activación catalítica de la hidrólisis. La síntesis muestra dependencia de la ocupación de los sitios no catalíticos en  $TF_0$ - $F_1$  y  $CF_0$ - $F_1$ , aunque aún se requieren más datos para validar este comportamiento.

Los datos calorimétricos determinados a diferentes temperaturas concuerdan con las simulaciones de dinámica molecular. El  $\Delta C_p$  positivo ( $20 \pm 15 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) es raramente observado en proteínas y se ha racionalizado en términos de interacciones polares dominantes. El valor del  $\Delta C_p$  experimental es comparable a la estimación del  $\Delta C_p$  a partir de la conformación observada en la estructura de  $MF_1$  considerando una asociación de cuerpo rígido, con un  $\Delta C_p = 7 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ . Esto sugiere en concordancia con simulaciones de MD que la subunidad  $\alpha$  lleva a cabo un cambio conformacional limitado al unir sus ligandos. Adicionalmente las simulaciones muestran que la transición confor-



macional de la subunidad  $\alpha$  no presenta barrera energética dando flexibilidad estructural que ayudaría a acoplar los movimientos entre las distintas subunidades catalíticas.

Las mediciones preliminares de  $GF_1$  muestran un patrón complejo de unión, indicando cambios en el comportamiento energético de las subunidades al estar dentro del oligómero. Sin embargo, para entender cómo el estado oligomérico modula el comportamiento de unión de las subunidades y determina la comunicación, se necesitan más estudios que permitan realizar un análisis robusto del proceso de unión.

## 9. PERSPECTIVAS

Con respecto a los hallazgos encontrados en este trabajo, se proponen las siguientes perspectivas:

La determinación de las afinidades de cada subunidad aislada permitió encontrar diferencias entre las subunidades catalítica y no catalítica, las cuales pudieron ser relacionadas a la función específica de cada una de ellas. Se propone que un estudio más detallado de este tipo, en distintas condiciones de pH y en distintas concentraciones del agua, lo cual ayudaría a contestar las preguntas que quedaron sin resolver como el papel del agua en la entropía de unión para cada una de las subunidades o que fenómenos de hidratación ocurren durante la unión.

La flexibilidad determinada para la zona del carboxilo en la subunidad  $\alpha$ , apoya la idea de que las intercaras entre subunidades catalíticas y no catalíticas son importantes para llevar a cabo el mecanismo catalítico, haciendo necesario determinar los parámetros energéticos de comunicación intercatenaria. Se propone el estudio de unión de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  formando diferentes complejos en presencia y ausencia de nucleótidos. Cada uno de los complejos permitiría entender de mejor manera el funcionamiento de este motor y su relación con el funcionamiento de otros motores. También ayudaría a entender qué cambios dependientes de las interfaces ocurren en las afinidades por nucleótido. La propuesta abarcaría la purificación de subcomplejos  $\alpha\beta$ ,  $\alpha_2\beta_2$  y  $\alpha_3\beta_3$  y experimentos de Calorimetría (CTI) para la formación de estos y su interacción con nucleótidos.

Debido a la dificultad para determinar los tipos de sitios en los experimentos del núcleo catalítico  $F_1$  de termófilo, se proponen generar mutantes para eliminar la capacidad de unión en las subunidades catalíticas o en las no catalíticas. Esto simplificaría el ajuste de los datos a solo tres sitios, y podría ayudarnos a discernir a que subunidad se deben los calores exotérmicos y endotérmicos observados en la titulación del complejo.

## 10. Bibliografía

- 1) Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R., Walker, J. **1994**. Structure at 2.8Å resolution of ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, 370, 621-628.
- 2) Adachi, K., Oiwa, K., Nishizaka, T., Furuike S., Noji, H., Itoh, H., Yoshida, M., Kinosita Jr K. **2007**. coupling of rotation and catalysis in F<sub>1</sub>-ATPase revealed by single-Molecule imaging and manipulation. *Cell*. 130, 309-321.
- 3) Adachi, K., Oiwa, K., Yoshida, M., Nishizaka, T., Kinosita Jr, K. **2012**. Controlled rotation of the F<sub>1</sub>-ATPase reveals differential and continuous binding changes for ATP synthesis. *Nature Communications*. Doi: 10.1038/ncomms2026.
- 4) Ahmad, Z., Okafor, F., Azim, S., Laughlin T. F. **2013**. ATP synthase: A molecular therapeutic drug target for antimicrobial and antitumor peptides. *Current Medicinal Chemistry*. 20, 1956-1973
- 5) Ahmad, S., Winjobi, M., Kabir, A. **2014**. Significance of αThr-349 in the catalytic sites of *Escherichia coli* ATP synthase. *Biochemistry*. 53, 7376-7385.
- 6) Allison, W. S., Jault, J. M., Zhuo, S., Paik, S. R. **1992**. Functional sites in F<sub>1</sub>-ATPases: location and interactions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 24, 469-477.
- 7) Allegretti, M., Klush, N., Mills, D., Vonck, J., Kühlbrandt, W. Davies, K. **2015**. Horizontal membrane-intrinsic α-helices in the stator a-subunit of an F-type ATP synthase. *Nature*. 521, 237-240.
- 8) Aloise, P., Kagawa, Y., Coleman, P. **1991**. Comparative Mg<sup>2+</sup>-dependent sequential covalent binding stoichiometries of 3'-O-(4-benzoyl) benzoyl Adenosine 5'-diphosphate of MF<sub>1</sub>, TF<sub>1</sub> and α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γ core complex of TF<sub>1</sub>. *Journal of Biological Chemistry*. 266, 1368-10376.
- 9) Arai, H., Yukawa, A., Iwatate, E., Kamiya, M., Watanabe, R., Urano, Y., Noji, H. **2014**. Torque generation mechanism of F<sub>1</sub>-ATPase upon NTP binding. *Biophysical Journal*. 107, 156-164.
- 10) Ariga, T., Muneyuki, E., Yoshida, M. **2007**. F<sub>1</sub>-ATPase rotates by an asymmetric, sequential mechanism using all three catalytic subunits. *Nature Structural and Molecular Biology*. 14, 841-846.
- 11) Asimov, I. **1962**. Life and Energy. 1era edición. Avon Publishers of Brand, Camelot, Discuse and Equinox Books. EUA.
- 12) Baker, B., Murphy, K. **1998**. Prediction of binding energetics from structure using empirical parametrization. *Methods in Enzymology*. Vol 295. Ed. Academic Press. EUA.
- 13) Baker, L. A., Watt, I. N., Runswick, M. J., Walker, J. E., Rubinstein, J. L. **2012**. Arrangement of subunits in intact mammalian mitochondrial ATP synthase determined by cryo-EM. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 109, 11675-11680.
- 14) Bald, D., Amano, T., Muneyuki, E., Pitard, B., Rigaud, J. L., Kruij, J., Hisabori, T., Yoshida, M., Shibata, M. **1998**. ATP synthesis by F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> synthase independent of noncatalytic nucleotide binding sites and insensitive to azide inhibition. *Journal of Biological Chemistry*. 273, 865-870.
- 15) Bandyopadhyay, S., Valder, C. R., Huynh, H. G., Ren, H., Allison, W. S. **2002**. The βG156C substitution in the F<sub>1</sub>-ATPase from the thermophilic *Bacillus* PS3 affects catalytic site cooperativity by destabilizing the closed conformation of the catalytic site. *Biochemistry*. 41, 14421-14429.

- 16) Beke-Somfai, T., Lincoln, P., Nordén, B. **2011**. Double-lock ratchet mechanism revealing the role of  $\alpha$ Ser-344 in F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 108, 4828-4833.
- 17) Beke-Somfai, T., Lincoln, P., Nordén, B. **2013**. Rate of hydrolysis in ATP synthase is fine tuned by  $\alpha$ -subunit motif controlling active site conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 110, 2117-2122.
- 18) Bernardi, P., Rasola, A., Forte, M., Lippe, G. **2015**. The mitochondrial permeability transition pore: channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology. *Physiological Reviews*. 95 1111–1155.
- 19) Bianchet, A., M., Hullihen, J., Pedersen, P. L., Amzel, M. **1998**. The 2.8 Å structure of rat liver F<sub>1</sub>-ATPase: configuration of a critical intermediate in ATP synthesis/hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 95, 11065-11070.
- 20) Bilyard, T., Nakanishi-Matsui, M., Steel, B. C., Pilizota, T., Nord, A. L., Hosokawa, H., Futai, M., Berry, R. M. **2013**. High-resolution single molecule characterization of the enzymatic states in Escherichia coli F<sub>1</sub>-ATPase. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 368: 20120023. Doi: 10.1098/rstb.2012.0023.
- 21) Boyer, P. **1999**. What makes ATP synthase spin?. *Nature*. 402, 247–249.
- 22) Böckmann, R. A., Grubmüller, H. **2003**. Conformational dynamics of the F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$ -subunit: a molecular dynamic study. *Biophysical Journal*. 85, 1482-1491.
- 23) Böckmann, R. A., Grubmüller, H. **2002**. Nanoseconds molecular dynamics simulation of primary mechanical energy transfer steps in F<sub>1</sub>-ATP synthase. *Nature Structure and Molecular Biology*. 9, 198-202.
- 24) Bojovschi, A., Liu, M. S., Sadus, R. J. **2014**. Mg<sup>2+</sup> coordinanting dynamics in Mg:ATP fueled motor proteins. *Journal of Chemical Physics*. 140, 1151021 a 7
- 25) Boltz, K., Frasch, W. D. **2006**. Hydrogen bonds between the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the F<sub>1</sub>-ATPase allow communication between the catalytic site and the interface of the  $\beta$ c catch loop and the  $\gamma$  subunit. *Biochemistry*. 45, 11190-11199.
- 26) Börsch, M., Duncan, T. M. **2013**. Spotlighting motors and controls of single FoF<sub>1</sub>-ATP synthase. *Biochemical Society Transactions*. 41, 1219-1226.
- 27) Bowler, M. W., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., Walker, J. E. **2006**. How azide inhibits ATP hydrolysis by the F<sub>1</sub>-ATPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 103, 8646-8649.
- 28) Bowler, M. W., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., Walker, J. E. **2007**. Ground state structure of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria at 1.9 Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*. 282, 14238-14242.
- 29) Boyer, P. **1993**. The binding change mechanism for ATP synthase. Some probabilities and possibilities. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1140, 215-250.
- 30) Bragg, P. D., Hou, C. **1980**. A Cross-linking Study of the Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-activated adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*. 106, 495-503.
- 31) Brooks III, C. L., Karplus, M., Pettitt, B. M. **1998**. Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure, and Thermodynamics, *Advances in Chemical Physics*. Vol. LXXI. Ed. John Wiley and Sons. EUA.
- 32) Bulygin, V. V., Vinogradov, D. **1991**. Interaction of Mg<sup>2+</sup> with F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> mitochondrial ATPase as related to its slow active/inactive transition. *Biochemical Journal*. 276, 149-156.

- 33) Bulygin, V., Milgrom, Y. **2009**. A bi-site mechanism for Escherichia coli F<sub>1</sub>-ATPase accounts for the catalytic cooperativity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1787, 1016-1023.
- 34) Bulygin, V. V., Milgrom, Y. **2007**. Studies of nucleotide binding to the catalytic sites of Escherichia coli βY331W-F<sub>1</sub>-ATPase using fluorescence quenching. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 104, 4327-4331.
- 35) Burgard, S., Nett, J. H., Sauer, H. E., Kagawa, Y., Schäfer, H. J., Wise, J., Vogel, P., Trommer, W. E. **1994**. Effects of magnesium ions on the relative conformation of nucleotide binding sites of F<sub>1</sub>-ATPase as studied by electron spin resonance spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*. 269, 17815-17819.
- 36) Chavelas, E. A., García-Hernández, E. **2009**. Heat capacity changes in carbohydrates and protein-carbohydrate complexes. *Biochemical Journal*. 420, 239-247.
- 37) Chen, C., Saxena, A. K., Simcoke, W. N., Garboczi, D. N., Pedersen, P. L., Ko, Y. H. **2006**. Mitochondrial ATP synthase: crystal structure of the catalytic F<sub>1</sub> unit in a vanadate-induced transition-like state and implications for mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. 281, 13777-13783
- 38) Chodera, J. D., Mobley, D. L. **2011**. Entropy-enthalpy compensation: Role and ramifications in biomolecular ligand recognition and design. *Annual Review of Biophysics*. 42, 121-142.
- 39) Cingolani, G., Duncan, T. M. **2011**. Structure of the ATP synthase catalytic complex (F<sub>1</sub>) from *Escherichia coli* in an auto-inhibited conformation. *Nature Structure and Molecular Biology*. 18, 701-707.
- 40) Cooper, A., Johnson, C., M., Lakey, J. H., Nöllmann, M **2001**. Heat does not come in different colours: entropy-enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement, pressure perturbation calorimetry, solvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions. *Biophysical Chemistry*. 93, 215-230.
- 41) Cross, L. R. **1981**. The mechanism and regulation of ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase. *Annual Review Biochemistry*. 50, 681-714.
- 42) Cross, L. R., Nalin, C. M. **1982**. Adenine nucleotide binding sites on beef heart F<sub>1</sub>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. 257, 2874-2881.
- 43) Cui, Q., Li, G., Ma, J., Karplus, M. **2004**. A normal mode analysis of structural plasticity in the biomolecular motor F<sub>1</sub>-ATPase. *Journal of Molecular Biology*. 340, 345-372.
- 44) Cunningham, D., Cross, R. L. **1988**. Catalytic site occupancy during ATP hydrolysis by MF<sub>1</sub>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. 263, 18850-18856.
- 45) Czub, J., Grubmüller, J. **2011**. Torsional elasticity and energetics of F<sub>1</sub>-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 118, 7408-7413.
- 46) Czub, J., Grubmüller, H. **2014**. Rotation triggers nucleotide-independent conformational transition of the empty β subunit of F<sub>1</sub>-ATPase. *Journal of American Chemical Society*. 136, 6960-6968.
- 47) Dallman, G. H., Flynn, G., Dunn, S. D. **1992**. Determination of the 1-Ethyl-3-[(3-dimethylamino)propyl]-carbodiimide-induced cross-link between the β and ε Subunits of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase. *Journal Biological Chemistry*. 267, 18953-18960.
- 48) Dautant, A., Velorus, J., Giraud, M. F. **2010**. Crystal structure of the MgADP-inhibited state of the yeast F<sub>1</sub>C<sub>10</sub>-ATP synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 285, 29502-29510.
- 49) Davies K. M., Anselmi C., Wittig I., Faraldo-Gómez J. D., Kühlbrandt W. **2012**. Structure of the yeast F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 109, 13602-13607.

- 50) De Meis, L., Behrens, I., Celis, H., Romero, I., Gómez-Puyou, M. T., Gómez-Puyou, A. **1986**. Orthophosphate-pyrophosphate exchange catalyzed by soluble and membrane-bound inorganic pyrophosphatases. *European Journal of Biochemistry*. 158, 149-157.
- 51) Diez, M., Zimmermann, B., Börsch, M., König, M., Schweinberger, E., Steigmiller, S., Reuter, R., Felekan, S., Kudryavtsev, V., Seiden, C. A. M., Gräber, P. **2004**. Proton-powered subunit rotation in the single membrane bound F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase. *Nature Structural and Molecular Biology*. 11, 135-141.
- 52) Digel, J. G., Moore, N. D., McCarty, E. **1998**. Influence of divalent cations on nucleotide exchange and ATPase activity of chloroplast coupling factor 1. *Biochemistry*. 37, 17209-17215.
- 53) Dimroth, P., Kaim, G., Matthey, U. **1998**. The motor of the ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1365, 87-92.
- 54) Dittrich, M., Hayashi, S., Schulten, K. **2003**. On the mechanism of ATP hydrolysis in F<sub>1</sub>-ATPase. *Biophysical Journal*. 85, 2253-2266.
- 55) Dittrich, M., Hayashi, S., Schulten, K. **2004**. ATP hydrolysis in the β<sub>TP</sub> and β<sub>DP</sub> catalytic sites of F<sub>1</sub>-ATPase. *Biophysical Journal*. 87, 2954-2967.
- 56) Dou, C., Fortes, P. A., Allison, W. S. **1998**, The α<sub>3</sub>(βY341W)<sub>3</sub>γ subcomplex of the F<sub>1</sub>-ATPase from the thermophilic *Bacillus* PS3 fails to dissociate ADP when MgATP is hydrolyzed at a single catalytic site and attains maximal velocity when three catalytic sites are saturated with MgATP. *Biochemistry*. 37, 16757-16764.
- 57) Drobinskaya, I. Y., Kozlov, I. A., Murataliev, M. B., Vulfson, E. N. **1985**. Tightly bound adenosine diphosphate, which inhibits the activity of mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase, is located at the catalytic site of the enzyme. *Federation of European Biochemical Societies letters*. 182, 419-424.
- 58) Dunn, S. D. **1980**. ATP causes a large change in the conformation of the isolated α subunit of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. 255, 11857-11860.
- 59) Edel, C., Hartog, A. F., Berden, J. A. **1992**. Inhibition of mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase activity by binding of (2-azido-)ADP to a slowly exchangeable non-catalytic nucleotide binding site. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1100, 329-338.
- 60) Edel, C. M., Hartog, A. F., Berden, J. A. **1993**. Identification of an exchangeable non-catalytic site on mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase which is involved in the negative cooperativity of ATP hydrolysis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1142, 327-335.
- 61) Elston, T., Wang, H., Oster, G. **1998**. Energy transduction in ATP synthase. *Nature*. 391, 510-513.
- 62) Fajardo-Cavazos, P., Maughan, H., Nicholson. **2014**. Evolution in the Bacillaceae. *Microbiology Spectrum*. 2, doi:10.1128/microbiolspec.TBS-0020-2014.
- 63) Falson, P., Goffeau, A., Boutry, M., Jault, J. M. **2004**. Structural insight into the cooperativity between catalytic and noncatalytic sites of F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1658, 133-140.
- 64) Feniouk, B. A., Kozlova, M. A., Knorre, D. A., Cherepanov, D., Mulkidjanian, A., Junge, W. **2004**. The proton driven rotor of ATP synthase: ohmic conductance (10 fS) and absence of voltage gating. *Biophysical Journal*. 86, 4094-109.
- 65) Feniouk, B. A., Susuki, T., Yoshida, Y. **2007**. Regulatory interplay between proton motive force, ADP, phosphate, and subunit ε in bacterial ATP synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 282, 764-772.

- 66) Fillingame, R., Steed, R. **2014**. Half channels mediating H<sup>+</sup> transport and the mechanism of gating in the F<sub>0</sub> sector of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1837, 1063-1068.
- 67) Frasch, W. D. **2000**. The participation of metals in the mechanism of the F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1458, 310-325.3
- 68) Furuike, S., Hossain, M. D., Maki, Y., Adachi, K., Suzuki, T., Kohori, A., Itoh, H., Yoshida, M., Kinoshita Jr, K. **2008**. Axle-less F<sub>1</sub>-ATPase rotates in the correct direction. *Science*. 319, 955-958.
- 69) Gallagher, K., Sharp, K. **1998**. Electrostatic contributions to heat capacity changes of DNA-Ligand binding. *Biophysical Journal*. 75, 769-776.
- 70) Gallagher, K., R., Sharp, K., A. **2003**. A new angle on heat capacity changes in hydrophobic solvation. *Journal of American Chemical Society*. 125, 9853-9860.
- 71) Gao, Y. Q., Yang, W., Marcus, R. A., Karplus, M. **2003**. A model for the cooperative free energy transduction and the kinetics of the ATP hydrolysis by F<sub>1</sub>-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 100, 11339-11344.
- 72) Gao, Y. Q., Yang, W., Karplus, M. **2005**. A structure based model for the synthesis and hydrolysis of ATP by F<sub>1</sub>-ATPase. *Cell*. 123, 195-205.
- 73) Garret N. E., Penefsky H. S. **1975**. Interaction of adenine nucleotides with multiples sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*. 250, 6640-6647.
- 74) George, P., Witonsky, R. L., Trachtman, M., Wu, C., Dorwart, W., Richman, L., Richman, W., Shurayh, F., Lentz, B. **1970**. "Squiggle-H<sub>2</sub>O". An enquiry into the importance of solvation effects in phosphate ester and anhydride reactions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 223, 1-15.
- 75) Gertz, M., Seelert, H., Dencher, N., Poetisch, A. **2007**. Interactions of rotor subunits in the chloroplast ATP synthase modulated by nucleotides and by Mg<sup>2+</sup>. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1774, 566-574.
- 76) Gogarten, J. P., Taiz, L. **1992**. Evolution of proton pumping ATPases: Rooting the tree of life. *Photosynthesis Research*. 33, 137-146.
- 77) Greene, M. D., Frasch, W. D. **2003**. Interactions among gamma R268, gamma Q269, and the β subunit catch loop of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase are important for catalytic activity. *Journal of Biological Chemistry*. 278, 51594-51598.
- 78) Grodsky, N. B., Dou, C., Allison, S. W. **1998**. Mutations in the nucleotide binding domain of the α subunits of the F<sub>1</sub>-ATPase from thermophilic *Bacillus PS3* that affect cross-talk between nucleotide binding sites. *Biochemistry*. 37, 1007-1014.
- 79) Groth, G., Pohl, E. **2001**. The structure of the chloroplast F<sub>1</sub>-ATP synthase at 3.2 Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 1346-1362.
- 80) Gruber, G., Capaldi, R. A. **1996**. The trapping of different conformations of the *Escherichia coli* F<sub>1</sub> ATPase by disulfide bond formation. *Journal of Biological Chemistry*. 271, 32623-32628.
- 81) Hanh-Herrera, O., Salcedo, G., Barril, X., García-Hernández, E. **2016**. Inherent conformational flexibility of F<sub>1</sub>-ATPase α-subunit. *Biochimica et Biophysica Acta*. DOI: 10.1016/j.bbabi.2016.04.283.
- 82) Harris, D. A. **1978**. The interactions of coupling ATPases with nucleotides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 463, 245-273.
- 83) Hayashi, S., Ueno, H., Shaikh, A. R., Umemura, M., Kamiya, M., Ito, Y., Ikeguchi, M., Komoriya, Y., Iino, R., Noji, **2012**. H. Molecular mechanism of ATP hydrolysis in F<sub>1</sub>-ATPase revealed by molecular si-

- mulations and single-molecule observations. *Journal of the American Chemical Society*. 134, 8447-8454.
- 84) Henzler-Wildman, K., Kern, D. **2007**. Dynamic personalities of proteins. *Nature*. 465, 964-972.
- 85) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1659>
- 86) Hoffman, A. **2010**. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. Chapter 12. Cambridge University Press. United Kingdom.
- 87) Hutton L. R., Boyer, P. D. **1979**. Subunit interaction during catalysis. Althernating site cooperativity of mitochondrial adenosine triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*. 254, 9990-9993.
- 88) Indyk, L., Fisher, H. F. **1998**. Theoretical aspects of isothermal titration calorimetry. *Methods in Enzymology*. Academic Press. 295, 350-364.
- 89) Ito, Y., Ikeguchi, M. **2010**. Structural fluctuation and concerted motions in F<sub>1</sub>-ATPase: A molecular dynamics study. *Journal Computation Chemistry*. 31, 2175–2185.
- 90) Ito, Y., Ikeguchi, M. **2014**. Molecular dynamics simulations of F<sub>1</sub>-ATPase. Protein Conformational Dynamics, *Advances in Experimental medicine and Biology*. Chapter 17. Springer International Publishing Switzerland. 411-440.
- 91) Ito, Y., Ikeguchi, M. **2015**. Mechanism of the  $\alpha\beta$  conformational change in F<sub>1</sub>-ATPase after ATP hydrolysis: free-energy simulations. *Biophysical Journal*. 108, 85–97.
- 92) Itoh, H., Takahashi, A., Adachi, K., Noji, R. Tasuda, R., Yoshida, M., Kinosita Jr, K. **2004**. Mechanically driven ATPsynthesis by F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature*. 427, 465-468.
- 93) Jault, J., Allison, W. **1993**. Slow binding of ATP to non catalytic nucleotide binding sites wich accelerates catalysis is responsible for apparent negative cooperativity exhibit by the bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. 268, 1558-1566.
- 94) Jault, J. M., Kaibara, C., Yoshida, M., Garrod, S., Allison, W. S. **1994**. Probing the specificity of nucleotide binding to the F<sub>1</sub>-ATPase from thermophilic *Bacillus PS3* and its isolated  $\alpha$  and  $\beta$  subunits with 2-N<sub>3</sub>-( $\beta,\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 310, 282-288.
- 95) Jault, J. M., Dou, C, Grodsky, N. B., Matsui, T., Yoshida, M., Allison, W. S. **1996**. The  $\alpha_3\beta_3\gamma$  subcomplex of the F<sub>1</sub>-ATPase from thermophilic *Bacillus PS3* with the  $\beta$ T165S substitution does not entrap inhibitory MgADP in a catalytic site during turnover. *Journal of Biological Chemistry*. 271, 28818-28824.
- 96) Jun, N., Sohn, J. H., Yeh, B. I., Choi, J. W., Kim, H. W. **2011**. Observation of asymmetry amongst nucleotide binding sites of F<sub>1</sub>-ATPase of *Escherichia coli* by <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Bulletin Korean Chemistry Society*. 32, 531-535.
- 97) Junge, W., Sielaff, H., Engelbrecht, S. **2009**. Review article torque generation and elastic power transmission in the rotary F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature*. 459, 364-370.
- 98) Junge, W., Nelson, N. **2015**. ATP synthase. *Annual Review Biochemistry*. 84, 631-657. 2012.
- 99) Kabaleeswaran, V., Puri, N., Walker, J. E., Leslie, A. G. W., Muller, D. M. **2006**. Novel features of the rotary catalytic mechanism revealed in the structure of yeast F<sub>1</sub>-ATPase. *EMBO Journal*. 25, 5433-5442.
- 100) Kabaleeswaran, V., Shen, H., Symersky, J., Walker, J. E., Leslie, A. G. W. **2009**. Asymmetric structure of the yeast F<sub>1</sub> ATPase in the absence of bound nucleotides. *Journal of Biological Chemistry*. 284, 10546-10551.



- 101) Kalashnikova, T. Y., Milgrom, Y. M., Murataliev, M. B. **1988**. The effect of inorganic pyrophosphate on the activity and Pi-binding properties of mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase. *European Journal of Biochemistry*. 177, 213-218.
- 102) Kamisetty, H., Ramanathan, A., Bailey-Kellogg, C., Langmead C. J. **2011**. Accounting for conformational entropy in predicting binding free energies of protein-protein interactions. *Proteins*. 79, 444-462.
- 103) Kato-Yamada, Y., Yoshida, M., Hisabori, T. 2000. Movement of the helical domain of the  $\epsilon$  subunit is required for the activation of thermophilic F<sub>1</sub>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. 275, 35746-35750.
- 104) Kikuchi, Y., Naka, Y., Osakabe, H., Okamoto, T., Masaike, T., Ueno, H., Toyabe, S., Muneyuki, E. **2013**. Thermodynamic analyses of nucleotide binding to an isolated monomeric  $\beta$  subunit and the  $\alpha_3\beta_3\gamma$  subcomplex of F<sub>1</sub>-ATPase. *Biophysical Journal*. 105, 2541-2548.
- 105) Kironde F. A. S., Cross, R. L. **1987**. Adenine nucleotide binding sites on beef heart F<sub>1</sub>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. 262, 3488-3495.
- 106) Kleinekathöfer, U., Isralewitz, B., Dittrich, M., Schulten, K. **2011**. Domain motion of individual F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$ -subunits during unbiased molecular dynamics simulations. *Journal of Physical Chemistry*. 115, 7267-7274.
- 107) Koga, N., Takada, S. **2006**. Folding based molecular simulations reveal mechanisms of the rotary motor F<sub>1</sub>-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 103, 5367-5372.
- 108) Kozlov, I. A., Milgrom, Y. M. **1980**. The non-catalytic nucleotide-binding site of mitochondrial ATPase is localised on the  $\alpha$ -Subunit(s) of Factor F<sub>1</sub>. *European Journal of Biochemistry*. 106, 457-462.
- 109) Kumar, A., Manimekalai, M. S. S., Balakrishna, A. M., Jeyakanthna, J., Grüber, G. **2010**. Nucleotide binding states of subunit A of the A-ATP synthase and the implication of P-loop switch in evolution. *Journal Molecular Biology*. 396, 301-320.
- 110) Ladbury, J. E., Chowdry, B. Z. **1996**. Sensing the heat: application of Isothermal Titration Calorimetry to thermodynamics studies of biomolecular interactions. *Chemistry and Biology*. 3, 791-801.
- 111) Laidler, K., Meiser, H. **2003**. Fisicoquímica. 2da Edición Ingles-1ra Edición español. Quinta reimpression. Houghton Mifflin Company. Boston, EUA.
- 112) Levy, R., Zhang, L. Y., Gallicchio, E., Felts, A. K. **2003**. On the nonpolar hydration free energy of proteins: surface area and continuum solvent models for the solute-solvent interaction energy. *Journal of American Chemical Society*. 125, 9523-9530.
- 113) Li, W., Brudecki, L. E., Senior, A. E., Ahmad, Z. **2009**. Role of  $\alpha$ -subunit VISIT-DG sequence residues Ser-347 and Gly-351 in the catalytic sites of *Escherichia coli* ATP synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 284, 10747-10754.
- 114) Liang, Y., Ackerman, S. H. **1996**. Characterization of mutation in the  $\beta$  subunit of the mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase that produce defects in enzyme catalysis and assembly. *Journal Biological Chemistry*. 271, 26522-26528.
- 115) Lino, R., Noji, H. **2013**. Intersubunit coordination and cooperativity in ring-shaped NTPases. *Current Opinion in Structural Biology*. 23, 1-6
- 116) Liu, M. S., Todd, D. B., Sadus, R. J. **2006**. Dynamic and coordinating domain motions in the active subunits of the F<sub>1</sub>-ATPase molecular motor. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1764, 1553-1560.
- 117) Löbau, S., Weber, J., Wilke-Mounts, S., Senior, A. E. **1997**. F<sub>1</sub>-ATPase, roles of three catalytic site residues. *Journal of Biological Chemistry*. 272, 3648-3656.

- 118) Löbau, S., Weber, J., Senior, A. E. **1998**. Catalytic site nucleotide binding and hydrolysis in F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase. *Biochemistry*. 37, 10846-10853.
- 119) Lodeyro, A. F., Castelli, M. V., Roveri, O. A. **2008**. ATP hydrolysis-driven H<sup>+</sup> translocation is stimulated by sulfate, a strong inhibitor of mitochondrial ATP synthesis. *Journal of Bioenergetics Bio-membranes*. 40, 269-279.
- 120) Losada, M., Vargas, M. A., de la Rosa, M. A., Florencio, F. J. **1999**. Los elementos y moléculas de la vida. Vol I y II, Editorial Rueda, Madrid.
- 121) Lösel, R. M., Wise, J. G., Vogel, P. D. **1997**. Asymmetry of catalytic but not of non catalytic sites on *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase in solution as observed using electron spin resonance spectroscopy. *Biochemistry*. 36, 118-1193.
- 122) Ma, J., Flynn, T. C., Cui, Q., Leslie, A. G. W., Walker, J. E., Karplus, M. **2002**. A dynamic analysis of the rotation mechanism for conformational change in the F<sub>1</sub>-ATPase. *Structure*. 10, 921-931.
- 123) Malyan, A. N. **2013**. Noncatalytic nucleotide binding sites: properties and mechanism of involvement in ATP synthase activity regulation. *Biochemistry*. 78, 1512-1523.
- 124) Mao, H. Z., Weber, J. **2007**. Identification of the β<sub>TP</sub> site in the x-ray structure of F<sub>1</sub>-ATPase as the high-affinity catalytic site. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 104, 18478-18483.
- 125) Matsui, T., Yoshida, M. **1995**. Expression of the wild-type and the Cys-/Trp-less α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γ complex of thermophilic F<sub>1</sub>-ATPase in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1231, 139-146.
- 126) Matsui, T., Muneyuki, E., Honda, M., Allison, W. S., Dou, C., Yoshida, M. **1997**. Catalytic activity of the α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γ complex of F<sub>1</sub>-ATPase without noncatalytic nucleotide binding site. *Journal of Biological Chemistry*. 272, 8215-8221.
- 127) Matsuno-Yagi, A., Hatefi, Y. **1988**. Estimation of the turnover number of bovine heart F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> complexes for ATP synthesis. *Biochemistry*. 27, 335-340.
- 128) Meister M, Lowe G, Berg H C. **1987**. The proton flux through the bacterial flagellar motor. *Cell* 49: 643-50.
- 129) Menz, R. I., Walker, J. E., Leslie, A. G. W. **2001**. Structure of bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: Implications for the mechanism of rotary catalysis. *Cell*. 106, 331-341.
- 130) Milgrom, Y. M., Boyer, P. D. **1990A**. The ADP that binds tightly to nucleotide depleted mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase and inhibits catalysis is bound at a catalytic site. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1020, 43-48.
- 131) Milgrom, Y., Ehler, L., Boyer, P. **1990B**. ATP binding at non catalytic sites of soluble chloroplast F<sub>1</sub>-ATPase is required for expression of the enzyme activity. *Journal of Biological Chemistry*. 266, 14238-14242.
- 132) Milgrom, Y. M., Ehler, L. L., Boyer, P. D. **1991**. The characteristics and effect on catalysis of nucleotide binding to noncatalytic sites of chloroplast F<sub>1</sub>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. 266, 11551-11558.
- 133) Milgrom, Y. M., Cross, R. L. **1993**. Nucleotide binding sites on beef heart mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. 268, 23179-23185.
- 134) Milgrom, Y. M., Murataliev, M. B., Boyer, P. D. **1998**. Bi-site activation occurs with the native and nucleotide depleted mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochemical Journal*. 330, 1037-1043.

- 135) Milgrom, Y. M., Cross, R. L. **2005**. Rapid hydrolysis of ATP by mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase correlates with the filling of the second of three catalytic sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 102, 13831-13836.
- 136) Minkov, I. B., Fitin, A. F., Vasilyeva, E. A., Vinogradov, A. D. **1979**. Mg<sup>2+</sup>-induced ADP-dependent inhibition of the ATPase activity of beef heart mitochondrial coupling factor F<sub>1</sub>. *Biochemical and Biophysical research communications*. 89, 1300-1306.
- 137) Miyauchi, M., Tozawa, K., Yoshida, M. **1995**. F<sub>1</sub>-ATPase  $\alpha$ -subunit made up from two fragments (1-395, 396-503) is stabilized by ATP and complexes containing it obey altered kinetics. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1229, 225-232.
- 138) Mukherjee, S., Warchel, A. **2011**. Electrostatic origin of the mechanochemical rotary mechanism and the catalytic dwell of F<sub>1</sub>-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 108, 20550-20555.
- 139) Mukherjee, S., Warshel, A. **2012**. Realistic simulations of the coupling between the protomotive force and the mechanical rotation of the F<sub>0</sub>-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 109, 14876-81.
- 140) Murataliev, M. B., Boyer, P. D. **1992**. The mechanism of stimulation of MgATPase activity of chloroplast F<sub>1</sub>-ATPase by non-catalytic adenine nucleotide binding. *Federation of European Biochemical Societies*. 209, 681-687.
- 141) Myers, J. A., Boyer, P. A. **1983**. Catalytic properties of the ATPase on submitochondrial particles after exchange of tightly bound nucleotides under different steady state conditions. *Federation of European Biochemical Societies*. 162, 277-281.
- 142) Nakanishi-Matsui, M., Sekiye, M., Futai, M. **2013**. Rotating proton pumping ATPases: subunit/subunit interactions and thermodynamics. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 65, 247-25.
- 143) Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., Kinosita Jr, K. **1997**. Direct observation of the rotation of F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature*. 386, 299-302.
- 144) Odaka, M., Kaibara, C., Amano, T., Matsui, T., Muneyuki, E., Ogasahara, K., Yutani, K., Yoshida, M. **1994**. Tyr-341 of the  $\alpha$  subunit is a major K<sub>d</sub>-determining residue of TF<sub>1</sub>-ATPase: Parallel effect of its mutations on K<sub>d(ATP)</sub> of the  $\alpha$  subunit and on K<sub>m(ATP)</sub> of the  $\alpha_3\beta_3\gamma$  complex. *Journal of Biochemistry*. 115, 789-796.
- 145) Ohta, S., Tsubo, M., Oshima, T., Yoshida, M., Kagawa, Y. **1980** Nucleotide binding to isolated  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of proton translocating adenosine triphosphatase studied with circular dichroism, *Journal of Biochemistry*. 87, 1609-1617.
- 146) Ohta, S., Yohda, M., Ishizuka, M., Hirata, H., Hamamoto, T., Otawara-Hamamoto, Y., Matsuda, K., Kagawa, Y. **1988**. Sequence and over-expression of subunits of adenosine triphosphate synthase in thermophilic bacterium PS3. *Biochimica et Biophysica Acta*. 933, 141-155.
- 147) Okazaki, K., Takada, S. **2011**. Structural comparison of F<sub>1</sub>-ATPases: interplay among enzyme structures, catalysis and rotations. *Structure*. 19, 588-598.
- 148) Ono, S., Hara, K. Y., Matsui, T., Noji, H., Yoshida, M., Muneyuki, E. **2003**. Origin of apparent negative cooperativity of F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1607, 35-44.
- 149) Oster, G., Wang, H. **2000**. Why is the mechanical efficiency of F<sub>1</sub>-ATPase so high?. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 32, 459-469.
- 150) Pänke, O., Cherepanov, D. A., Gumbiowski, K., Engelbrecht, S., Junge, W. **2001**. Viscoelastic dynamics of actin filaments coupled to rotary F<sub>1</sub>-ATPase: angular torque profile of the enzyme. *Biophysical Journal*. 81, 1220-1233.

- 151) Penefsky, H. S., Pullman, M. E., Datta, A. & Racker, E. **1960**. Partial resolution of the enzyme catalyzing oxidative phosphorylation. II. Participation of a soluble adenosine triphosphatase in oxidative phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 235, 3330–3336.
- 152) Pérez-Hernández, G., García-Hernández, E., Zubillaga, R. A., Tuena de Gómez-Poyou, M. **2002**. Structural energetics of MgADP binding to the isolated  $\beta$  subunit of  $F_1$ -ATPase from thermophilic *Bacillus PS3*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 408, 177–183.
- 153) Perozzo, R., Folkers, G., Scapozza, L. **2004**. Thermodynamics of protein-ligand interactions: History, presence, and future aspects. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 24, 1-52.
- 154) Pogoryelov D, Klyszejko A, Krasnoselska G, Heller E, Leone V, Langer J, Vonck J, Müller D, Faraldo-Gómez J, Meier T. **2012**. Engineering rotor ring stoichiometries in the ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 109, E1599-E1608
- 155) Prabhu, N. V., Sharp, K. A. **2004**. Heat capacity in proteins. *Annual Review Physical Chemistry*. 56, 521-548.
- 156) Pu, J., Karplus, M. **2008**. How subunit coupling produces the  $\gamma$ -subunit rotary motion in  $F_1$ -ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 105, 1192-1197.
- 157) Pulido, O., Chavelas, E. A., Torner, F. J., García-Hernández, E. **2008**. Current application of isothermal titration calorimetry to the study of protein complexes. *Advances in protein physical chemistry*. Transworld Research Networks. 1a Ed. Pag: 115-138.
- 158) Pulido, N. O., Salcedo, G., Pérez-Hernández, G., José-Núñez, C., Velázquez-Campoy, A., García-Hernández, E. **2010**. Energetic effects of magnesium in the recognition of adenosine nucleotides by the  $F_1$ -ATPase  $\beta$  subunit, *Biochemistry*. 49, 5258–5268.
- 159) Pullman M, E., Penefsky, H. S., Datta, A. Racker, E. **1960**. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*. 235, 3322–3329.
- 160) Ramakrishnan, C., Dani, V. S., Ramasarma, T. **2002**. A conformational analysis of Walker motif A [GXXXXGKT(S)] in nucleotide-binding and other proteins. *Protein Engineering*. 15, 783-798.
- 161) Ren, H., Allison, W. A. **2000**. Substitution of  $\beta$ Glu201 in the  $\alpha_3\beta_3\gamma$  subcomplex of the  $F_1$ -ATPase from thermophilic *Bacillus PS3* increases the affinity of catalytic sites nucleotides. *Journal Biological Chemistry*. 275, 10057-10063.
- 162) Richard, P., Pitard, B., Rigaud, J. L. **1995**. ATP synthesis by the  $F_0F_1$  ATPase from thermophilic *Bacillus PS3* co-reconstituted with bacteriorhodopsin into liposomes. *Journal of Biological Chemistry*. 270, 21571-21578.
- 163) Rees, D., Montgomery, M., Leslie, A., Walker, J. **2012**. Structural evidence of a new catalytic intermediate in the pathway of ATP hydrolysis by  $F_1$ -ATPase from bovine heart mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 109, 11139-11143.
- 164) Robinson, G., Bason, J., Montgomery, M., Fearnley, I., Muller, D., Leslie, A., Walker, J. **2013**. The structure of  $F_1$ -ATPase from *Saccharomyces cerevisiae* inhibited by its regulatory protein IF<sub>1</sub>. *Open Biology*. 3, 120164.
- 165) Saita, E., Suzuki, T., Yoshida, M. **2015**. Simple mechanism whereby the  $F_1$ -ATPase motor rotates with near perfect chemomechanical energy conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 112, 9626-9623.
- 166) Salcedo, G. **2008**. Efectos energéticos del magnesio en el reconocimiento de ADP por la subunidad  $\beta$  de la ATP-sintasa de *Bacillus PS3*. Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM.

- 167) Salcedo, G., Cano-Sánchez, P., de Gómez-Puyou, MT., Velázquez-Campoy, A., García-Hernández, E. **2014**. Isolated noncatalytic and catalytic subunits of F<sub>1</sub>-ATPase exhibit similar, albeit not identical, energetic strategies for recognizing adenosine nucleotides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1837, 44-50.
- 168) Schäfer I., Bailer, S., Düser M., Börsh M., Bernal, R., Stock, D., Grüber, G. **2006**. Crystal structure of the Archeal A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> ATP Synthase subunit B from *Methanosarcina mazei* Gö1: Implications of nucleotide-binding differences in the major A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> Subunits A and B. *Journal of Molecular Biology*. 358, 725-740.
- 169) Schep, D., Zhao, J., Rubinstein, J. **2016**. Models for the a subunits of the *Thermus thermophilus* V/A-ATPase and *Saccharomyces cerevisiae* V-ATPase enzymes by cry-EM and evolutionary covariance. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 113, 3245-3250.
- 170) Scheider, B., Sigalat, C., Amano, T., Zimmermann, J. L. **2000**. Evidence for changes in the nucleotide conformation in the active site of H<sup>+</sup>-ATPase as determined by pulsed EPR spectroscopy. *Biochemistry*. 39, 15500-15512.
- 171) Schneider, E. D., Kay, J. J. **1994**. Life as a manifestation of the second law of thermodynamics. *Mathematical and Computer Modelling*. 19, 25-48.
- 172) Senior, A. E., Lee, R. S.F., Al-Shawi, M. K., Weber, J. **1992**. Catalytic properties of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase depleted of endogenous nucleotides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 297, 340-344.
- 173) Senior, A. E., Muharemagi, A., Wilke-Mounts, S. **2006**. Assembly of the stator in *Escherichia coli* ATP synthase. Complexation of  $\alpha$  subunit with other F<sub>1</sub> subunits is prerequisite for delta subunit binding to the N-terminal region of alpha. *Biochemistry*. 45, 15893-15902.
- 174) Shen, H., Sosa-Peinado, A., Muller, D. M. **1996**. Intragenic suppressors of P-loop mutations in the  $\beta$ -subunit of the mitochondrial ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 271. 11844-11851.
- 175) Shirakihara, Y., Leslie, A.G.W., Abrahams, J. P., Walker, J. E., Ueda, T., Sekimoto, Y., Kambara, M., Saika, K., Kagawa, Y., Yoshida, M. **1997**. The crystal structure of the nucleotide-free  $\alpha_3\beta_3$  subcomplex of F<sub>1</sub>-ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3* is a symmetric trimer. *Structure*. 5, 825-836.
- 176) Stewart, A., Solti, M., Harvey, R., Stock, D. **2013**. Rotary ATPases. Models, machine elements and technical specifications. *BioArchitecture*. 3, 2-12.
- 177) Strajbl, M., Shurki, A., Warshel, A. **2003**. Converting conformational changes to electrostatic energy in molecular motors: the energetics of ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 14834-14839.
- 178) Strajbl, M., Warshel, A. **2003**. Converting Conformational Changes to Electrostatic Energy in Molecular Motors: The Energetics of ATP Synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 100, 14834
- 179) Stryer, L. B., Tymoczko, J. **2003**. Bioquímica. Ed Reverte, 5<sup>o</sup> edición.
- 180) Toyabe, S., Watanabe-Nakayama, T., Okamoto, T., Kudo, S., Mujeyuki, E. **2011**. Thermodynamic efficiency and mechanochemical coupling of F<sub>1</sub>-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 108, 17951-17956.
- 181) Tsunoda, S. P., Muneyuki, E., Amano, T., Yoshida, M., Noji, H. 1999. Cross-linking of two  $\beta$ subunits in the closed conformation in F<sub>1</sub>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. 274, 5701-5706.
- 182) Uchihashi, T., Lino, R., Ando, T., Noji, H. **2011**. High-Speed Atomic Force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F<sub>1</sub>-ATPase. *Science*. 333, 755-758.

- 183) Velazquez-Campoy, A., Ohtaka, H., Nezami, A., Muzammil, S., Freire, E. **2004** Isothermal Titration Calorimetry. *Current Protocols in Cell Biology*. Doi: 10.1002/0471143030.cb1708s23
- 184) Velazquez-Campoy, A., Markova, N. **2015**. Isothermal Titration Calorimetry: *Theory and Practice*. Malvern Instrument Worldwide, whitepaper. 1-19.
- 185) von Ballmoos, C., Wiedenmann, A., Dimroth, P. **2009**. Essentials for ATP synthesis by F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase. *Annual Review of Biochemistry*. 78, 649-72.
- 186) Walker, J. **2013**. The ATP synthase: understood, the uncertain and the unknown. *Biochemical Society Transactions*. 41, 1-16.
- 187) Watanabe, R., Iino, R., Noji, H. **2010**. Phosphate release in F<sub>1</sub>-atpase catalytic cycle follows ADP release. *Nature Chemical Biology*. 6, 814-820.
- 188) Weber, J., Wilke-Mounts, S., Grell, E., Senior, A. E. **1994A**. Tryptophan fluorescence provides a direct probe of nucleotide binding in the noncatalytic sites of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATP-ase. *Journal of Biological Chemistry*. 269, 11261-11268.
- 189) Weber, J., Wilke-Mounts, S., Senior, A. E. **1994B**. Cooperativity and stoichiometry of substrate binding to the catalytic site of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. 269, 20462-20467.
- 190) Weber, J., Senior, A. E., **1995A**. Location and properties of pyrophosphate-binding sites in *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. 270, 12653-12658.
- 191) Weber, J., Bowman, C., Wilke-Mounts, S., Senior, A. E. **1995B**.  $\alpha$ -Aspartate 261 is a key residue in noncatalytic sites of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. 270, 21045-21049.
- 192) Weber, J., Senior, A. E. **2004**. Fluorescent probes applied to catalytic cooperativity in ATP synthase. *Methods in Enzymology*. 380, 132-152.
- 193) White, D., Sharp, R. J., Priest, F. G. **1993-1994**. A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from a wide geographical area. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 64, 357-386.
- 194) Wilkens, S., Rodgers, A., Ogilvie, I., Capaldi, R. A. **1997**. Structure and arrangement of the delta subunit in the *E. coli* ATP synthase (ECF<sub>1</sub>F<sub>0</sub>). *Biophysical Chemistry*. 68, 95-102.
- 195) Wiseman, T., Williston, S., Brands, F., Lin, L. N. **1989**. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new calorimeter. *Analytical Biochemistry*. 179, 131-137.
- 196) Xing, J., Liao, J. C., Oster, G. **2005**. Making ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 102, 16539-16546.
- 197) Yagi, H., Tozawa, N., Iwabuchi, T., Yoshida, M., Akutsu, H. **1999**. Functional conformation changes in the TF<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$  subunit proved by 12 tyrosine residues. *Biophysical Journal*. 77, 2175-2183.
- 198) Yagi, H., Tsujimoto, T., Yamazaki, T., Yoshida, M., Akutsu, H. **2004**. Conformational change of H<sup>+</sup>-ATPase  $\beta$  monomer revealed on segmental isotope labeling NMR spectroscopy. *Journal of American Chemical Society*. 126, 16632-16638.
- 199) Yagi, H., Kajirawa, N., Iwabuchi, T., Izumi, K., Yoshida, M., Akutsu, H. **2009**. Stepwise propagation of the ATP-induced conformational change of the F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$  subunit revealed by NMR, *Journal of Biological Chemistry*. 284, 2374-2382.
- 200) Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M., Kinoshita Jr, K., Itoh, H. **2001**. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature*. 410, 898-904.

- 201) Yoshida, M., Allison, W. S., **1986**. Characterization of the catalytic and noncatalytic ADP binding sites of F<sub>1</sub>-ATPase from the thermophilic bacterium, PS3. *Journal of Biological Chemistry*. 261, 5714-5721.
- 202) Yoshida, M., Muneyuki, E., Hisabori, T. **2001**. ATP Synthase- A marvellous Rotary Engine of the cell. *Nature Reviews*. 2, 662-677.
- 203) Zhou, Y. T., Duncan, T. M., Cross, R. L. **1997**. Subunit rotation in *Escherichia coli* F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase during oxidative phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 94, 10583-10587.
- 204) Zimmermann, J. L., Amano, T., Sigalat, C. **1999**. Identification and characterization of Mg<sup>2+</sup> binding sites in isolated  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of H<sup>+</sup>-ATPase from *Bacillus PS3*. *Biochemistry*. 38, 15343-15351.
- 205) Zimmermann, J. L., Schneider, B., Morlet, S., Amano, T., Sigalat, C. **2000**. The role of the Mg<sup>2+</sup> cation in ATP synthase studied by electron paramagnetic resonance using VO<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> paramagnetic probes. *Spectrochimica Acta Part A*. 56, 285-299.

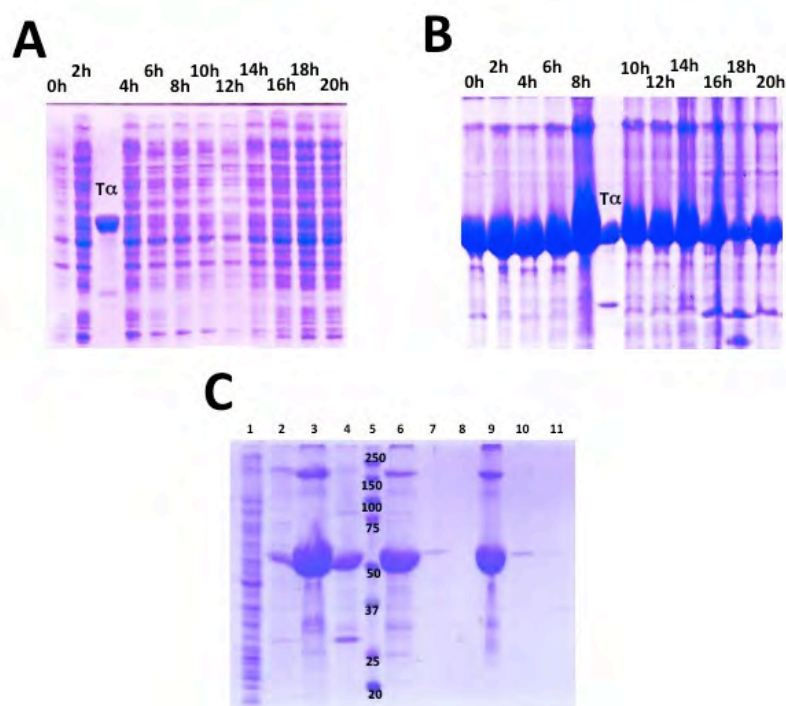
# 11. Apéndice

## Apéndice A. Agregación Subunidad $\alpha$ de *Bacillus PS3* ( $T\alpha$ )

### A.1 Purificación de la subunidad $\alpha$ con colas de histidina ( $T\alpha$ -His)

La subunidad  $T\alpha$ -His expresada en la cepa BL21 de *E. coli*, mostró estar agregada y formar cuerpos de inclusión, a diferentes horas de inducción se observó que el aumento de proteína agregada se encontraba en la fracción insoluble (Figura A1). El uso de cepas como CD41, Turner, Rossetta, Rossetta-gammi, no mostraron mejorar la presencia de proteína expresada en la fracción soluble.

Los cuerpos de inclusión generados por la producción de  $T\alpha$ -His en la cepa Rossetta se purificaron con lavados de tritón para eliminar las proteínas hidrofóbicas y membranales y se solubilizaron con urea 8 M. La solución solubilizada se adsorbió en la resina de Ni-NTA, la concentración de urea se disminuyó con un gradiente lineal de 8 M a 0 M de urea en 25 volúmenes de columna. La elución de la proteína se llevo a cabo con 10 volúmenes de columna con un gradiente lineal de imidazol, (Figura A1-C) En la misma figura se observa que esta se despega con el aumento de imidazol con un rango de 350-500 mM.

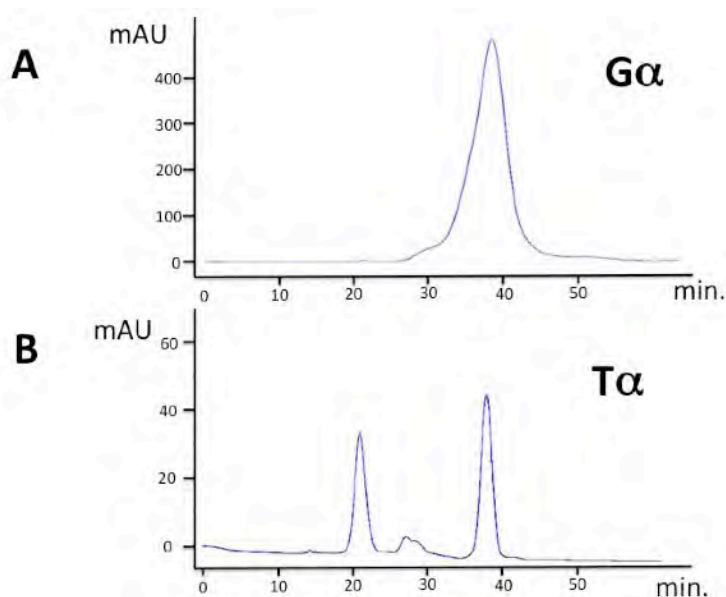


**Figura A1.** Sobreexpresión de  $T\alpha$ -His en Rossetta a diferentes tiempos de inducción. A) Fracción soluble. Los carriles muestran el contenido de la muestra tomada a la hora indicada. El carril con el estándar de  $T\alpha$  se señala. B) Fracción insoluble. Carriles igual que A. En el carril 7 se observa el estándar. C) Purificación de  $T\alpha$ -His a partir de cuerpos de inclusión. Carriles: 1, sobrenadante amortiguador de lisis, 2, sobrenadante amortiguador aislamiento. 3, Ni-NTA. 4, precipitado amortiguador de unión. 5, Marcador de peso molecular. 6, lavado columna Ni-NTA. 7-12, elución de 0-500mM de imidazol. Los pesos del marcador molecular se muestran del lado izquierdo del gel.



## A.2 Agregación de la subunidad $\alpha$ de *Bacillus PS3* ( $T\alpha$ ) y de *Geobacillus kaustophilus* ( $G\alpha$ )

Para determinar el estado de agregación de la subunidad  $\alpha$ , una muestra de 3 mg/mL se paso por la columna Superdex 200, observándose un solo pico de elución para la subunidad de *G. kaustophilus* en un tiempo correspondiente a pesos de alrededor de 50 kDa (Figura A2-A). Mientras que para la subunidad  $\alpha$  de *Bacillus PS3* se observan picos de diversos tamaños (Figura A2-B).



**Figura A2.** Superdex 200 para las subunidad  $\alpha$ . A. *Geobacillus kaustophilus*; B. *Bacillus PS3*. Las subunidades purificadas y concentradas a 3mg/mL fueron cargadas y eluidas en amortiguador: Tris-HCl 50 mM, 250 mM NaCl, 10% glicerol, pH 8.

## Apéndice B. Artículos producto de esta investigación



# Isolated noncatalytic and catalytic subunits of $F_1$ -ATPase exhibit similar, albeit not identical, energetic strategies for recognizing adenosine nucleotides

Guillermo Salcedo<sup>a</sup>, Patricia Cano-Sánchez<sup>a</sup>, Marietta Tuena de Gómez-Puyou<sup>b</sup>, Adrián Velázquez-Campoy<sup>c,d,e</sup>, Enrique García-Hernández<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04510, D.F., Mexico

<sup>b</sup> Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04510, D.F., Mexico

<sup>c</sup> Institute of Biocomputation and Physics of Complex Systems (BIFI), Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

<sup>d</sup> Department of Biochemistry and Molecular and Cell Biology, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

<sup>e</sup> Fundacion ARAID, Government of Aragon, Zaragoza, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 13 June 2013

Received in revised form 21 August 2013

Accepted 22 August 2013

Available online 30 August 2013

### Keywords:

$F_1$ -ATPase

Binding energetics

Isothermal titration calorimetry

Isolated subunit

Heterotropic cooperativity

Metal binding

## ABSTRACT

The function of  $F_1$ -ATPase relies critically on the intrinsic ability of its catalytic and noncatalytic subunits to interact with nucleotides. Therefore, the study of isolated subunits represents an opportunity to dissect elementary energetic contributions that drive the enzyme's rotary mechanism. In this study we have calorimetrically characterized the association of adenosine nucleotides to the isolated noncatalytic  $\alpha$ -subunit. The resulting recognition behavior was compared with that previously reported for the isolated catalytic  $\beta$ -subunit (N.O. Pulido, G. Salcedo, G. Pérez-Hernández, C. José-Núñez, A. Velázquez-Campoy, E. García-Hernández, Energetic effects of magnesium in the recognition of adenosine nucleotides by the  $F_1$ -ATPase  $\beta$  subunit, *Biochemistry* 49 (2010) 5258–5268). The two subunits exhibit nucleotide-binding thermodynamic signatures similar to each other, characterized by enthalpically-driven affinities in the  $\mu$ M range. Nevertheless, contrary to the catalytic subunit that recognizes MgATP and MgADP with comparable strength, the noncatalytic subunit much prefers the triphosphate nucleotide. Besides, the  $\alpha$ -subunit depends more on Mg(II) for stabilizing the interaction with ATP, while both subunits are rather metal-independent for ADP recognition. These binding behaviors are discussed in terms of the properties that the two subunits exhibit in the whole enzyme.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Rotary enzymes are among the most sophisticated molecular devices in nature. The ability of these enzymes to interconvert mechanical and chemical energies is used in processes such as ATP

synthesis and ATP-driven ion transport across membranes [1].  $F_1$  subcomplex, the water-soluble sector of  $F_0F_1$ -ATP synthase that carries the catalytic machinery, is one of the most thoroughly-studied motor enzymes [2–5]. In its minimal architecture with full ATPase activity,  $F_1$  is a heptamer composed of three different subunits:  $\alpha_3\beta_3\gamma$ . Each  $\beta$ -subunit has a catalytic site which is complemented with some residues of the adjacent  $\alpha$ -subunit. Conversely, three noncatalytic sites are located at the  $\alpha$ -/ $\beta$ -subunit interfaces. Although many aspects of  $F_1$ 's rotary mechanism remain to be clarified, the available wealth of experimental and theoretical data has provided the basis for a deep understanding of the complex role played by catalytic subunits. Studies in the last decade based on single-molecule spectroscopy have been particularly insightful in unveiling the basic coupling scheme for hydrolysis-driven rotation [4,6,7]. In contrast, the molecular basis for nucleotide recognition and inter-subunit communication by noncatalytic subunits is much less understood.

$\alpha$ -Subunits have proven necessary for attaining maximum steady-state activity in  $F_1$ -ATPase and  $F_0F_1$ -ATP synthase from different species [8–10]. The presence of at least one active  $\alpha$ -subunit is necessary to

**Abbreviations:** Mg(II), free magnesium ion; ATP, adenosine 5'-triphosphate; ADP, adenosine 5'-diphosphate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; Tris, 2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol; MgCl<sub>2</sub>, magnesium chloride; ATPase, adenosine 5'-triphosphatase; TF1,  $F_1$  sector from *Bacillus PS3*; EF1,  $F_1$  sector from *Escherichia coli*; S1, S2 and S3, high, medium and low affinity  $\beta$ -subunit sites in  $F_1$ , respectively;  $\beta$ DP and  $\beta$ TP,  $\beta$  subunits in the crystal structure of  $F_1$  bound to Mg-ADP and Mg-AMPPNP, respectively; ITC, isothermal titration calorimetry; NMR, nuclear magnetic resonance;  $K_d$ , equilibrium dissociation constant;  $K_b$ , equilibrium binding constant;  $\Delta H_b$ , binding enthalpy;  $\Delta G_b$ , binding Gibbs free energy;  $\Delta S_b$ , binding entropy;  $K_{N1}$  and  $K_{N2}$ , step-wise association constants for the interaction of ATP with Mg(II);  $K_{PF}$  and  $K_{PB}$ , association constants for ATP and Mg-ATP binding to the subunit;  $\kappa$ , cooperative heterotropic association constant;  $\Delta g$ , cooperative Gibbs free energy;  $\Delta h$ , cooperative enthalpy;  $\Delta s$ , cooperative entropy

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 56 22 44 24.

E-mail address: [egarciah@unam.mx](mailto:egarciah@unam.mx) (E. García-Hernández).

release inhibitory MgADP entrapped at catalytic sites [11]. Recent studies based on high-speed atomic force microscopy have shown that catalytic sites in the  $\alpha_3\beta_3$  subcomplex, i.e., in the absence of the  $\gamma$ -subunit, also exhibit ATP-induced dynamic conformational changes and binding asymmetry [12]. This observation provides compelling evidence that  $\alpha$ -subunits do transmit conformational signals between  $\beta$ -subunits, confirming previous results [13–15]. It has been well-documented that isolated  $\beta$ -subunits undergo large conformational changes upon nucleotide binding, and that these closely resemble the transition between the open and closed conformations exhibited in  $F_1$  [16]. In contrast, available information indicates that the  $\alpha$ -subunit exhibits much more limited conformational changes upon ligand binding than those undergone by the  $\beta$ -subunit [17].

A deep understanding of the forces that drive conformational changes of  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits, as well as the coordination and cooperativity among them, is crucial to unveil the molecular basis of  $F_1$ -ATPase function. To pursue that goal, the nucleotide-recognition energetics of  $F_1$  needs to be known in detail. Nevertheless, the enzyme's complex mechanism, involving different modes of ligand and intercatyary interactions that take place in a coordinated and cooperative way among catalytic and noncatalytic subunits, has precluded unambiguous quantification of the underlying energetics [18]. To gain more insights into the forces governing  $F_1$  function, we have calorimetrically characterized the nucleotide-recognition ability of the isolated  $\alpha$ -subunit. Thermodynamic signatures for the interaction with metal-free and metal-bound nucleotides were obtained in order to assess the energetic role of Mg(II). Additionally, a comparison was performed with previously-reported binding properties of isolated  $\beta$ -subunit from thermophilic *Bacillus* PS3 [19,20]. Overall, the analysis reveals that the two isolated subunits exhibit very similar energetic strategies for recognizing nucleotides, in spite of the low identity of their polypeptide sequences. In turn, these properties correlate with binding behaviors exhibited by each subunit within  $F_1$ .

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

All chemicals, including ATP and ADP sodium salts, were from Sigma Chemical Co. Plasmids pGAB1 encoding full length  $F_1$  of ATPase were kindly provided by Hiroshi Omote (The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University).  $\alpha$ -Subunit of  $F_1$  was amplified by PCR and subcloned into BamHI and HindIII restricted pET28 vector (Novagen).

Early reports documented that isolated  $\alpha$ -subunits from different sources are prone to aggregate in solution [21,22]. We observed a similar behavior with recombinant  $\alpha$ -subunit from *Bacillus* PS3. The protein was stable as a monomer inasmuch as no stirring was applied. However, even mild stirring caused protein precipitation, a situation that precluded calorimetric measurements. Attempts to inhibit

aggregation (variation of pH, ionic force, osmolyte content, temperature) were unsuccessful. In view of these results, we decided to express the  $\alpha$ -subunit from *Geobacillus kaustophilus*, which differs from that of *Bacillus* PS3 by 12 residue substitutions, most of them occurring at the protein surface (Supplementary data). The *Geobacillus* subunit proved less prone to aggregation than the *Bacillus* subunit. In the presence of 10% glycerol, precipitation was minimal throughout an ITC experiment, as judged from visual inspections of the samples and from the resulting fitting binding stoichiometry (see footnote to Table 1). Therefore, the *Geobacillus*  $\alpha$ -subunit was used to perform thermodynamic characterizations.

### 2.2. Expression of recombinant *Geobacillus* $\alpha$ subunit

The recombinant  $\alpha$  subunit was overexpressed in *Escherichia coli* BL21 cells (Novagen) harboring plasmid p28- $\alpha$ . LB broth supplemented with kanamycin (30  $\mu$ g/ml) was used to grow cells at 37 °C. A 1:100 dilution for the overnight growth into fresh LB was made and allowed to grow until A600 reached 0.6. At this point, IPTG was added at 1 mM final concentration to induce protein expression. The cells were incubated for 4 h at 37 °C and harvested by centrifugation.

### 2.3. Protein purification

$\alpha$ -Subunit was purified to homogeneity as previously described [22]. In brief, harvested cells were lysed with lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 5 mM imidazole, 10% glycerol, pH 8.0) by sonication at 4 °C in a Misonix 3000 sonicator. The soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation (32,000  $\times$ g/45 min/4 °C) and analyzed by SDS-PAGE. The over production of recombinant protein was found in the soluble fraction. Recombinant His6-tagged  $\alpha$  subunit was purified by metal-chelate affinity chromatography using a HiTrap Ni<sup>2+</sup> column (GE Healthcare), followed by a Hi/prep Mono Q column (Amersham Biosciences).

All experiments were performed at 25 °C, in 0.05 M Tris-HCl buffer solution, pH 8.0, supplemented with 0.1 M NaCl and 10% glycerol. Purified  $\alpha$ -subunit was thoroughly dialyzed against the buffer solution prior to calorimetric measurements. Assays with metal-bound nucleotide were performed with ligand and protein solutions supplemented with 5 mM MgCl<sub>2</sub>. For the titration with Mg(II)-free nucleotide, 2 mM EDTA was used to sequester any residual trace of the metal. After degasification, protein concentration was determined using the modified Bradford assay (Bio-Rad, Germany). For ADP and ATP, an extinction coefficient of 15,600 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> at 259 nm was used. MgCl<sub>2</sub> and nucleotides were dissolved in the buffer solution obtained in the last dialysis. The solution's pH was re-adjusted to 8.0 using NaOH when necessary.

### 2.4. Isothermal titration calorimetry

Calorimetric measurements were carried out with a MicroCal™ iTC<sub>200</sub> System (GE Healthcare, Northampton, MA, USA).  $\alpha$ -Subunit concentration was typically 0.02–0.03 mM. The titration schedule consisted of 12–20 consecutive injections of 3  $\mu$ L with a 5-min interval between injections, using a stirring rate of 700 rpm. The dilution heat of the ligand was obtained by adding ligand to a buffer solution under conditions and injection schedule identical to those used with the protein sample. In the case of the titration of the  $\alpha$ -subunit with Mg(II)-free nucleotide, the binding constant ( $K_{P1}$ ) and the enthalpy change ( $\Delta H_{P1}$ ) were determined by the nonlinear fitting of a single binding-site model [23]. The resulting binding isotherms in the presence of Mg(II) were analyzed using a ternary model in which the  $\alpha$ -subunit (P) may bind AT(D)P or MgAT(D)P, while ATP may also be in the form of Mg<sub>2</sub>ATP (see Scheme 1). Derivation of the coupled-equilibria model has been

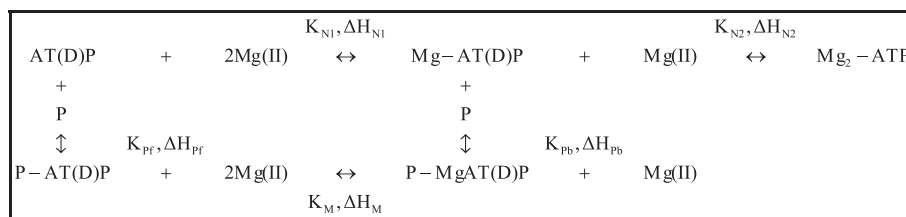
**Table 1**  
Binding energetics of the  $\alpha$ -subunit to free and Mg(II)-bound adenosine nucleotides<sup>a,b</sup>.

Ligand	$K_b^c \times 10^{-3}$ (M <sup>-1</sup> )	$\Delta G_b$ (kcal/mol)	$\Delta H_b$ (kcal/mol)	$-\Delta S_b$ (kcal/mol)
MgADP	62 ± 16	−6.5	−6.4 ± 0.2	−0.1
MgATP	616 ± 13	−8.1	−12.1 ± 1.2	4.0
ADP	27 ± 2	−6.1	−4.6 ± 0.2	−1.5
ATP	1.8 ± 0.1	−4.4	−3.9 ± 0.4	−0.5

<sup>a</sup> 25 °C, in a 0.05 M Tris-HCl buffer solution supplemented with 0.1 M NaCl and 10% glycerol (pH 8.0).

<sup>b</sup> In the presence of Mg(II), both nucleotides yielded a fitting binding stoichiometry of 1.04 ± 0.01. In the absence of the metal ion, the stoichiometry was fixed to 1 in order to get convergence in the fitting process.

<sup>c</sup>  $K_b$  corresponds to  $K_{P1}$  and  $K_{P2}$  in Scheme 1 for the binding of Mg(II)-free or Mg(II)-bound nucleotide to the subunit, respectively.



**Scheme 1.** Ternary binding equilibrium among isolated  $\alpha$ - or  $\beta$ -subunit of  $F_1$ -ATPase (P), Mg(II) and AT(D)P. The ability of ATP to form a bidentate complex with Mg(II) is indicated.

presented in detail elsewhere [20]. In brief, when applied to the interaction with MgATP, the binding model acquires the form:

$$\begin{aligned}
 q_i = V_0 & \left( \left( [P \cdot \text{ATP}]_i - [P \cdot \text{ATP}]_{i-1} \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right) \right) \Delta H_{P_f} \right. \\
 & + \left( [P \cdot \text{MgATP}]_i - [P \cdot \text{MgATP}]_{i-1} \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right) \right) (\Delta H_{P_b} + \Delta H_{N_1}) \\
 & + \left( [\text{MgATP}]_i - [\text{MgATP}]_{i-1} \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right) - F_{\text{MgATP}} [\text{ATP}]_0 \frac{v}{V_0} \right) \Delta H_{N_1} \\
 & \left. + \left( [\text{Mg}_2\text{ATP}]_i - [\text{Mg}_2\text{ATP}]_{i-1} \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right) - F_{\text{Mg}_2\text{ATP}} [\text{ATP}]_0 \frac{v}{V_0} \right) (\Delta H_{N_1} + \Delta H_{N_2}) \right) + q_{\text{dil}}
 \end{aligned} \quad (1)$$

where  $\Delta H_{P_f}$  and  $\Delta H_{P_b}$  are the enthalpy changes associated with the binding of ATP and MgATP to the  $\alpha$ -subunit, respectively;  $\Delta H_{N_1}$  and  $\Delta H_{N_2}$  are the enthalpy changes associated with the binding of the first and second Mg(II) to ATP, respectively, and  $q_{\text{dil}}$  is a fitting term introduced to account for experimentally uncorrected dilution heat effects. The correction terms including  $F_{\text{MgATP}}$  and  $F_{\text{Mg}_2\text{ATP}}$  (the fractions of ATP in the syringe with one and two magnesium atoms bound, respectively, that can be calculated from the total ATP and Mg(II) concentrations in the syringe and the ATP-Mg(II) binding constants) correspond to the MgATP and Mg<sub>2</sub>ATP complexes introduced in the cell just by injection and not due to equilibrium balance. Finally,  $[\text{ATP}]_0$  stands for the ATP concentration in the syringe,  $v$  for the injection volume, and  $V_0$  for the cell volume.

The total concentration of each species in Eq. (1) is related to the concentrations of free molecular counterparts through the equilibrium constants:

$$\begin{aligned}
 [\text{ATP}]_T &= [\text{ATP}] + K_{N_1} [\text{ATP}] [\text{Mg(II)}] + K_{N_1} K_{N_2} [\text{ATP}] [\text{Mg(II)}]^2 \\
 &+ K_{P_f} [P] [\text{ATP}] + K_{P_b} K_{N_1} [P] [\text{ATP}] [\text{Mg(II)}] [\text{Mg}]_T = [\text{Mg(II)}] \\
 &+ K_{N_1} [\text{ATP}] [\text{Mg(II)}] + 2K_{N_1} K_{N_2} [\text{ATP}] [\text{Mg(II)}]^2 \\
 &+ K_{P_b} K_{N_1} [P] [\text{ATP}] [\text{Mg(II)}] [\text{P}]_T = [P] + K_{P_f} [P] [\text{ATP}] \\
 &+ K_{P_b} K_{N_1} [P] [\text{ATP}] [\text{Mg(II)}].
 \end{aligned} \quad (2)$$

Finally, a parameter  $n$  was included as a normalization factor for correcting errors in protein concentration related to experimental determination and/or the presence of a fraction of inactive protein:

$$[P]_T = n[P]_0 \quad (3)$$

where  $[P]_0$  is the experimental concentration.  $K_{N_1}$ ,  $\Delta H_{N_1}$ ,  $K_{N_2}$ ,  $\Delta H_{N_2}$ ,  $K_{P_f}$  and  $\Delta H_{P_f}$  are determined directly from direct binary titrations.  $K_{P_b}$  and  $\Delta H_{P_b}$  are determined from the ternary experiments, once the other parameters have been previously determined. For the case of ADP, the model is adapted from the more general ATP model by simply setting  $K_{N_2} = \Delta H_{N_2} = 0$ .

The cooperativity in the binding of nucleotide and Mg(II) to the  $\alpha$ -subunit is contained in  $K_{P_2}$  and  $\Delta H_{P_2}$  relative to  $K_{P_1}$  and  $\Delta H_{P_1}$  values [24,25]:

$$\kappa = K_{P_2}/K_{P_1} = K_M/K_{N_1}, \quad (4)$$

$$\Delta h = \Delta H_{P_2} - \Delta H_{P_1} = \Delta H_M - \Delta H_{N_1} \quad (5)$$

where  $K_M$  and  $\Delta H_M$  stand for the association parameters of Mg(II) to the nucleotide-prebound  $\alpha$ -subunit. Finally, the cooperative entropy change can be calculated as:

$$T\Delta s = \Delta h - \Delta g = \Delta h + RT \ln \kappa. \quad (6)$$

### 3. Results

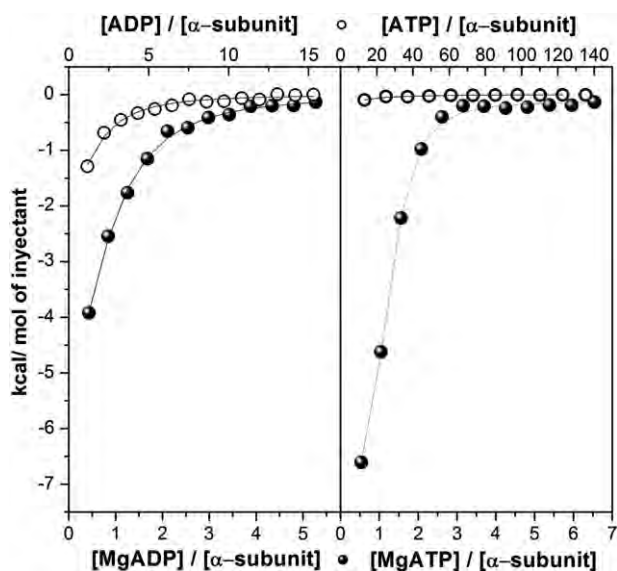
In a previous study with the  $\beta$ -subunit from thermophilic *Bacillus* PS3, it was shown that, in order to describe correctly the interaction of the protein with nucleotides, it was necessary to consider explicitly the coupled binding equilibria depicted in Scheme 1 [20].

In the above scheme, subscripts Ni stand for the association of Mg(II) to the nucleotide, Pf and Pb for the association of metal-free and metal-bound nucleotide to the protein, respectively, and M for the association of Mg(II) to the nucleotide-prebound protein. In this coupled equilibrium of weak interactions, AT(D)P and MgAT(D)P compete with each other for the subunit binding site (P). At the same time, mono and – in the case of ATP – bidentate interactions between the metal ion and the nucleotide take place. Consideration of these coupled equilibria was pertinent in the case of the  $\beta$ -subunit, as the affinities for metal-free nucleotides are not negligible and comparable in relation to those for the metal-bound nucleotides, while the affinities of the two nucleotides for Mg(II) are relatively weak [20].

Fig. 1 shows calorimetric isotherms obtained for the association of the  $\alpha$ -subunit with MgAT(D)P or AT(D)P. It is evident that the presence of Mg(II) modifies the subunit's interaction with nucleotides, although the effect is sharper with ATP. In the case of metal-free nucleotides, a simple 1:1 binding equilibrium is established. Accordingly, the data were fitted using a single binding site model. In the presence of Mg(II), a binding model that takes into account the formation of all species in Scheme 1 was fitted to the calorimetric data. To reduce the number of degrees of freedom, experimental data for the  $\alpha$ -subunit association with AT(D)P, as well as previously determined data for the formation of the complex MgADP or MgATP/Mg<sub>2</sub>ATP [20], were used as fixed values.

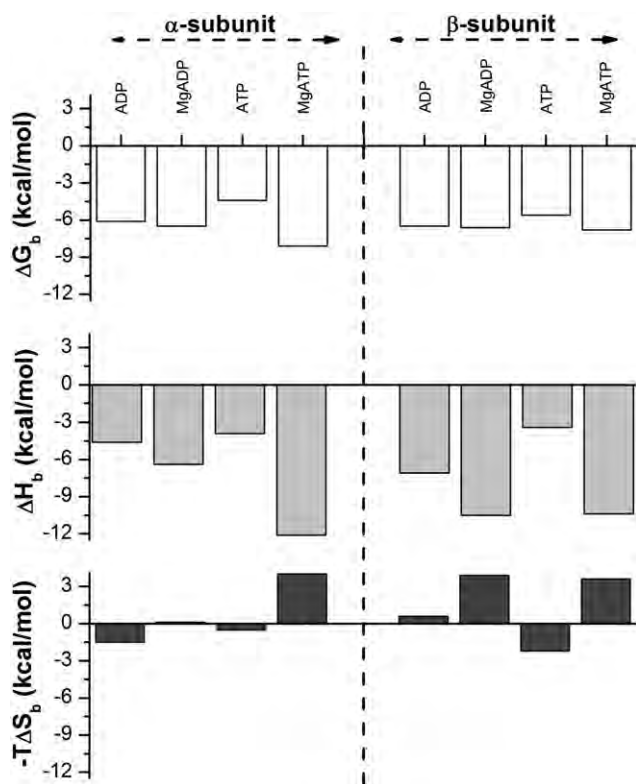
Table 1 summarizes results obtained from analysis of the calorimetric data. Due to a binding enthalpy that is twice as favorable, the  $\alpha$ -subunit recognizes MgATP with more affinity than MgADP. These differences are at variance with those in the  $\beta$ -subunit, which shows nearly the same thermodynamic signature for the recognition of the two metal-bound nucleotides (Fig. 2). The two subunits interact with MgADP with very similar strength ( $K_{P_b} = 6.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  for  $\beta$ -subunit [20]), although with distinctly different enthalpic and entropic contributions. In contrast, the  $\alpha$ -subunit binds to MgATP with more affinity (~6-fold) than the  $\beta$ -subunit ( $K_{P_b} = 1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  [20]).





**Fig. 1.** Calorimetric isotherms for the interaction of isolated  $\alpha$ -subunit with ADP (left panel) and ATP (right panel), at 25 °C, in a 0.05 M Tris–HCl buffer solution supplemented with 0.1 M NaCl and 10% glycerol (pH 8.0). Measurements were carried out in the presence (solid symbols) or absence (open symbols) of Mg(II).

In earlier studies, the affinity constants of isolated  $\alpha$ -subunit for nucleotides were determined, but as far as we know, no other characterizations of the binding enthalpies and entropies have been carried out. As shown in Table 2, the spectroscopic values reported by Otha et al. [26] for the  $\alpha$ -subunit from *Bacillus* PS3 are in fair



**Fig. 2.** Thermodynamic nucleotide-binding signatures of isolated  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits. Values for the catalytic subunit were taken from [20].

**Table 2**

Comparison of nucleotide dissociation constants ( $K_d$ ) of isolated  $\alpha$ -subunit.

Nucleotide	$G\alpha^a$	$K_d$ ( $\mu$ M) $T\alpha^b$	$T\alpha^c$	$E\alpha^d$
MgADP	16	18	11	4.4
MgATP	1.6	10	9	0.3
ADP	36	120	ND <sup>e</sup>	14.1
ATP	567	18	ND <sup>e</sup>	1.2

<sup>a</sup> This work.

<sup>b</sup> *Bacillus* PS3 subunit. Values taken from Otha et al. [26].

<sup>c</sup> *Bacillus* PS3 subunit. Values taken from Myauchi et al. [27].

<sup>d</sup> *E. coli* subunit. Values taken from Senior et al. [22].

<sup>e</sup> Not determined.

agreement with the calorimetric values obtained in the present study, except for the recognition of Mg(II)-free ATP, for which we obtained a significantly larger dissociation constant ( $K_d$ ). In contrast, Miyauchi et al. [27] using UV-difference spectroscopy, found virtually no affinity differences for the two nucleotides by *Bacillus* PS3  $\alpha$ -subunit. Table 2 shows somewhat different values with the isolated  $\alpha$ -subunit from *E. coli*, which were determined through fluorimetric assays [22]. Also in this case, the data are consistent with the  $\alpha$ -subunits presenting preference for MgATP, although a similar effect for the two nucleotides by Mg(II) was observed.

One approach to quantifying the energetic role of Mg(II) in the interaction is to calculate cooperativity parameters for the heterotropic interaction between Mg(II) and nucleotides. From a formal point of view, considering ATP as the reference binding molecule, this system represents an example of coupling between a cooperative homotropic interaction [ATP may bind one or two Mg(II) ions] and cooperative heterotropic interaction [ATP may bind the  $\alpha$ -subunit, may bind Mg(II), or may bind both the  $\alpha$ -subunit and Mg(II) simultaneously]. The cooperativity association constant,  $\kappa$ , enthalpy,  $\Delta h$ , entropy,  $\Delta s$ , and Gibbs free energy,  $\Delta g$ , can be calculated from thermodynamic parameters for the binding of the nucleotide and Mg-bound nucleotide to the  $\alpha$ -subunit, and they reflect the reciprocal effect of each ligand on the binding to the subunit.  $\kappa$  values  $>1$ ,  $<1$  or  $=1$  indicate positive, negative or null cooperativity, respectively.

According to the data in Table 3, the affinity of the  $\alpha$ -subunit for ADP is barely affected by Mg(II). In contrast, the affinity for ATP increases considerably in the presence of the metal ion due to a more favorable  $\Delta h$  value. A similar behavior is observed for the recognition of the two nucleotides by the  $\beta$ -subunit. Nevertheless, the more negative cooperativity entropy observed with the  $\beta$ -subunit makes the corresponding  $\kappa$  for ATP binding significantly smaller than that observed with the  $\alpha$ -subunit.

An alternative way to evaluate the energetic effects of Mg(II) is by determining the “pure” Mg(II) binding contribution, i.e., the binding of the cation to a preformed subunit-nucleotide adduct:

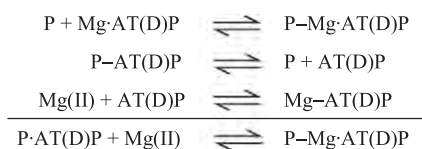


which can be derived by applying Hess' law on the involved elementary binding equilibria and explicitly expressed in Eqs. (4) and (5).

**Table 3**

Cooperativity binding for the heterotropic interaction of Mg(II) and nucleotides with isolated  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits at 25 °C.

	$\kappa$	$\Delta g$ (kcal/mol)	$\Delta h$ (kcal/mol)	$-T\Delta s$ (kcal/mol)
$\alpha$ -MgADP	2	−0.5	−1.8	−1.3
$\alpha$ -MgATP	308	−3.4	−7.6	3.4
$\beta$ -MgADP	1	−0.1	−3.4	3.3
$\beta$ -MgATP	8	−1.2	−7.0	5.8



Scheme 2.

Binding parameters obtained through Scheme 2 contain information on the equilibrium between the free cation and nucleotides, therefore yielding contributions that differ quantitatively from heterotropic cooperativity parameters. Inspection of the data in Table 4 reveals that the interaction of Mg(II) with the two  $F_1$  subunits is optimal in the presence of ATP. The  $\gamma$ -phosphate makes metal-ion binding both enthalpically and entropically driven. In contrast, binding enthalpy is unfavorable in the presence of ADP. Overall, similar to the heterotropic values,  $\Delta G_M$  values indicate that the  $\alpha$ -subunit's recognition site offers, in the presence of ATP, the best environment for Mg(II) anchoring.

#### 4. Discussion

In this study, we have characterized calorimetrically the thermodynamic signatures for the association of the isolated  $F_1$ -ATPase  $\alpha$ -subunit with adenosine nucleotides. Remarkably, the binding behavior of this subunit parallels to a large extent that shown by the isolated  $\beta$ -subunit. The two subunits exhibit enthalpically-driven affinities in the  $\mu\text{M}$  range for MgADP and MgATP. They show preference for binding to the three-phosphate nucleotide, although this preference is stronger in the case of the noncatalytic subunit. Another similarity is the nucleotide-specific effect that Mg(II) exerts on them. The cation yields positive heterotropic binding cooperativity in both subunits only in the presence of ATP, while its contribution with ADP is marginal. In both subunits, the metal-induced stabilizing effect is the result of a large favorable cooperative enthalpy. NMR and thermodynamic studies have shown that the isolated catalytic subunit adopts a more closed conformation when it is bound to MgATP than to MgADP or to metal-free nucleotides [16,20,28]. The more closed conformation has been correlated with the catalytically activated state that the  $\beta$ -subunit adopts transiently within  $F_1$  [16,28], which in turn is more compact than any of the closed structures seen in the  $F_1$  crystal structures so far reported. Analysis of the thermodynamic signatures reveals a similar conformational behavior for the noncatalytic subunits. Desolvation of the  $\gamma$ -phosphate group is expected to add extra favorable binding entropy. Yet, MgATP binding by the  $\alpha$ -subunit is accompanied by more unfavorable entropy, while MgADP binding is isoentropic. It follows that, like the  $\beta$ -subunit, the  $\alpha$ -subunit also adopts a more rigid conformation bound to MgATP.

Besides stereochemical considerations, the absence of Mg(II)-dependent cooperative effects with ADP seems to be due to the functional requirements of the enzyme, in particular to those related to the activity of catalytic sites. Walker and coworkers have recently presented structural evidence for a new intermediate step during ATP hydrolysis. In the structure of bovine  $F_1$ -ATPase cocrystallized

with ADP and low concentrations of Mg(II), the catalytic site of the  $\beta$ -subunit, in the extended conformation ( $\beta_E$ ), was occupied by metal-free ADP [29]. The same interaction was captured in the crystal structure of yeast  $F_1$ -ATPase bound to the inhibitory protein IF<sub>1</sub> [30]. According to the authors, these structures unveil a sequential product release mechanism, with the ADP molecule being liberated after release of the phosphate and magnesium ions. Single-molecule observations have revealed that ATP is hydrolyzed at a rotation angle of  $\sim 200^\circ$ , while ADP is released at  $\sim 240^\circ$ . Accordingly, Mg(II) and phosphate should be released somewhere between  $\sim 200^\circ$  and  $\sim 240^\circ$  [31]. Our calorimetric study provides the energetic basis for this sequential mechanism, given that the interaction strength of the  $\beta$ -subunit with ADP is unaffected by Mg(II), thus expediting cation pre-liberation. Whether this absence of cooperative effects has any implication for the function of  $\alpha$ -subunits is a question that needs to be elucidated.

A striking difference between the two isolated subunits is the larger affinity that the  $\alpha$ -subunit exhibits toward MgATP. As shown in Table 3, Mg(II) is largely responsible for this increased affinity, as judged from the 40-fold larger  $\kappa$  value of the  $\alpha$ -subunit in relation to that of the  $\beta$ -subunit. Interestingly, it is only in the presence of Mg(II) that noncatalytic subunits bind tightly to ATP and release inhibitory ADP at catalytic sites [32]. This behavior is in qualitative agreement with the strong cation-dependence of the isolated  $\alpha$ -subunit for recognizing ATP.

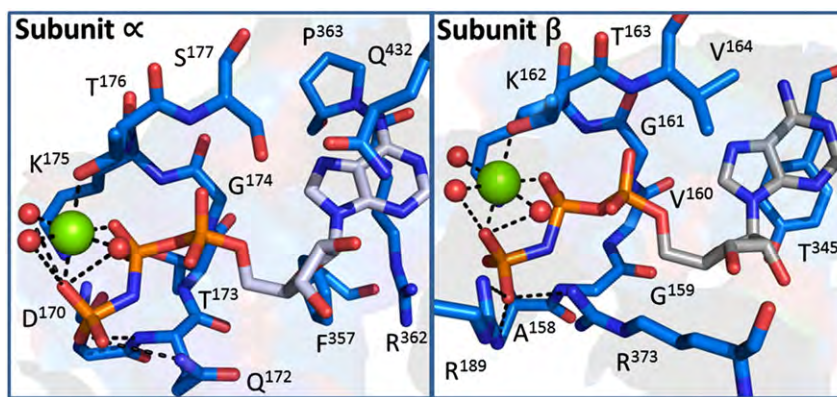
Fig. 3 shows schematic representations of the binding sites of  $\alpha_{\text{TP}}$ - and  $\beta_{\text{TP}}$ -subunits occupied by AMP-PNP, as observed in the crystal structure of bovine  $F_1$  in the so-called "ground state" conformation [33]. It can be seen that identical interactions are established by the metal ion in the two subunits. Thus, the distinct stabilization effect that Mg(II) elicits must be indirect. In this regard, it is noteworthy that the ATP  $\gamma$ -phosphate group forms interactions with different residues in the two subunits. While in the  $\alpha$ -subunit it is stabilized by the main-chain and side-chain amides of Q<sup>172</sup>, in the  $\beta$ -subunit it interacts with the side-chain polar group of R<sup>189</sup> and R<sup>373</sup>. Thus, it is tempting to propose that the more unfavorable heterotropic entropy effect that Mg(II) brings about on the  $\beta$ -subunit in the presence of ATP (Table 3) is because a larger number of the protein's rotatable bonds freeze upon binding. However, further studies are required to unveil the molecular basis of the differences in binding behaviors exhibited by the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits, since other effects may be operating in a complex way. For instance, the  $\beta$ -phosphate group interacts with P-loop residues and with Mg(II) in an identical way in the two subunits. As stated in Section 1, Introduction section, the  $\beta$ -subunit undergoes large conformational changes upon ligand binding, while the  $\alpha$ -subunit seems to prefer a closed conformation, regardless of its ligation state. Hence, a less favorable binding entropy of  $\beta$ -subunit with MgADP would be expected. However, our calorimetric data revealed the opposite behavior.

Several studies have dealt with the nucleotide-binding strength of noncatalytic sites in  $F_1$ . However, determination of binding affinities in  $F_1$  has historically been a very complicated task, and most available data can be considered as apparent constants [18]. One of the many factors that complicate measurements is that noncatalytic subunits of  $F_1$  from different species exchange nucleotides slowly, although this regime is preceded by a fast and reversible association. Weber et al. [34], based on fluorimetric measurements, obtained equilibrium constants for the rapid association event in  $F_1$  from *E. coli*, which indicated that noncatalytic subunits bind more tightly to MgATP ( $K_d = 55 \mu\text{M}$ ) than to MgADP ( $K_d = 105 \mu\text{M}$ ). The authors also reported dissociation constants for magnesium-free nucleotides ( $K_d = 3.5$  and  $1.3 \text{ mM}$  for free ATP and ADP, respectively). Using data presented in that study in Eqs. (4) to (6) (Section 2, Materials and methods), the heterotropic cooperative constant of Mg(II) and ATP for binding to a noncatalytic subunit in  $F_1$  is 64, while the corresponding  $\kappa$  value for ADP is 13. Thus, it would seem that regardless of their quaternary state,  $\alpha$ -subunits show the same relative nucleotide preference as well as

**Table 4**  
Thermodynamic parameters for the binding of Mg(II) to the subcomplex:<sup>a</sup>

Subcomplex	$\Delta G_M$ (kcal/mol)	$\Delta H_M$ (kcal/mol)	$-\Delta S_M$ (kcal/mol)
$\alpha$ -ADP	-5.0	1.9	-6.9
$\alpha$ -ATP	-9.9	-3.8	-5.1
$\beta$ -ADP	-4.7	0.3	-5.0
$\beta$ -ATP	-7.4	-2.6	-4.8

<sup>a</sup> Values were calculated on the basis of Scheme 2. Experimental conditions: T = 25 °C, pH 8.0, 0.05 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl.



**Fig. 3.** Schematic representation of the binding sites of subunits  $\alpha$  (left) and  $\beta$  (right) of  $F_1$ -ATPase. Coordinates for the TP conformations of both subunits bound to AMP-PNP were extracted from the pdb file 2JDI [32], corresponding to the crystal structure of azide-free bovine  $F_1$ -ATPase ("ground state" conformation).

stabilizing effect by Mg(II). However, the binding energetics by noncatalytic subunits in  $F_1$  is far from being thoroughly clarified.

Overall, our study sheds new light on the energetic basis of nucleotide recognition by  $F_1$ -ATPase subunits. In spite of genetic variation and functional divergence,  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits in monomeric state have preserved similar energetic strategies for binding to nucleotides. This is not completely surprising, since the two subunits share similar binding-site architectures (Fig. 3). In particular, the interaction of the P-loop with the nucleotide is virtually identical in the two subunits. Our data reveal that Mg(II) has a substantial effect on shaping the nucleotide-recognition sites, allowing an optimal and more rigid packing in the presence of ATP. At the same time, the two subunits show quantitative differences in binding parameters that correlate with the roles they play in  $F_1$ . Nevertheless, to understand how the oligomeric environment modulates binding behaviors of the subunits and determines communication among them, a study aimed at unveiling the energetics of the complex  $F_1$ 's binding mechanism is required.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabo.2013.08.005>.

## Acknowledgement

We thank M.S. Virginia Gómez-Vidales for the assistance in the ITC experiments. We thank Dr. Armando Gómez Puyou for the critical reading of the manuscript. This work was supported in part by DGAPA, UNAM [PAPIIT, IN205712] and CONACyT [Grants 129239, 158473]. G.S. received a Ph.D. fellowship from CONACyT.

## References

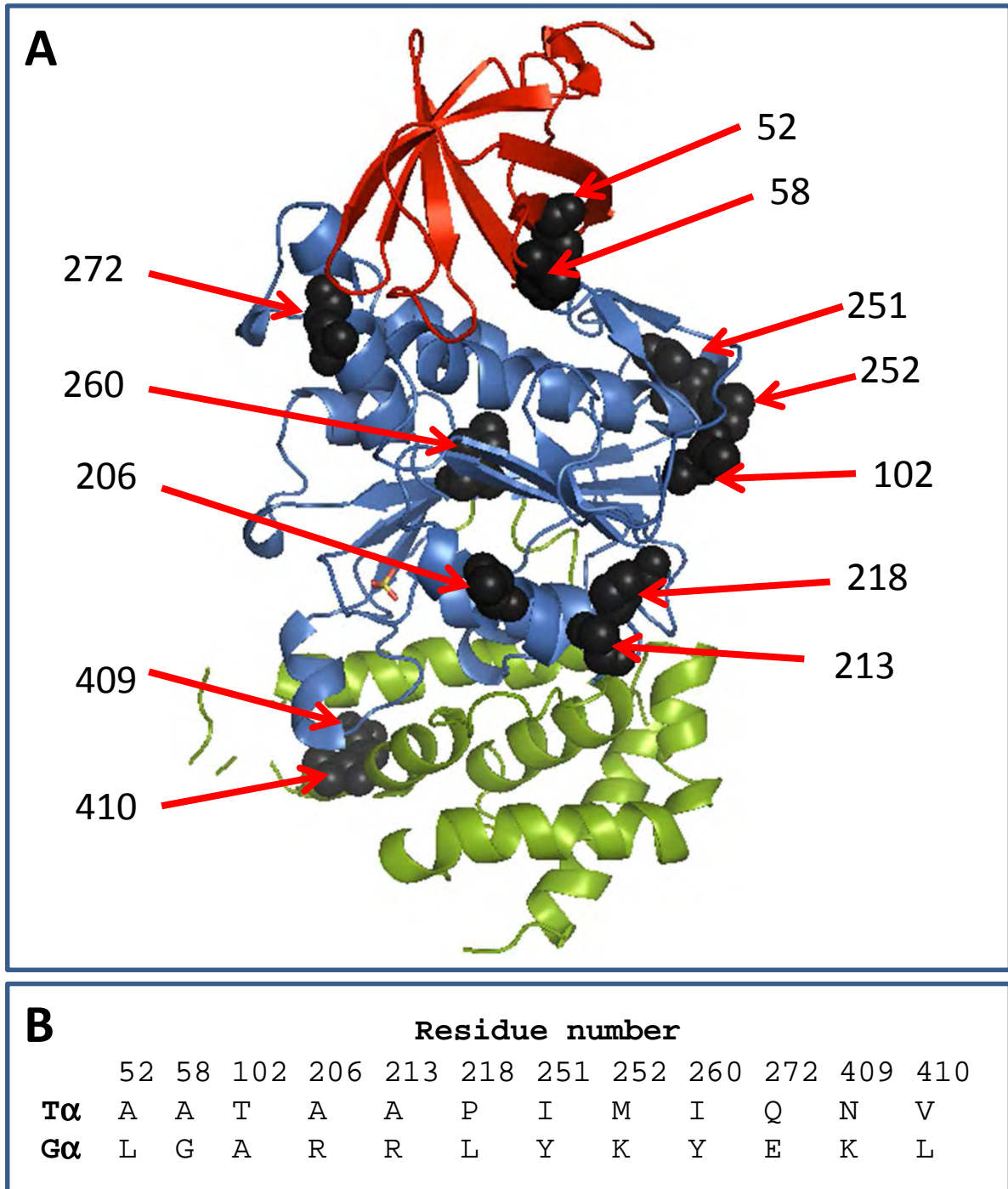
- [1] S.P. Muench, J. Trinick, M.A. Harrison, Structural divergence of the rotary ATPases, *Q. Rev. Biophys.* 44 (2011) 311–356.
- [2] P.D. Boyer, The ATP synthase: a splendid molecular machine, *Annu. Rev. Biochem.* 66 (1997) 717–749.
- [3] M. Yoshida, E. Muneyuki, T. Hisabori, ATP synthase—a marvellous rotary engine of the cell, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 669–677.
- [4] K. Kinoshita Jr., K. Adachi, H. Itoh, Rotation of  $F_1$ -ATPase: how an ATP-driven molecular machine may work, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33 (2004) 245–268.
- [5] C. von Ballmoos, A. Wiedenmann, P. Dimroth, Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases, *Annu. Rev. Biochem.* 78 (2009) 649–672.
- [6] K. Adachi, K. Oiwa, T. Nishizaka, S. Furuike, H. Noji, H. Itoh, M. Yoshida, K. Kinoshita Jr., Coupling of rotation and catalysis in  $F_1$ -ATPase revealed by single-molecule imaging and manipulation, *Cell* 130 (2007) 309–321.
- [7] T. Ariga, E. Muneyuki, M. Yoshida,  $F_1$ -ATPase rotates by an asymmetric, sequential mechanism using all three catalytic subunits, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14 (2007) 841–846.
- [8] J.M. Jault, W.S. Allison, Slow binding of ATP to noncatalytic nucleotide binding sites which accelerates catalysis is responsible for apparent negative cooperativity exhibited by the bovine mitochondrial  $F_1$ -ATPase, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 1558–1566.
- [9] P. Richard, B. Pitard, J.-L. Rigaud, Evidence for stimulation of ATP synthesis by ATP bound to a non-catalytic binding site, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 21571–21578.
- [10] D. Bald, T. Amano, E. Muneyuki, B. Pitard, J.L. Rigaud, J. Krupic, T. Hisabori, M. Yoshida, M. Shibata, ATP synthesis by F0F1-ATP synthase independent of noncatalytic nucleotide binding sites and insensitive to azide inhibition, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 865–870.
- [11] T. Amano, T. Matsui, E. Muneyuki, H. Noji, K. Hara, M. Yoshida,  $\alpha\beta\gamma$  complex of  $F_1$ -ATPase from thermophilic *Bacillus* PS3 can maintain steady state ATP hydrolysis activity depending of the number of non-catalytic sites, *Biochem. J.* 343 (1998) 135–138.
- [12] R. Iino, H. Noji, Intersubunit coordination and cooperativity in ring-shaped NTPases, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23 (2013) 1–6.
- [13] N.B. Grodsky, C. Dou, W.S. Allison, Mutations in the nucleotide binding domain of the  $\alpha$  subunits of the  $F_1$ -ATPase from thermophilic *Bacillus* PS3 that affect cross-talk between nucleotide binding sites, *Biochemistry* 37 (1998) 1007–1014.
- [14] P. Falson, A. Goffeau, M. Boutry, J.M. Jault, Structural insight into the cooperativity between catalytic and noncatalytic sites of  $F_1$ -ATPase, *Biochim. Biophys. Acta* 1658 (2004) 133–140.
- [15] A.N. Malyan, Nucleotide binding to noncatalytic sites is essential for ATP-dependent stimulation and ADP-dependent inactivation of the chloroplast ATP synthase, *Photosynth. Res.* 105 (2010) 243–248.
- [16] H. Yagi, N. Kajirawa, T. Iwabuchi, K. Izumi, M. Yoshida, H. Akutsu, Stepwise propagation of the ATP-induced conformational change of the  $F_1$ -ATPase  $\beta$  subunit revealed by NMR, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 2374–2382.
- [17] Y. Shirahara, A.G.W. Leslie, J.P. Abrahams, J.E. Walker, T. Ueda, Y. Sekimoto, M. Kambara, K. Saika, Y. Kagawa, M. Yoshida, The crystal structure of the nucleotide-free  $\alpha\beta\gamma$  subcomplex of  $F_1$ -ATPase from the thermophilic *Bacillus* PS3 is a symmetric trimer, *Structure* 5 (1997) 825–836.
- [18] S. Ono, K.Y. Hara, J. Hirao, T. Matsui, H. Noji, M. Yoshida, E. Muneyuki, Origin of apparent negative cooperativity of  $F_1$ -ATPase, *Biochim. Biophys. Acta* 1607 (2003) 35–44.
- [19] G. Pérez-Hernández, E. García-Hernández, R.A. Zubillaga, M. Tuena de Gómez-Poyou, Structural energetics of MgADP binding to the isolated  $\beta$  subunit of  $F_1$ -ATPase from thermophilic *Bacillus* PS3, *Arch. Biochem. Biophys.* 408 (2002) 177–183.
- [20] N.O. Pulido, G. Salcedo, G. Pérez-Hernández, C. José-Núñez, A. Velázquez-Campoy, E. García-Hernández, Energetic effects of magnesium in the recognition of adenosine nucleotides by the  $F_1$ -ATPase  $\beta$  subunit, *Biochemistry* 49 (2010) 5258–5268.
- [21] S.D. Dunn, M. Futai, Reconstitution of a functional coupling factor from the isolated subunits of *Escherichia coli*  $F_1$  ATPase, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 113–118.
- [22] A.E. Senior, A. Muharemagić, S. Wilke-Mounts, Assembly of the stator in *Escherichia coli* ATP synthase. Complexation of  $\alpha$  subunit with other  $F_1$  subunits is prerequisite for  $\delta$  subunit binding to the N-terminal region of  $\alpha$ , *Biochemistry* 45 (2006) 15893–15902.
- [23] N.O. Pulido, E.A. Chavelas, F. Turner, E. García-Hernández, Current applications of isothermal titration calorimetry to the study of protein complexes, in: E. García-Hernández, D.A. Fernández-Velasco (Eds.), *Advances in Protein Physical Chemistry*, Transworld Research Network, India, 2008, pp. 115–138.
- [24] E. Freire, A. Schön, A. Velázquez-Campoy, Isothermal titration calorimetry: general formalism using binding polynomials, *Methods Enzymol.* 455 (2009) 127–155.
- [25] M. Martínez-Julvez, O. Abian, S. Vega, M. Medina, A. Velázquez-Campoy, Studying the allosteric energy cycle by isothermal titration calorimetry, in: A.W. Fenton (Ed.), *Allottery: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 796, 2012, pp. 53–70.
- [26] S. Ohta, M. Tsubo, T. Oshima, M. Yoshida, Y. Kagawa, Nucleotide binding to isolated alpha and beta subunits of proton translocating adenosine triphosphatase studied with circular dichroism, *J. Biochem.* 87 (1980) 1609–1617.
- [27] M. Miyauchi, K. Tozawa, M. Yoshida,  $F_1$ -ATPase  $\alpha$ -subunit made up from two fragments (1–395, 396–503) is stabilized by ATP and complexes containing it obey altered kinetics, *Biochim. Biophys. Acta* 1229 (1995) 225–232.
- [28] M. Kobayashi, H. Akutsu, T. Suzuki, M. Yoshida, H. Yagi, Analysis of the open and closed conformations of the beta subunits in thermophilic  $F_1$ -ATPase by solution NMR, *J. Mol. Biol.* 398 (2010) 189–199.

- [29] D.M. Rees, M.G. Montgomery, A.G.W. Leslie, J.E. Walker, Structural evidence of a new catalytic intermediate in the pathway of ATP hydrolysis by F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (2012) 11139–11143.
- [30] G.C. Robinson, J.V. Bason, M.G. Montgomery, I.M. Fearnley, D.M. Mueller, A.G.W. Leslie, J.E. Walker, The structure of F<sub>1</sub>-ATPase from *Saccharomyces cerevisiae* inhibited by its regulatory protein IF 1, *Open Biol.* 3 (2013) 120164.
- [31] K. Adachi, K. Oiwa, M. Yoshida, T. Nishizaka, K. Kinoshita Jr., Controlled rotation of the F<sub>1</sub>-ATPase reveals differential and continuous binding changes for ATP synthesis, *Nat. Commun.* 3 (2012) 1022.
- [32] Y.M. Milgrom, L.L. Ehler, P.D. Boyer, ATP binding at noncatalytic sites of soluble chloroplast F<sub>1</sub>-ATPase is required for expression of the enzyme activity, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 18725–18728.
- [33] M.W. Bowler, M.G. Montgomery, A.G.W. Leslie, J.E. Walker, Ground state structure of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria at 1.9 Å resolution, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 14238–14242.
- [34] J. Weber, C. Bowman, S. Wilke-Mounts, A.E. Senior, α-Aspartate 261 is a key residue in noncatalytic sites of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 21045–21049.



# Isolated noncatalytic and catalytic subunits of F<sub>1</sub>-ATPase exhibit similar, albeit not identical, energetic strategies for recognizing adenosine nucleotides

Guillermo Salcedo, Patricia Cano-Sánchez, Marietta Tuena de Gómez-Puyou, Adrián Velázquez-Campoy, and Enrique García-Hernández



**Figure S1. A.** Schematic representation of the 3D structure of the  $\alpha$ -subunit from *Bacillus* PS3. Atomic coordinates were taken from pdb entry 1SKY. Positions where *Bacillus* PS3 and *Geobacillus kaustophilus*  $\alpha$ -subunits differ from each other are shown in spheres. **B.** Residue variations between *Bacillus* PS3 and *Geobacillus kaustophilus* subunits



# Inherent conformational flexibility of $F_1$ -ATPase $\alpha$ -subunit



Otto Hahn-Herrera<sup>a,1</sup>, Guillermo Salcedo<sup>a,1</sup>, Xavier Barril<sup>b,c</sup>, Enrique García-Hernández<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Química Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04630, D.F., Mexico

<sup>b</sup> Catalan Institution for Research and Advanced Studies (ICREA), Passeig Lluís Companys 23, 08010 Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Departament de Físicoquímica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 12 January 2016

Received in revised form 12 April 2016

Accepted 28 April 2016

Available online 29 April 2016

### Keywords:

$F_0F_1$ -ATP synthase

Noncatalytic subunit

Conformational flexibility

Isothermal titration calorimetry

Molecular dynamics simulation

## ABSTRACT

The core of  $F_1$ -ATPase consists of three catalytic ( $\beta$ ) and three noncatalytic ( $\alpha$ ) subunits, forming a hexameric ring in alternating positions. A wealth of experimental and theoretical data has provided a detailed picture of the complex role played by catalytic subunits. Although major conformational changes have only been seen in  $\beta$ -subunits, it is clear that  $\alpha$ -subunits have to respond to these changes in order to be able to transmit information during the rotary mechanism. However, the conformational behavior of  $\alpha$ -subunits has not been explored in detail. Here, we have combined unbiased molecular dynamics (MD) simulations and calorimetrically measured thermodynamic signatures to investigate the conformational flexibility of isolated  $\alpha$ -subunits, as a step toward deepening our understanding of its function inside the  $\alpha_3\beta_3$  ring. The simulations indicate that the open-to-closed conformational transition of the  $\alpha$ -subunit is essentially barrierless, which is ideal to accompany and transmit the movement of the catalytic subunits. Calorimetric measurements of the recombinant  $\alpha$ -subunit from *Geobacillus kaustophilus* indicate that the isolated subunit undergoes no significant conformational changes upon nucleotide binding. Simulations confirm that the nucleotide-free and nucleotide-bound subunits show average conformations similar to that observed in the  $F_1$  crystal structure, but they reveal an increased conformational flexibility of the isolated  $\alpha$ -subunit upon MgATP binding, which might explain the evolutionary conserved capacity of  $\alpha$ -subunits to recognize nucleotides with considerable strength. Furthermore, we elucidate the different dependencies that  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits show on Mg(II) for recognizing ATP.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The final stage of the cellular respiratory chain is the generation of adenosine triphosphate (ATP). This process is carried out by  $F_0F_1$ -ATP synthase, a multimeric enzyme consisting of two coupled rotary sectors. Driven by a proton-motive force, the membrane sector  $F_0$  transmits torque to the soluble sector  $F_1$ , which synthesizes ATP from ADP and

Pi through the alternating action of three catalytic sites [1]. In the absence of the transmembrane proton gradient or detached from  $F_0$ ,  $F_1$  reversibly converts chemical energy into rotational energy through ATP hydrolysis. The simplest  $F_1$  architecture with full rotary and hydrolytic activity consists of a ring of three pairs of  $\alpha/\beta$ -subunits (the so-called catalytic core) [2], from which the rotary rod-like  $\gamma$ -subunit protrudes. Recently, it has been shown that the rotor-less  $\alpha_3\beta_3$  ring is also able to conduct alternating catalysis, although with reduced activity [3]. Each of the three catalytic sites is formed of residues from a single  $\beta$ -subunit, complemented with a few residues from an adjacent  $\alpha$ -subunit. The sites are neither structurally nor thermodynamically equivalent, and currently they are usually named based on their nucleotide occupation in the original crystal structure of bovine  $F_1$  ( $MF_1$ ):  $\beta_{TP}$  for ATP-bound,  $\beta_{DP}$  for ADP-bound and  $\beta_E$  for empty [1,4].  $\beta_{TP}$  and  $\beta_{DP}$  exhibit nearly superimposable conformations with the carboxyl-terminal (C-terminal) domain adopting a closed orientation, although distinct interactions established with the adjacent  $\gamma$ - and  $\alpha$ -subunits make them largely different from each other. In contrast,  $\beta_E$  shows an open conformation, in which the C-terminal domain interacts marginally with adjacent subunits. It has been suggested that  $\beta_{TP}$  is the high-affinity ATP binding site and  $\beta_{DP}$  is the subunit ready to carry out catalysis [5,6]. The three  $\alpha$ -subunits also recognize nucleotides, although with no catalytic activity.

**Abbreviations:** Mg(II), free magnesium ion; ATP, adenosine 5'-triphosphate; ADP, adenosine 5'-diphosphate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; Tris, 2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol;  $MgCl_2$ , magnesium chloride; ATPase, adenosine 5'-triphosphatase;  $MF_1$ ,  $TF_1$ , and  $EF_1$ , bovine, thermophilic *Bacillus* PS3 and *Escherichia coli*  $F_1$  sectors, respectively;  $\beta_{DP}$ ,  $\beta_{TP}$ , and  $\beta_E$ ,  $\beta$  subunits in the crystal structure of  $F_1$ , bound to MgADP and MgATP, and empty, respectively;  $\alpha_{apo}$  and  $\alpha_{holo}$ , isolated  $\alpha$ -subunit free and bound to nucleotide, respectively; MD, molecular dynamics; RMSD, root-mean-square deviation; RMSF, root mean square fluctuation; ITC, isothermal titration calorimetry;  $K_b$ , equilibrium binding constant;  $\Delta H_b$ , binding enthalpy;  $\Delta G_b$ , binding Gibbs free energy;  $\Delta S_b$ , binding entropy;  $K_{N1}$  and  $K_{N2}$ , step-wise association constants for the interaction of ATP with Mg(II);  $K_{PF}$  and  $K_{PB}$ , association constants for ATP and MgATP binding to the subunit.

\* Corresponding author at: Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04510, D.F., Mexico.

E-mail address: [egarciah@unam.mx](mailto:egarciah@unam.mx) (E. García-Hernández).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

The last few years have been prolific in the generation of experimental and theoretical data that allows a deep understanding of many aspects of  $F_1$ 's rotary mechanism. In spite of this, there is no universally-accepted description of the catalytic mechanism, and many aspects still need to be further elucidated. A full  $\gamma$ -subunit revolution is driven by the hydrolysis of three ATP molecules. Each  $120^\circ$  cycle consists of two rotational sub-steps, which interconvert two metastable states, namely: the ATP-binding and the catalytic dwell states [7]. A detailed mechanism of the interconversion between the two states has been proposed on the basis of single molecule measurements on  $F_1$  sectors from thermophilic *Bacillus* PS3 ( $TF_1$ ) [8,9], and more recently from *Escherichia coli* ( $EF_1$ ) [10]. According to this description, the ATP-binding dwell state shows two  $\beta$ -subunits, one empty and one bound to MgATP, with conformations resembling the crystal structures of  $\beta_{TP}$  and  $\beta_E$ , respectively. The third catalytic subunit adopts a “half-closed” conformation,  $\beta_{HC}$ , assumed to be bound to just-formed ADP + Pi products. Upon ATP binding,  $\beta_E$  closes to adopt the  $\beta_{TP}$  conformation, providing the energy for an  $80^\circ$  rotation of the  $\gamma$ -subunit, with the concomitant release of ADP from  $\beta_{HC}$ , the opening of the latter into a  $\beta_E$ -like conformation, and the transformation of  $\beta_{TP}$  into  $\beta_{DP}$ . All these changes convert  $F_1$  from an ATP-binding dwell ( $\beta_{TP}$ ,  $\beta_E$ ,  $\beta_{HC}$ ) into a catalytic dwell state ( $\beta_{DP}$ ,  $\beta_{TP}$ ,  $\beta_E$ ). Single molecule measurements on Cys-mutated  $F_1$  sectors were envisioned to form a covalent cross-link between the rotor and the stator, in an orientation similar to that found in crystals [11,12]. These measurements have established that most  $F_1$  structures solved so far resemble the catalytic-waiting intermediate, which occurs after the  $80^\circ$  rotation. By using a transition state analog, a different conformation has been solved, which seems to have been arrested before the release of MgADP from  $\beta_E$  [13]. In this structure,  $\beta_{TP}$  and  $\beta_{DP}$  are bound to MgADP-fluoroaluminate, showing conformations very similar to those observed in other  $F_1$  structures, while the third  $\beta$ -subunit, binding ADP and sulfate, adopts a partially closed conformation ( $\beta_{TP}$ ,  $\beta_{DP}$ ,  $\beta_{HC}$ ). After catalysis takes place at  $\beta_{DP}$ , this subunit transforms into  $\beta_{HC}$ , and a subsequent  $40^\circ$  rotation of  $\gamma$ -subunit allows Pi liberation from  $\beta_E$ , driving  $F_1$  again into the ATP-binding dwell structure ( $\beta_{HC}$ ,  $\beta_{TP}$ ,  $\beta_E$ ) [8,14]. A somewhat different description of the rotary mechanism has recently been derived for human  $F_1$  [15].

Since catalytic subunits are the prevalent elements for driving the rotary  $F_1$ -ATPase mechanism, utmost efforts have been taken to elucidate the basis of the conformational changes they undergo [1,16–20]. In contrast, the role played by the  $\alpha$ -subunits in the catalytic engine has been much less addressed and clarified [21]. A major – and obvious – role of  $\alpha$ -subunits is to contribute to the assembly and structural stabilization of the  $F_1$  ring. Mutational studies, eventually confirmed by crystal structures, established that the catalytic sites are complemented by  $\alpha$ -subunit's residues, with the prominent role of an arginine residue, the so-called arginine finger, as an essential residue for the formation of the catalytic transition state [22]. Furthermore, there is clear evidence pointing to a communication mechanism between  $\beta$ -subunits propagated by the noncatalytic subunits. Random mutations on  $EF_1$  helped to identify a signal transmission region in the  $\alpha$ -subunit that seemingly amplifies a conformational change in the arginine finger induced by the transition state, allowing long-range communication with another  $\beta$ -subunit [23]. Other mutational studies have indicated that negative cooperativity occurs through interactions between neighboring  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits [24]. Binding studies showed that ATP binding to noncatalytic sites of chloroplast and mitochondrial  $F_1$  promotes a release of entrapped MgADP from the affected catalytic site [25,26]. In line with these observations, site-directed mutational studies have shown that suppression of the nucleotide-binding ability in  $\alpha$ -subunits leads to product inhibition at the catalytic sites in  $TF_1$  and *Bacillus subtilis*  $F_1$  [27,28]. In contrast,  $EF_1$  with nucleotide-free noncatalytic sites has been shown to display normal catalytic activity [23]. In a series of experiments in which the  $\gamma$ -subunit was

progressively truncated and eventually eliminated completely, the  $\alpha_3\beta_3$  ring retained rotary catalysis [3,29,30]. As suggested in an insightful molecular dynamics study, this communication may proceed through a “packing exchange mechanism”, in which  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits sequentially couple and uncouple their interactions, mainly by changes in the C-terminal domains and the nucleotide binding sites [31,32]. The  $\alpha$ -subunit has been also suggested as determinant for the  $\beta$ -subunit to acquire the half-closed conformation [33].

It is our interest to study the conformational flexibility of the  $\alpha$ -subunit, as its role inside the  $F_1$  ring is not completely clear. Calorimetric characterizations revealed that the isolated  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits share similar energetic strategies for recognizing nucleotides [34–36]. Nevertheless, based on crystallographic evidence, it has been suggested that  $\alpha$ -subunits adopt a relatively fixed structure, although their full range of motion has not been assessed. Based on these findings, further computational investigation of the properties of isolated  $\alpha$ -subunits and in different initial conformations with and without bound nucleotide is clearly warranted. Here, we report on a computational study of the relaxation process of isolated  $\alpha$ -subunit by performing 100-ns long unbiased MD simulations. In our simulations, we observed that on average the conformation of the  $\alpha$ -subunit is nearly the same in presence or absence of nucleotide, a picture that is in agreement with calorimetric measurements also obtained in the present study for the formation of the  $\alpha$ -subunit/MgATP complex. We also found that large movements of nucleotide-bound  $\alpha$ -subunit, comparable to those observed from the open-to-closed conformation in  $\beta$ -subunits, can take place on a time scale of only tens of nanoseconds, which is indicative of a barrier-free transition. Simulations revealed an increased conformational flexibility of the isolated  $\alpha$ -subunit upon MgATP binding, which might explain the evolutionary conserved capacity of  $\alpha$ -subunits to recognize nucleotides with considerable strength. Additionally, we addressed the possible determinants of the largely different dependences that  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits show on Mg(II) for recognizing ATP.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Computational methods

All structures were retrieved from the *Bos taurus*  $F_1$  structure, which was solved with 2.1 Å of resolution (PDB code: 2JDI) [37]. Chain completion was carried out with the Modeller python module and the MOE software suite (Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2015). Protonation at  $37^\circ\text{C}$  and 0.1 ionic strength was carried out using the Protonation3D package contained in MOE. All the simulations were carried out with the AMBER 12 suite of molecular dynamics simulations with the FF99SB force field [38]. Parameters for magnesium ion [39] and ATP [40] were taken from the AMBER parameter database. The Leap module of the AMBER package was used to include the system in a solvent-filled truncated octahedral box spanning 18 Å further from the protein, using the TIP3P solvent model. The box, with a total volume  $1.4 \times 10^4 \text{ \AA}^3$ , contained 40,338 water molecules. Counterions were placed in random positions to neutralize the system. All simulations were carried out under periodic boundary conditions and long-range electrostatics were accounted for using the particle-mesh Ewald summation method, as implemented in the PMEMD module of the AMBER suite, using a cut-off value of 9 Å to split direct electrostatics and Ewald summation. To constrain the vibrations of hydrogen atoms and therefore to allow the use of a 2 fs time step, the SHAKE algorithm was enabled. Conjugate gradient minimization followed by NVT warming up and NPT equilibration using Langevin dynamics were performed to equilibrate the solvent and relax the structures. As judged by the temporal course of different metrics such as the radius of gyration, the total energy of the system and the root-mean-square deviation of atomic positions (RMSD), 10 ns of running at the intended production temperature were





Finally, a parameter  $n$  is included as a normalization factor for correcting errors in protein concentration related to experimental determination and/or the presence of a fraction of inactive protein:

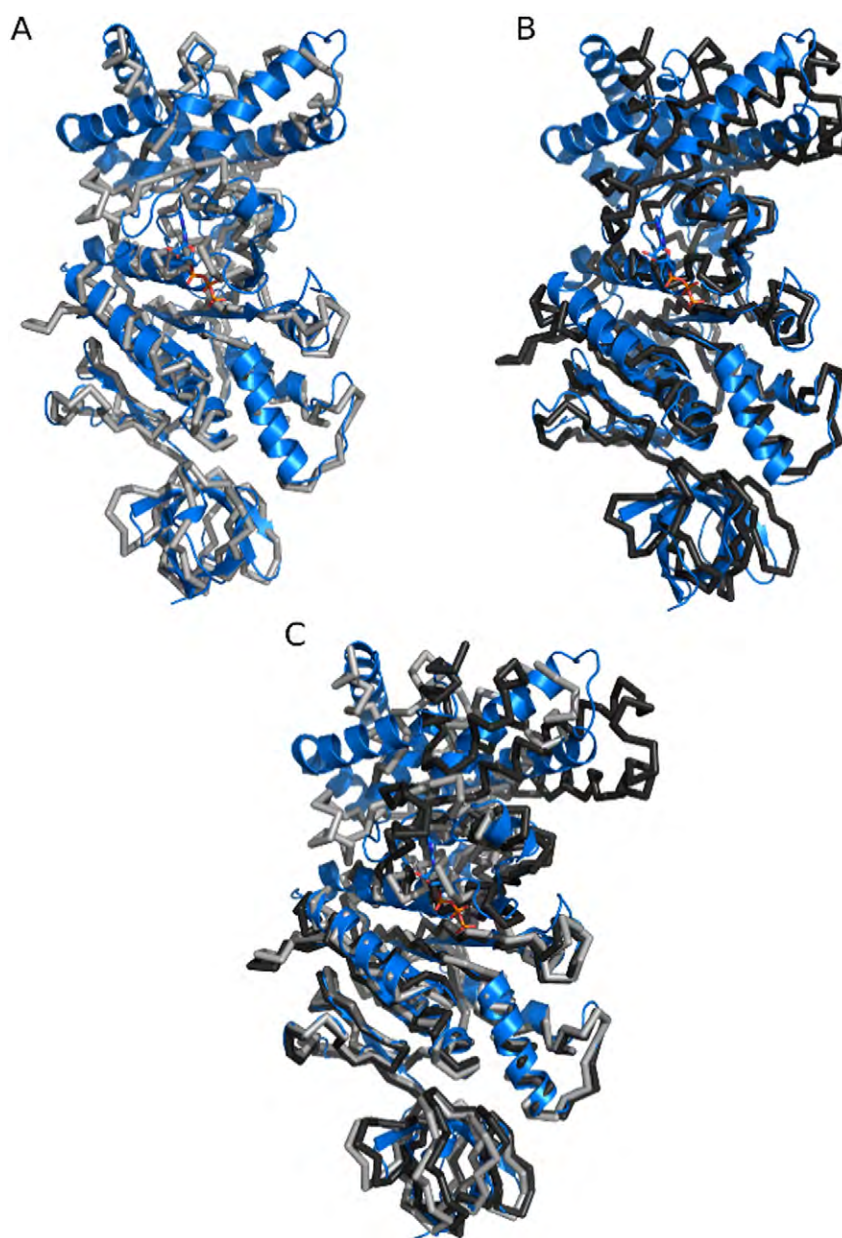
$$[P]_T = n[P]_0 \quad (4)$$

where  $[P]_0$  is the experimental concentration. In the fitting of this model, formation parameter values for the complexes of ATP with  $\alpha$  subunit (determined in independent experiments), and for MgATP and Mg<sub>2</sub>ATP (taken from [35]) were kept fixed, while those for the interaction of  $\alpha$ -subunit with MgATP were the fitting parameters. Non-linear regressions were carried with Origin 7.0 (OriginLab, Co., Northampton, MA) and Affinimeter software ([www.affinimeter.com](http://www.affinimeter.com)).

### 3. Results

#### 3.1. Average conformation of the isolated $\alpha$ -subunit

Among the multiple crystal structures of F<sub>1</sub>-ATPase reported so far [14,19,20], we chose the structure of bovine F<sub>1</sub> (MF<sub>1</sub>) in which no inhibitors were present in the crystallization medium. For this reason, it is usually referred to as the ground-state structure of the catalytic-dwell intermediate [37]. In this structure, the three  $\alpha$ -subunits, named as  $\alpha_{TP}$ ,  $\alpha_{DP}$  and  $\alpha_E$  on the basis of the catalytic site to which each one complements, show nearly the same conformation. As illustrated in Fig. 1A–B, the  $\alpha$ -subunit aligns to  $\beta_E$  or  $\beta_{TP}$  with virtually identical RMSD values (2.3 and 2.4 Å, respectively). Nevertheless, when the alignment is restricted to the central domains of the two subunits (vide infra), it becomes evident that even though the  $\alpha$ -subunit presents a closed binding site [4,47],



**Fig. 1.** Structural alignment of the  $\alpha$ -subunit (blue) to the  $\beta$ -subunit. A) and B) Best global superposition to  $\beta_E$  (light gray) and  $\beta_{TP}$  (dark gray), respectively. C) Alignment based on the central domains. Coordinates were taken from the F1 ground-state structure (PDB code 2JDI) [37].

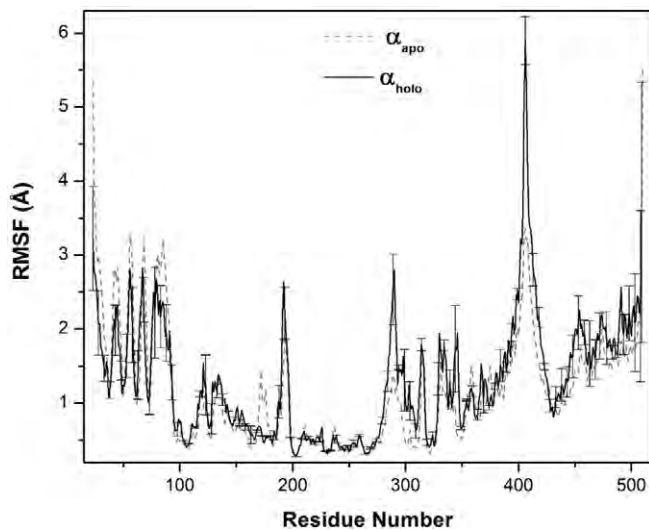


the orientation of its C-terminal domain (residues 380–510) shows an open-like conformation (Fig. 1C).

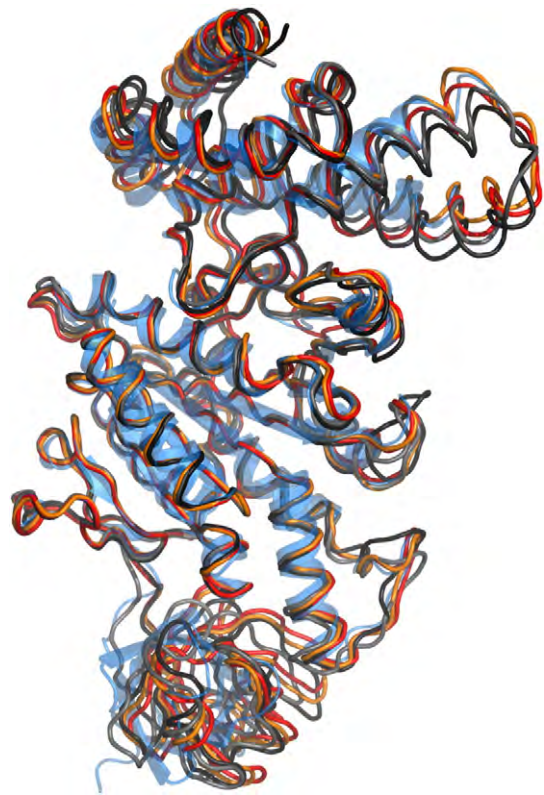
To gain insights into the conformational plasticity of the isolated  $\alpha$ -subunit, full unrestricted 100 ns-long molecular dynamics simulations were carried out. To model the initial structure of the isolated subunit, we extracted the  $\alpha_{TP}$  conformation from MF<sub>1</sub> (PDB code 2JDI), because among the three  $\alpha$ -subunits, it shows the weakest correlated motions with adjacent  $\beta$ - and  $\gamma$ -subunits [31]. Two replicas were run for the MgATP complexed subunit ( $\alpha_{holo}$ ), and two for an initial conformation in which the nucleotide coordinates were erased ( $\alpha_{apo}$ ). We first determined the RMSF, observing that the core of the central domain (residues 199–272) showed the lowest mobility along the trajectories (Fig. 2). Therefore, all trajectories were aligned using this rigid region as an anchor. A similar approach based on partial zones of the protein has been used for the  $\beta$ -subunit [48,49]. The two independent trajectories for  $\alpha_{apo}$  yielded average structures very similar to each other and to the starting crystal structure (Fig. 3), while average structures for the two runs with  $\alpha_{holo}$  adopted a slightly more closed conformation. Furthermore, a clustering analysis restricted to the C-terminal domain revealed that the  $\alpha$ -subunit mostly populates a reduced number of conformers, all of them similar to the average conformation, as illustrated in Fig. 4 for one of the  $\alpha_{holo}$  replicas. Similar results were obtained for  $\alpha_{apo}$  (Table 1). Thus, it follows that at least in the spanned timescale, the  $\alpha$ -subunit adopts a stable open-like conformation, whose overall topology remains nearly unchanged upon nucleotide binding.

### 3.2. Thermodynamics of the interaction of isolated $\alpha$ -subunit with MgATP

Due to the shortcomings inherent to MD methods (e.g., narrow accessible sampling time), validation of simulation results against experimental data is always desirable. For this purpose, we measured calorimetrically the nucleotide binding parameters of the isolated  $\alpha$ -subunit as a function of temperature, with the aim of quantifying the binding heat capacity ( $\Delta C_{pb}$ ). This thermodynamic function is mainly determined by solvent reorganization around protein and ligand surfaces, and hence it is an excellent reporter of the extent of conformational changes occurring upon complex formation [50–52]. Fig. 5 shows as an example of the calorimetric determinations, the isotherms obtained at 35 °C for the titration of the  $\alpha$ -subunit with ATP and MgATP. The calorimetric data for the titration with metal-free ATP were well-fitted using a single binding site model. In presence of Mg(II), a binding

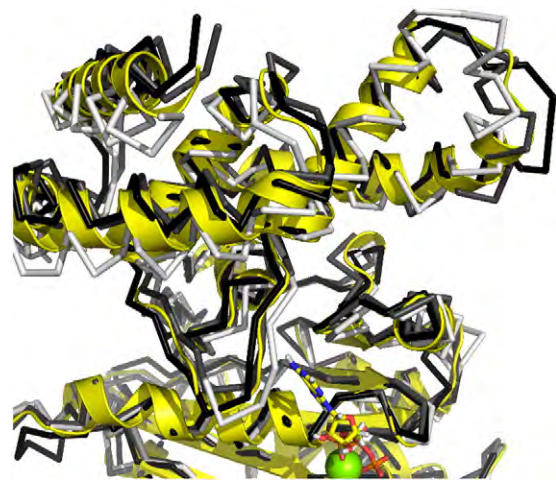


**Fig. 2.** Root-mean-square-fluctuations ( $\alpha$ -carbons) for the MgATP-bound (solid line) and nucleotide-free (dotted line)  $\alpha$ -subunit. Values shown are the average of the two replica for each system. For simplicity, dispersion bars are shown only for  $\alpha_{holo}$ , although similar dispersions were observed for  $\alpha_{apo}$ .



**Fig. 3.** Average structures from MD trajectories for  $\alpha_{apo}$  (orange and red) and  $\alpha_{holo}$  (gray and black). The crystal structure of  $\alpha_{TP}$ , shown in blue cartoon, was taken from the pdb file 2JDI [37].

model that takes into account the formation of all species in Scheme 1 was fitted. To reduce the number of degrees of freedom, experimental values for the  $\alpha$ -subunit association with ATP, as well as previously determined data for the formation of the complexes MgATP/Mg<sub>2</sub>ATP [35], were used as fixed values in the fitting of the ternary model. Table 2 summarizes the calorimetric results obtained in the temperature range of 20 to 35 °C. These measurements complement those previously reported for the same subunit at a single temperature [36]. As previously noted, complex formation is enthalpically driven, exhibiting a three-fold larger contribution in the presence of the metal ion. Significant entropy changes are also effected by the metal ion. While binding



**Fig. 4.** Clustering results of one of the MD trajectories for  $\alpha_{holo}$ . The average structure is shown in cartoon. More (less) populated clusters are colored in darker (lighter) gray. A similar behavior was observed for the other  $\alpha_{holo}$ 's MD trajectory.

**Table 1**  
Population fractions of the four major clusters in the MD runs of the isolated  $\alpha$ -subunit.

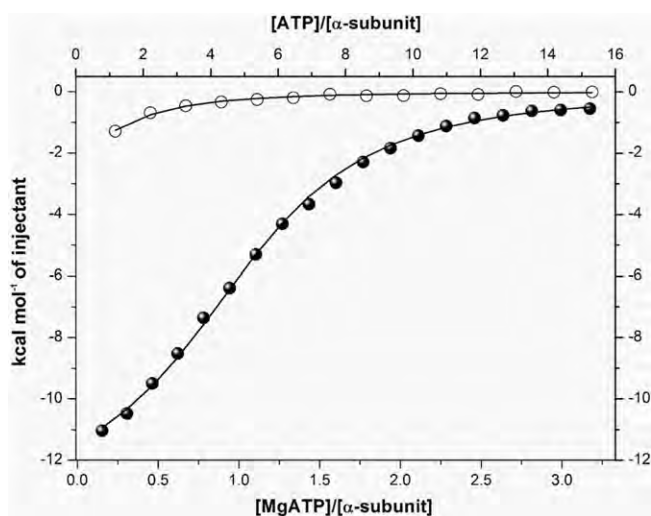
Cluster	$\alpha_{\text{apo}}$	$\alpha_{\text{holo}}$
1	$0.49 \pm 0.04$	$0.30 \pm 0.02$
2	$0.25 \pm 0.01$	$0.17 \pm 0.06$
3	$0.12 \pm 0.02$	$0.14 \pm 0.06$
4	$0.06 \pm 0.02$	$0.10 \pm 0.02$
Sum	$0.92 \pm 0.00$	$0.71 \pm 0.11$

of metal-free ATP is nearly isoentropic, a significant unfavorable entropy is observed in presence of Mg(II). As a result of this partial enthalpy/entropy compensation, the nucleotide affinity upon addition of Mg(II) shifts from the millimolar to the micromolar range.

Data in Table 2 show that binding enthalpy and entropy keep nearly constant in the temperature range spanned. Linear regression analysis of the thermal dependence of  $\Delta H_b$  ( $\Delta C_{p_b} = \partial \Delta H_b / \partial T$ ) yields small and positive heat capacity changes for the interaction of the  $\alpha$ -subunit with MgATP ( $20 \pm 15 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ). This magnitude contrasts with the negative  $\Delta C_{p_b}$  ( $= -150 \pm 20 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) reported for the binding of MgATP to the isolated  $\beta$ -subunit [35]. Previously, it was shown that this change is in quantitative agreement with the large open-to-closed conformational change that the catalytic subunit undergoes upon nucleotide binding [35,53]. In contrast, heat capacity increments are rarely seen in protein-ligand complexation events, and have been rationalized in terms of dominantly polar-to-polar interactions [54–56]. To have a structure-based estimation of  $\Delta C_{p_b}$ , we used the  $\alpha$ -subunit's conformation as observed in the crystal structure of MF<sub>1</sub> [37]. Assuming a rigid-body like association between  $\alpha_{\text{TP}}$  and MgATP, complex formation would be accompanied by the burying of 513 and 260 Å<sup>2</sup> of polar and apolar area, respectively. According to transfer data of model compounds [50], these changes in area exposition yield an expected  $\Delta C_{p_b} = +7 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , a magnitude that compares closely to that determined calorimetrically. Therefore, this result strongly suggests, in agreement with the MD simulations, that the isolated  $\alpha$ -subunit undergoes limited conformational changes upon ligand binding, with the experimental  $\Delta C_{p_b}$  primarily determined by the burying of nucleotide and protein polar surfaces at the binding interface.

### 3.3. Influence of Mg(II) on nucleotide recognition

As noted previously by Salcedo et al. [36], a striking difference between noncatalytic and catalytic subunits is the dependence they



**Fig. 5.** Calorimetric isotherms for the binding of ATP (open symbol) and MgATP (solid symbol) to the isolated  $\alpha$ -subunit at 35 °C, in an 0.05 M Tris HCl buffer solution supplemented with 0.1 M NaCl, pH 8.0.

**Table 2**  
Binding energetics of the isolated  $\alpha$ -subunit to free and Mg(II)-bound ATP<sup>a,b</sup>.

Temperature (°C)	$K_b^c$ (mM <sup>-1</sup> )	$\Delta G_b$ (kcal/mol)	$\Delta H_b$ (kcal/mol)	$-\text{T}\Delta S_b$ (kcal/mol)
$\alpha$ -MgATP				
20	$303 \pm 58$	-7.4	$-12.3 \pm 0.7$	4.9
25	$616 \pm 13$	-7.9	$-12.1 \pm 0.4$	4.2
30	$220 \pm 30$	-7.4	$-12.3 \pm 0.8$	4.9
35	$79 \pm 18$	-6.9	$-11.9 \pm 0.7$	5.0
$\alpha$ -ATP				
20	$2.6 \pm 0.3$	-4.6	$-4.6 \pm 0.7$	0
25	$1.8 \pm 0.1$	-4.5	$-4.5 \pm 0.7$	0
30	$2.0 \pm 0.5$	-4.6	$-4.5 \pm 0.7$	0.1
35	$1.9 \pm 0.7$	-4.6	$-4.4 \pm 0.7$	0.2

<sup>a</sup> Experimental conditions: 0.05 M Tris-HCl buffer solution supplemented with 0.1 M NaCl and 10% glycerol (pH 8.0).

<sup>b</sup> In the presence of Mg(II), an average fitting binding stoichiometry of  $0.9 \pm 0.1$  was obtained. In the absence of the metal ion, the stoichiometry was fixed to 1 in order to get fitting convergence.

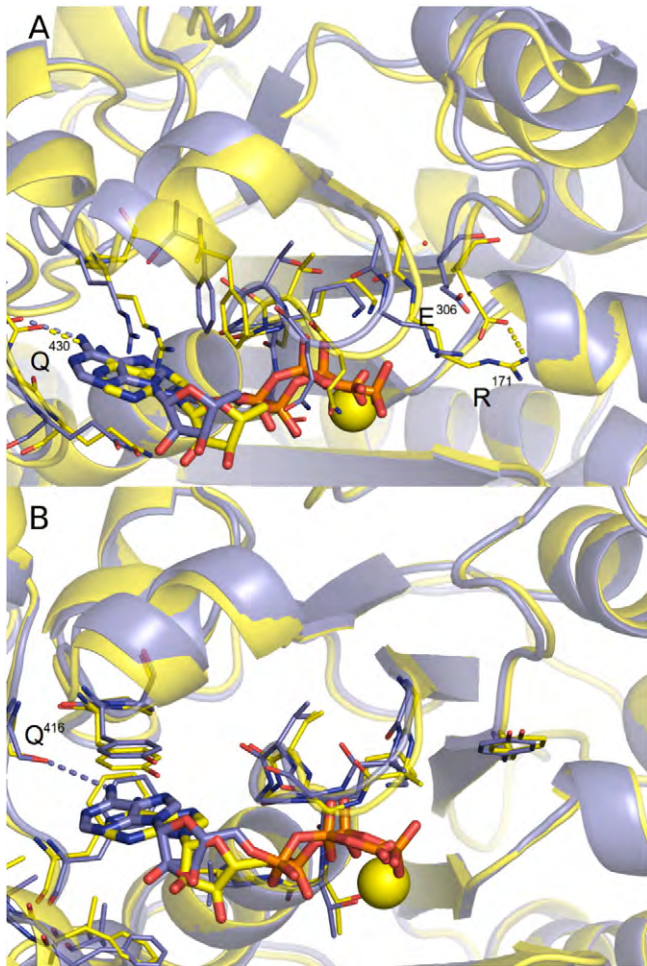
<sup>c</sup>  $K_b$  corresponds to  $K_{\text{pf}}$  or  $K_{\text{pb}}$  in Scheme 1 for the binding of Mg(II)-free or Mg(II)-bound nucleotide to the  $\alpha$ -subunit, respectively (Scheme 1).

show on Mg(II) for ATP recognition. According to data in Table 2, the heterotropic constant for the  $\alpha$ -subunit, defined as the ratio of the nucleotide binding constant in the presence of Mg(II) to that in absence of the metal, ranges from 342 at 25 °C to 42 at 35 °C. In contrast, the heterotropic constant for the  $\beta$ -subunit is around 7 in the temperature range of 15 to 30 °C [35]. To explore the structural determinants of such dissimilar behaviors, MD runs of the  $\alpha$ -subunit complexed to metal-free ATP were carried out. Similar runs were obtained for the  $\beta$ -subunit in complex with ATP and MgATP. We observed that in the average structures of both subunits (Fig. 6), the absence of Mg(II) elicited a 1–2 Å sliding movement of the nucleotide inside the binding site toward a glutamine residue ( $\alpha Q^{430}/\beta Q^{416}$ ), which is one residue away from the carboxyl end of the HTH motif. Both in the MD average and crystal structures,  $\alpha Q^{430}$ 's carbonyl group is hydrogen-bonded to the adenosine's primary amine (N6), an interaction that is preserved after Mg(II) depletion (Fig. 6A). In contrast,  $\beta Q^{416}$  does not interact with ATP in the presence of Mg(II) neither in the crystal nor in the average structure, while nucleotide sliding allows it to hydrogen-bond to adenine N6 (Fig. 6B). Therefore, the  $\beta$ -subunit seems to alleviate the loss of Mg(II)-mediated interactions by forming an additional hydrogen bond. Besides this difference, it can be seen in Fig. 6 that metal withdrawal produces a rearrangement of the  $\alpha$ -subunit binding site, which involves a displacement of the P-loop ( $D^{170}$ - $G^{175}$ ), disrupting the sidechain-to-sidechain interaction between  $R^{171}$  and  $E^{328}$ . In turn, a packing loosening is observed between the  $\alpha$ -helices F ( $G^{296}$ - $E^{307}$ ) and G ( $Y^{337}$ - $I^{344}$ ) in the central domain of the subunit. It is worthy to note that, although divalent ions are typically difficult to model in MD simulations, deviations from the original  $\alpha$ -subunit structure were observed only in the absence of Mg(II). Conversely, no rearrangement of the  $\beta$ -subunit's binding site was evident due to Mg(II) removal. In a crystal structure of MF<sub>1</sub> seemingly representing a posthydrolysis, preproduct-release intermediate conformation [57],  $\beta_{\text{TP}}$  and  $\beta_{\text{DP}}$  were found occupied by MgADP, while  $\beta_E$  was bound to metal-free ADP. In this last subunit, the nucleotide is significantly displaced away (8–9 Å) in relation to the position seen in the other subunits, occupying a site that is inaccessible in the closed conformations. Most likely, the metal-free ADP moves away dragged by the opening of the involved  $\beta$ -subunit following the catalytic pathway, making it therefore not directly comparable with the position of the metal-free nucleotide observed in our MD simulations.

### 3.4. Structural flexibility of isolated $\alpha$ -subunit

In spite of the limited displacements observed for the average structures of  $\alpha_{\text{apo}}$  and  $\alpha_{\text{holo}}$ , visual inspection of the aligned MD trajectories





**Fig. 6.** Average structures of ATP-complexed  $\alpha$ -subunit (A) and  $\beta$ -subunit (B) in presence (yellow-colored) and absence (purple-colored) of magnesium.

revealed that the C-terminal domain exhibits a large range of motion. Fig. 7A shows a selection of conformers from the MD trajectories, which is seen to encompass nearly the whole range of conformational variation between  $\beta_E$  and  $\beta_{TP}$ . Besides these conformers, a number of less populated conformers were observed which depart from a hypothetical linear interpolation pathway describing the transformation of  $\beta_E$  to  $\beta_{TP}$  [58]. Fig. 7B shows the temporal RMSD course of the C-terminal domain; the fluctuation range is similar to that of the isolated  $\beta$  subunit (Fig. S1) [49]. Fig. 7C shows the distance displacement of the loop in the  $\alpha$ -subunit's HTH motif, in relation to the position of the corresponding loop in the  $\beta_E$  and  $\beta_{TP}$  structures. The loop distance between the crystal  $\beta_E$  and  $\beta_{TP}$  structures is 13 Å, which is comparable to the largest movements exhibited by the  $\alpha$ -subunit. Overall, these observations substantiate the conclusion that the isolated  $\alpha$ -subunit is able to span nearly all the conformational space between the open and closed conformations of the  $\beta$ -subunit.

A comparative analysis of data in Fig. 7 reveals what seems to be a consistently distinctive effect of MgATP on the  $\alpha$ -subunit mobility, namely, that the C-terminal domain is able to undergo larger displacements in the nucleotide-bound form. In fact, the RMSD and HTH

displacement amplitudes of the complexed subunit are comparable to those exhibited by the isolated  $\beta_E$ , while nucleotide depletion yields a mobility similar to  $\beta_{TP}$  (Fig. S1). A conclusion akin to this is drawn from the comparison of 1) the RMSF values for the C-terminal domain (Fig. 2), which are smaller in  $\alpha_{apo}$  than in  $\alpha_{holo}$ ; and 2) the clustering results (Table 1), which indicate that in the presence of the nucleotide, the first four most populated clusters embrace a smaller fraction of the total conformers visited along the trajectory.

#### 4. Discussion

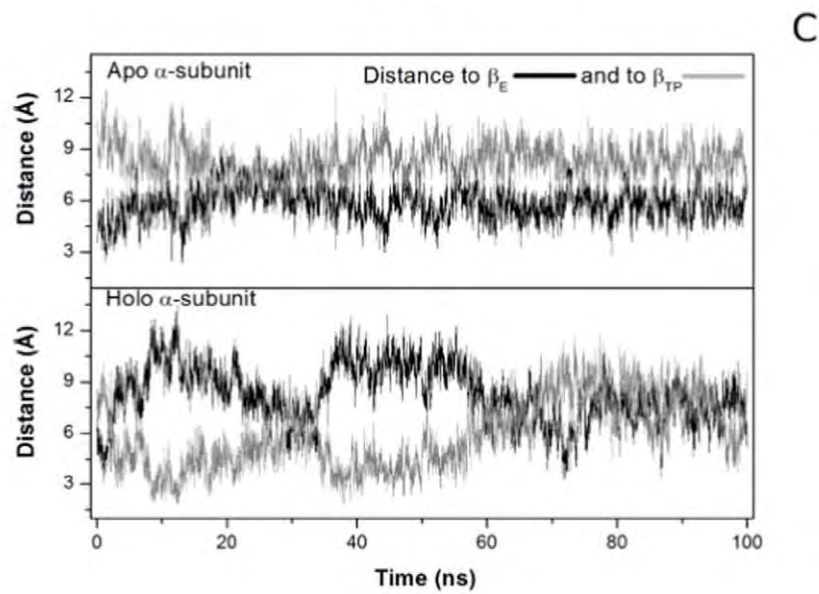
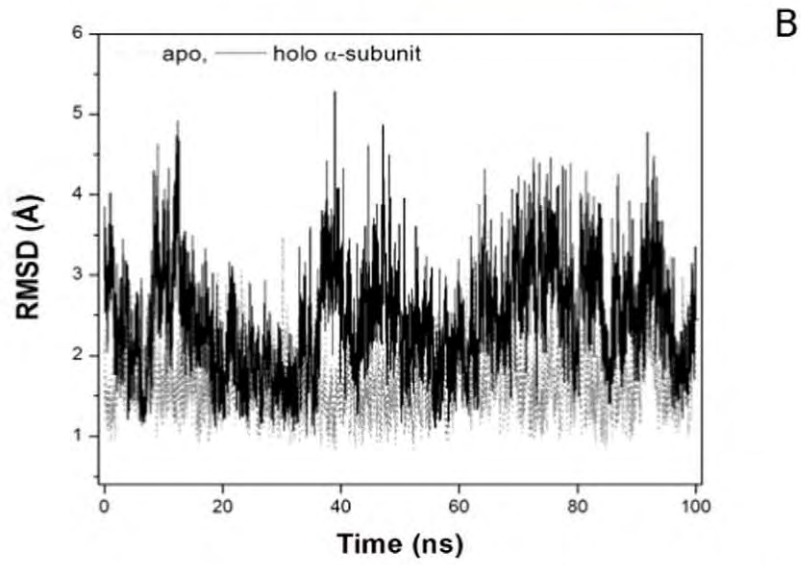
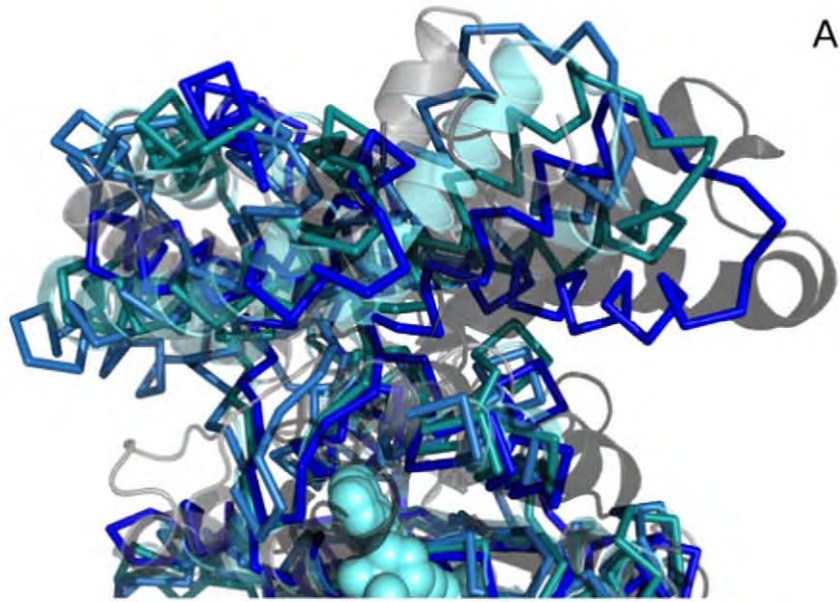
Compared with the  $\beta$ -subunit, much less is known about the conformational behavior of the  $\alpha$ -subunit, and the role it plays in the rotary mechanism of ATP synthase [21]. These two subunits have a common phylogenetic origin, presumably as a result of a gene duplication event [59]. They have nearly superimposable tri-domain architectures, and share similar nucleotide binding modes and interaction energies [4,36]. Nevertheless, their functions are substantially different. In this study, we have conducted an energetic and structural characterization of the perturbation undergone by the isolated  $\alpha$ -subunit upon nucleotide binding. The analysis of the calorimetric binding parameters and the free MD trajectories revealed that the association event only marginally modifies the average conformation of the  $\alpha$ -subunit. In turn, the conformation it adopts as an isolated subunit is very similar to that observed in  $F_1$ , indicating that the  $\alpha$ -subunit is in a relaxed form in the catalytic dwell structure of the enzyme.  $F_0F_1$ -ATP synthase possesses a sophisticated rotary mechanism able to couple chemical and mechanical energy with nearly 100% efficiency [60–62]. Similar to a macroscopic motor, the mechanism optimization depends on several factors, including that the individual components offer the least resistance to rotation, so the torque is not wastefully dissipated. In this sense, it is not surprising that the distinct conformational trends exhibited by  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits be an inherent property that manifest in the behavior of the isolated subunits.

Numerous studies have documented the large conformational flexibility of the  $\beta$ -subunit, and its role for driving the rotary mechanism [31,33,35,47–49,53,63–75]. In the absence of a nucleotide, the catalytic subunit is prone to transiently visit conformations similar to the closed structure, although this last conformation is stabilized only in the presence of the substrate [48,53,71]. During the unbiased MD simulations, the  $\alpha$ -subunit also showed ample structural flexibility, with displacements in the C-terminal domain that can be as large as those exhibited by the  $\beta$ -subunit. Therefore, the noncatalytic subunit also holds a rather flat free energy landscape, although with the global minimum optimized for positioning the C-terminal domain in an open-like conformation. This allows us to speculate that the common ancestor of  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits already possessed the ability to undergo hinge-like conformational transitions.

A still open question is why the  $\alpha$ -subunit retained the ability to recognize nucleotides. For different  $F_1$ -ATPases, the regulatory role of noncatalytic sites in ATPase activity has been demonstrated (for a recent review, see [21]). The binding of ATP at  $MF_1$  [26,76] and  $TF_1$  [77] noncatalytic sites promotes dissociation of inhibitory MgADP from a catalytic site and stimulates steady-state catalysis to an optimal level.  $CF_1$  shows a stronger dependence, since it requires nucleotide occupancy at the noncatalytic sites for catalytic activation [78]. At variance of these sectors, the ATPase activity of  $EF_1$  has been reported to be insensitive to the ligation state of  $\alpha$ -subunits [79]. The effect of noncatalytic sites on ATP synthase activity has been explored much less. In  $TF_0F_1$ , occupancy of noncatalytic sites is required for achieving maximum

**Fig. 7.** Conformational fluctuation of the  $\alpha$ -subunit's C-terminal domain. A) Selection of conformers (ribbons) observed during MD simulation of  $\alpha_{holo}$ . For comparison, crystal  $\beta_E$  (light gray) and  $\beta_{TP}$  (dark gray) structures are shown in cartoons, as well as the average  $\alpha$ -subunit conformation (cyan). B) Temporal RMSD course for  $\alpha_{apo}$  (gray line) and  $\alpha_{holo}$  (black line). For the sake of clarity, results from one replica for each system are shown, although similar behaviors were observed in the other replica. Averaged RMSD values from the two replica were  $1.7 \pm 0.4$  and  $2.5 \pm 0.7$  Å for  $\alpha_{apo}$  and  $\alpha_{holo}$ , respectively. Corresponding values for  $\beta_E$  and  $\beta_{TP}$  were  $3.0 \pm 0.8$  Å and  $2.0 \pm 0.5$ , respectively (Fig. S1). C) Distance of the loop in the  $\alpha$ -subunit's HTH motif to the corresponding loop in  $\beta_E$  (black line) and  $\beta_{TP}$  (gray line). For this measurement, distances were calculated between the average position of the loop flanking residues  $\alpha A^{401}$ ,  $\alpha A^{402}$ ,  $\alpha Q^{415}$ ,  $\alpha Q^{416}$  in the  $\alpha$ -subunits, and  $\beta K^{382}$ ,  $\beta S^{383}$ ,  $\beta K^{415}$ ,  $\beta L^{416}$  in the  $\beta$ -subunits.





synthase activity, but not for avoiding MgADP inhibition [80,81]. Also of note is the strong effect that membrane energization has on the nucleotide exchange at CF<sub>0</sub>F<sub>1</sub> noncatalytic sites [82]. On the other hand, from the apparently normal growth of modified *E. coli* strains bearing ATP synthase with  $\alpha$ -subunits lacking nucleotide-binding ability, it has been proposed that occupancy of noncatalytic sites is not required for normal ATP synthase activity [83]. Overall, no clear picture can yet be drawn of the importance of nucleotide binding by  $\alpha$ -subunits to the rotary mechanism of ATP synthase. Most probably, the function they play has not been developed equivalently in ATP synthases from different organisms. However, an important point that should not be overlooked is that noncatalytic sites are largely conserved in evolutionary distant organisms (Fig. S2). It is hard to imagine that such a degree of invariance is not coupled to some kind of positive evolutionary pressure for retaining binding ability at the noncatalytic sites.

In this study, we found that upon nucleotide binding, the structural fluctuations of the  $\alpha$ -subunit increase significantly, particularly in the C-terminal domain, allowing it to visit conformations closer to that of  $\beta_{TP}$ . This behavior contrasts with that of the  $\beta$ -subunit, whose structure stiffens in the nucleotide-bound form. In fact, the  $\alpha$ -subunit's mobility bound to (free of) nucleotide is comparable to that of the empty (nucleotide-bound)  $\beta$ -subunit. According to the packing exchange mechanism, the distinct formed between the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits is a key element in the rotary mechanism [31]. In particular,  $\beta_{DP}$  shows highly correlated movements in its C-terminal domain with the equivalent domains of the adjacent noncatalytic subunits  $\alpha_{DP}$  and  $\alpha_E$ . Therefore, conformational rearrangements in  $\beta_{DP}$  can be communicated to the other catalytic subunits via displacements of the C-terminal domain in the  $\alpha$ -subunits. It is tempting to propose that the nucleotide-binding ability of  $\alpha$ -subunits, at least in some species, was evolutionary conserved to allow them to reach, with lower energetic cost, transient conformers that facilitate and regulate the communication between  $\beta$ -subunits. It is worthy to recall that besides the C-terminal region, early mutagenesis results have implicated regions located in the nucleotide binding domain as important factors for the regulation of catalytic activity, at least in the hydrolytic mode of the enzyme [23,84].

As judged from the time needed to recover the baseline signal after each injection in our ITC experiments (typically 5 min), the isolated  $\alpha$ -subunit has a relatively rapid nucleotide-binding equilibrium. This observation is in line with the MD findings obtained here of a flexible, open-like  $\alpha$ -subunit, and in agreement with the behavior observed for TF<sub>1</sub>, whose noncatalytic sites exchange nucleotides rapidly [85]. In contrast, other F<sub>1</sub> sectors have been reported to retain nucleotides more persistently [23,86,87]. EF<sub>1</sub> noncatalytic sites, for instance, exchange nucleotides in a timescale of hours to days ( $k_{off} 10^{-5} s^{-1}$ ), which is more than 1000-fold slower than the rate of the corresponding catalytic sites) [23]. It is still unclear why the exchange-rate regimes vary largely among distinct F<sub>1</sub> sectors. Early structural analysis led to propose that MF<sub>1</sub> noncatalytic sites are able to sequester nucleotides due to the formation of several hydrogen bonds with the adenine ring [4]. This argument finds basis in the increasing number of studies documenting that relatively small changes in protein-ligand interactions may lead to drastically different binding/unbinding kinetics, in particular if variations occur at buried polar-to-polar interactions [88]. In fact,  $\alpha$ -subunits of evolutionary distant F<sub>1</sub> sectors show small changes in the way they interact with the nucleotide (Fig. S2). These differences, nevertheless, would not explain the heterogeneous binding strength and kinetics shown by the three noncatalytic sites of CF<sub>1</sub> [87,89] and MF<sub>1</sub> [86]. In these instances, the asymmetric environment within F<sub>1</sub> (including distinct site accessibilities and interaction modes) ostensibly plays a determinant role.

A salient difference evidenced from the comparison of the energetic signatures of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits is the larger dependence that the noncatalytic subunit presents on magnesium for recognizing ATP. Although both subunits present a positive cooperative heterotropic

effect, the  $\alpha$ -subunit's affinity was dramatically increased in the presence of the metal ion. According to reported fluorimetric determinations [45], binding constants for the isolated *E. coli*  $\alpha$ -subunit are 3.2 and 0.8  $\mu M^{-1}$  for MgATP and ATP, respectively. These affinities, which are significantly stronger than those determined in the present study (Table 2), yield a heterotropic constant of just  $\sim 4$ . It is not clear to us to what extent the differences between the two isolated  $\alpha$ -subunits signify conspicuously different inter-species behaviors, or to what extent it is due to variations in the experimental determinations (e.g., calorimetric vs fluorimetric techniques, coupled vs single site binding models, pH 8 vs pH 7). Conversely, previous fluorimetric studies on EF<sub>1</sub> reported for each noncatalytic site ATP-binding constants of 40 and 0.3  $mM^{-1}$  in presence and absence of the metal ion, respectively [23,79]. Although these values are around one order of magnitude smaller than those in Table 2, they yield a heterotropic constant of  $\sim 140$ , which falls in the range found in the present study for the isolated  $\alpha$ -subunit. Consistent with this last result, an analysis of the crystal structures of MF<sub>1</sub>, EF<sub>1</sub> [90] and TF<sub>1</sub> [91] reveal that the noncatalytic sites of the three species are very similar to each other (Fig. S2). Therefore, inter-species binding differences among  $\alpha$ -subunits most likely arise from sequence and conformational variations outside the binding site. In order to carry out a proper analysis of this subject, a detailed calorimetric characterization is warranted of the binding energetic profiles of isolated  $\alpha$ -subunits from different species.

In agreement with our calorimetric determinations, MD simulations revealed clear perturbations in the  $\alpha$ -subunit's binding site bound to free-metal ATP. Nucleotide sliding inside the site produced a displacement of the P-loop, with the concomitant unpacking of the adjacent helices F and G. In contrast, even though a similar nucleotide displacement was observed in the magnesium-depleted  $\beta$ -subunit, the binding site remained unchanged in relation to the average conformation with MgATP, which is in agreement with the smaller heterotropic constant exhibited by the catalytic subunit. These contrasting behaviors correlate with the function each subunit carries on. As a pure binder, the  $\alpha$ -subunit has a binding site optimized to interact with MgATP in ground state. Conversely, the absence of the metal elicits a complete loss of  $\beta$ -subunit's catalytic activity, indicating that its active site is optimized to stabilize the nucleotide at the transition state of the catalysis.

## Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

## Acknowledgments

O.H.H. is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). E.G.H. thanks DGAPA for the financial support during a sabbatical stay at the University of Barcelona, Spain. This work was financed by DGAPA, UNAM [PAPIIT, IN200115], CONACyT [Grants 166472, 235831], the Spanish Ministerio de Economía (SAF2012-33481) and the Catalan government (2014 SGR 1189). O.H.H. and G.S. received Ph. D. fellowships from CONACyT. We thank Dr. Patricia Cano-Sánchez for the valuable assistance in the expression of the recombinant  $\alpha$ -subunit, and the Barcelona Supercomputing Center for access to computational resources.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabo.2016.04.283>.

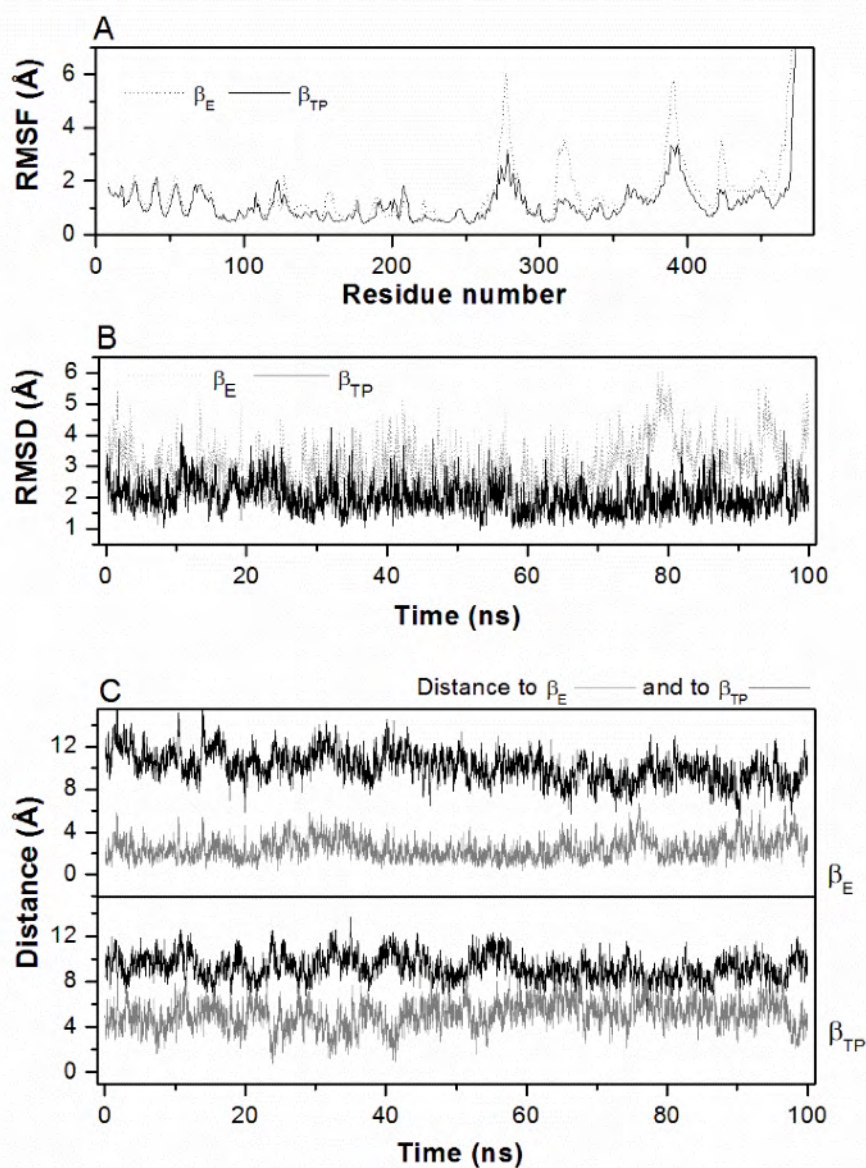
## References

- [1] P.D. Boyer, The ATP synthase—a splendid molecular machine, *Annu. Rev. Biochem.* 66 (1997) 717–749, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.717>.

- [2] K. Miwa, M. Yoshida, The  $\alpha 3\beta 3$  complex, the catalytic core of F1-ATPase, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 (1989) 6484–6487, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.86.17.6484>.
- [3] T. Uchiyoshi, R. Iino, T. Ando, H. Noji, High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F1-ATPase, Science 333 (2011) 755–758, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1205510>.
- [4] J.P. Abrahams, A.G.W. Leslie, R. Lutter, J.E. Walker, Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria, Nature 370 (1994) 621–628, <http://dx.doi.org/10.1038/370621a0>.
- [5] W. Yang, Y.Q. Gao, Q. Cui, J. Ma, M. Karplus, The missing link between thermodynamics and structure in F1-ATPase, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (2003) 874–879, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0337432100>.
- [6] H.Z. Mao, J. Weber, Identification of the  $\beta$ T site in the x-ray structure of F1-ATPase as the high-affinity catalytic site, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104 (2007) 18478–18483, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0709322104>.
- [7] R. Yasuda, H. Noji, M. Yoshida, K. Kinoshita, H. Itoh, Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase, Nature 410 (2001) 898–904, <http://dx.doi.org/10.1038/35073513>.
- [8] T. Masaïke, F. Koyama-Horibe, K. Oiwa, M. Yoshida, T. Nishizaka, Cooperative three-step motions in catalytic subunits of F1-ATPase correlate with 80° and 40° substep rotations, Nat. Struct. Mol. Biol. 15 (2008) 1326–1333, <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1510>.
- [9] R. Watanabe, H. Noji, Chemomechanical coupling mechanism of F(1)-ATPase: catalysis and torque generation, FEBS Lett. 587 (2013) 1030–1035, <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.063>.
- [10] T. Bilyard, M. Nakanishi-Matsui, B.C. Steel, T. Pilizota, A.L. Nord, H. Hosokawa, et al., High-resolution single-molecule characterization of the enzymatic states in *Escherichia coli* F1-ATPase, Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci. 368 (2013) 20120023, <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0023>.
- [11] D. Okuno, R. Fujisawa, R. Iino, Y. Hirono-Hara, H. Imamura, H. Noji, Correlation between the conformational states of F1-ATPase as determined from its crystal structure and single-molecule rotation, Proc. Natl. Acad. Sci. 105 (2008) 20722–20727, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0805828106>.
- [12] H. Sielaff, H. Rennekamp, S. Engelbrecht, W. Junge, Functional halt positions of rotary FOF1-ATPase correlated with crystal structures, Biophys. J. 95 (2008) 4979–4987, <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.108.139782>.
- [13] R.I. Menz, J.E. Walker, A.G.W. Leslie, Structure of bovine mitochondrial F1-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis, Cell 106 (2001) 331–341, [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00452-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00452-4).
- [14] K. Okazaki, S. Takada, Structural comparison of F1-ATPase: interplay among enzyme structures, catalysis, and rotations, Structure 19 (2011) 588–598, <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2011.01.013>.
- [15] T. Suzuki, K. Tanaka, K. Wakabayashi, E. Saita, M. Yoshida, Chemomechanical coupling of human mitochondrial F1-ATPase motor, Nat. Chem. Biol. 10 (2014) 930–936, <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1635>.
- [16] K. Kinoshita, K. Adachi, H. Itoh, Rotation of F1-ATPase: how an ATP-driven molecular machine may work, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 33 (2004) 245–268, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biophys.33.110502.132716>.
- [17] M. Karplus, J. Kuriyan, Molecular dynamics and protein function, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (2005) 6679–6685, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0408930102>.
- [18] C. von Ballmoos, A. Wiedenmann, P. Dimroth, Essentials for ATP synthesis by F1FO ATP synthases, Annu. Rev. Biochem. 78 (2009) 649–672, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.104803>.
- [19] J.E. Walker, The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown, Biochem. Soc. Trans. 41 (2013) 1–16, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmb.2012.06.013>.
- [20] W. Junge, N. Nelson, ATP synthase, Annu. Rev. Biochem. 84 (2015) 631–657, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034124>.
- [21] A.N. Malyan, Noncatalytic nucleotide binding sites: properties and mechanism of involvement in ATP synthase activity regulation, Biochemistry 78 (2013) 1512–1523, <http://dx.doi.org/10.1134/S0006297913130099>.
- [22] S. Nadanaciva, J. Weber, S. Wilke-Mounts, A.E. Senior, Importance of F1-ATPase residue  $\alpha$ -Arg-376 for catalytic transition state stabilization, Biochemistry 38 (1999) 15493–15499, <http://dx.doi.org/10.1021/bi9917683>.
- [23] J. Weber, A.E. Senior, Catalytic mechanism of F1-ATPase, Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 1319 (1997) 19–58, [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728\(96\)00121-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728(96)00121-1).
- [24] P. Falson, A. Goffeau, M. Boutry, J.M. Jault, Structural insight into the cooperativity between catalytic and noncatalytic sites of F1-ATPase, Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 1658 (2004) 133–140, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmb.2004.05.008>.
- [25] M.B. Murataliev, P.D. Boyer, The mechanism of stimulation of MgATPase activity of chloroplast F1-ATPase by non-catalytic adenine nucleotide binding. Acceleration of the ATP-dependent release of inhibitory ADP from a catalytic site, Eur. J. Biochem. 209 (1992) 681–687, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17336.x>.
- [26] J.M. Jault, W.S. Allison, Slow binding of ATP to noncatalytic nucleotide binding sites which accelerates catalysis is responsible for apparent negative cooperativity exhibited by the bovine mitochondrial F1-ATPase, J. Biol. Chem. 268 (1993) 1558–1566.
- [27] T. Matsui, E. Muneyuki, M. Honda, W.S. Allison, C. Dou, M. Yoshida, Catalytic activity of the  $\alpha 3\beta 3\gamma$  complex of F1-ATPase without noncatalytic nucleotide binding site, J. Biol. Chem. 272 (1997) 8215–8221, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.13.8215>.
- [28] T. Ishikawa, Y. Kato-Yamada, Severe MgADP inhibition of *Bacillus subtilis* F1-ATPase is not due to the absence of nucleotide binding to the noncatalytic nucleotide binding sites, PLoS ONE 9 (2014) e107197, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0107197>.
- [29] S. Furuïke, M.D. Hossain, Y. Maki, K. Adachi, T. Suzuki, A. Kohori, et al., Axle-less F1-ATPase rotates in the correct direction, Science 319 (2008) 955–958, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1151343>.
- [30] M.D. Hossain, S. Furuïke, Y. Maki, K. Adachi, T. Suzuki, A. Kohori, et al., Neither helix in the coiled coil region of the axle of F1-ATPase plays a significant role in torque production, Biophys. J. 95 (2008) 4837–4844, <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.108.140061>.
- [31] Y. Ito, M. Ikeguchi, Structural fluctuation and concerted motions in F1-ATPase: a molecular dynamics study, J. Comput. Chem. 31 (2010) 2175–2185, <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21508>.
- [32] Y. Ito, M. Ikeguchi, Molecular dynamics simulations of F1-ATPase, in: K. Han, X. Zhang, M. Yang (Eds.), Protein Conform. Dyn. Adv. Exp. Med. Biol. Springer International Publishing, Switzerland 2014, pp. 67–85, <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-02970-2>.
- [33] Y. Ito, M. Ikeguchi, Mechanism of the  $\alpha\beta$  conformational change in F1-ATPase after ATP hydrolysis: free-energy simulations, Biophys. J. 108 (2015) 85–97, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2014.11.1853>.
- [34] G. Pérez-Hernández, E. García-Hernández, R.A. Zubillaga, M.T. De Gómez-Puyou, Structural energetics of MgADP binding to the isolated  $\beta$  subunit of F1-ATPase from thermophilic bacillus PS3, Arch. Biochem. Biophys. 408 (2002) 177–183, [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00577-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00577-5).
- [35] N.O. Pulido, G. Salcedo, G. Pérez-Hernández, C. José-Núñez, A. Velázquez-Campoy, E. García-Hernández, Energetic effects of magnesium in the recognition of adenosine nucleotides by the F1-ATPase  $\beta$  subunit, Biochemistry 49 (2010) 5258–5268, <http://dx.doi.org/10.1021/bi1006767>.
- [36] G. Salcedo, P. Cano-Sánchez, M.T. De Gómez-Puyou, A. Velázquez-Campoy, E. García-Hernández, Isolated noncatalytic and catalytic subunits of F1-ATPase exhibit similar, albeit not identical, energetic strategies for recognizing adenosine nucleotides, Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 1837 (2014) 44–50, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmb.2013.08.005>.
- [37] M.W. Bowler, M.G. Montgomery, A.G.W. Leslie, J.E. Walker, Ground state structure of F1-ATPase from bovine heart mitochondria at 1.9 Å resolution, J. Biol. Chem. 282 (2007) 14238–14242, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M700203200>.
- [38] D.A. Case, J.T. Berryman, R.M. Betz, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham III, T.A. Darden, et al., Amber 2014, University of California, San Francisco, 2014.
- [39] O. Allnér, L. Nilsson, A. Villa, Magnesium ion–water coordination and exchange in biomolecular simulations, J. Chem. Theory Comput. 8 (2012) 1493–1502, <http://dx.doi.org/10.1021/ct3000734>.
- [40] K.L. Meagher, L.T. Redman, H.A. Carlson, Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field, J. Comput. Chem. 24 (2003) 1016–1025, <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.10262>.
- [41] D. Alvarez-García, X. Barril, Molecular simulations with solvent competition quantify water displacability and provide accurate interaction maps of protein binding sites, J. Med. Chem. 57 (2014) 8530–8539, <http://dx.doi.org/10.1021/jm5010418>.
- [42] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics, J. Mol. Graph. 14 (1996) 33–38.
- [43] D.R. Roe, T.E. Cheatham, PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data, J. Chem. Theory Comput. 9 (2013) 3084–3095, <http://dx.doi.org/10.1021/ct400341p>.
- [44] N. Michaud-Agrawal, E.J. Denning, T.B. Woolf, O. Beckstein, MDAnalysis: a toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations, J. Comput. Chem. 32 (2011) 2319–2327, <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21787>.
- [45] A.E. Senior, A. Muharemagić, S. Wilke-Mounts, Assembly of the stator in *Escherichia coli* ATP synthase. Complexation of  $\alpha$  subunit with other F1 subunits is prerequisite for  $\delta$  subunit binding to the N-terminal region of  $\alpha$ , Biochemistry 45 (2006) 15893–15902, <http://dx.doi.org/10.1021/bi0619730>.
- [46] N.O. Pulido, E.A. Chavelas, F. Turner, E. García-Hernández, Current applications of isothermal titration calorimetry to the study of protein complexes, in: E. García-Hernández, D.A. Fernández-Velasco (Eds.), Adv. Protein Phys. Chem. Transworld Research Network, India 2008, pp. 115–138.
- [47] J. Ma, T.C. Flynn, Q. Cui, A.G.W. Leslie, J.E. Walker, M. Karplus, A dynamic analysis of the rotation mechanism for conformational change in F1-ATPase, Structure 10 (2002) 921–931, [http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00789-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00789-X).
- [48] U. Kleinekathöfer, B. Isralewitz, M. Ditttrich, K. Schulten, Domain motion of individual F1-ATPase  $\beta$ -subunits during unbiased molecular dynamics simulations, J. Phys. Chem. A 115 (2011) 7267–7274, <http://dx.doi.org/10.1021/jp2005088>.
- [49] Q. Cui, G. Li, J. Ma, M. Karplus, A normal mode analysis of structural plasticity in the biomolecular motor F1-ATPase, J. Mol. Biol. 340 (2004) 345–372, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2004.04.044>.
- [50] K.P. Murphy, E. Freire, Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins, Adv. Protein Chem. 43 (1992) 313–361.
- [51] N.V. Prabhu, K.A. Sharp, Heat capacity in proteins, Annu. Rev. Phys. Chem. 56 (2005) 521–548, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physchem.56.092503.141202>.
- [52] S. Vega, O. Abian, A. Velázquez-Campoy, On the link between conformational changes, ligand binding and heat capacity, Biochim. Biophys. Acta 1860 (2016) 868–878, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.10.010>.
- [53] H. Yagi, N. Kajiwara, T. Iwabuchi, K. Izumi, M. Yoshida, H. Akutsu, Stepwise propagation of the ATP-induced conformational change of the F1-ATPase  $\beta$  subunit revealed by NMR, J. Biol. Chem. 284 (2009) 2374–2382, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M808212200>.
- [54] E.A. Chavelas, E. García-Hernández, Heat capacity changes in carbohydrates and protein-carbohydrate complexes, Biochem. J. 420 (2009) 239–247, <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20082171>.
- [55] B. Kuhle, R. Ficner, EIF5B employs a novel domain release mechanism to catalyze ribosomal subunit joining, EMBO J. 33 (2014) 1177–1191, <http://dx.doi.org/10.1002/emboj.201387344>.
- [56] L.A. Freiburger, O.M. Baettig, T. Sprules, A.M. Berghuis, K. Auclair, A.K. Mittermaier, Competing allosteric mechanisms modulate substrate binding in a dimeric enzyme, Nat. Struct. Mol. Biol. 18 (2011) 288–294, <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1978>.



- [57] D.M. Rees, M.G. Montgomery, A.G.W. Leslie, J.E. Walker, Structural evidence of a new catalytic intermediate in the pathway of ATP hydrolysis by F1-ATPase from bovine heart mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 11139–11143, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1207587109>.
- [58] T. Yoshidome, Y. Ito, M. Ikeguchi, M. Kinoshita, Rotation mechanism of F1-ATPase: crucial importance of the water entropy effect, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 4030–4039, <http://dx.doi.org/10.1021/ja109594y>.
- [59] J.P. Gogarten, L. Taiz, Evolution of proton pumping atpases: rooting the tree of life, *Photosynth. Res.* 33 (1992) 137–146.
- [60] O. Pänke, D.A. Cherepanov, K. Gumbiowski, S. Engelbrecht, W. Junge, Viscoelastic dynamics of actin filaments coupled to rotary F-ATPase: angular torque profile of the enzyme, *Biophys. J.* 81 (2001) 1220–1233, [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75780-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75780-3).
- [61] S. Toyabe, T. Watanabe-Nakayama, T. Okamoto, S. Kudo, E. Muneyuki, Thermodynamic efficiency and mechanochemical coupling of F1-ATPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 17951–17956, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1106787108>.
- [62] E. Saita, T. Suzuki, K. Kinoshita, M. Yoshida, Simple mechanism whereby the F1-ATPase motor rotates with near-perfect chemomechanical energy conversion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) 9626–9631, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1422885112>.
- [63] H. Yagi, K. Tozawa, N. Sekino, T. Iwabuchi, M. Yoshida, H. Akutsu, Functional conformation changes in the TF(1)-ATPase  $\beta$  subunit probed by 12 tyrosine residues, *Biophys. J.* 77 (1999) 2175–2183, [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77057-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77057-8).
- [64] Y. Ito, T. Oroguchi, M. Ikeguchi, Mechanism of the conformational change of the F1-ATPase  $\beta$  subunit revealed by free energy simulations, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 3372–3380, <http://dx.doi.org/10.1021/ja1070152>.
- [65] H. Wang, G. Oster, Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase, *Nature* 396 (1998) 279–282, <http://dx.doi.org/10.1038/24409>.
- [66] R.A. Böckmann, H. Grubmüller, Nanoseconds molecular dynamics simulation of primary mechanical energy transfer steps in F1-ATP synthase, *Nat. Struct. Biol.* 9 (2002) 198–202, <http://dx.doi.org/10.1038/nsb760>.
- [67] R.A. Böckmann, H. Grubmüller, Conformational dynamics of the F1-ATPase  $\beta$ -subunit: a molecular dynamics study, *Biophys. J.* 85 (2003) 1482–1491, [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74581-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74581-0).
- [68] N. Koga, S. Takada, Folding-based molecular simulations reveal mechanisms of the rotary motor F1-ATPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 5367–5372, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0509642103>.
- [69] J. Pu, M. Karplus, How subunit coupling produces the  $\gamma$ -subunit rotary motion in F1-ATPase, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 1192–1197, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0708746105>.
- [70] W. Zheng, Normal-mode-based modeling of allosteric couplings that underlie cyclic conformational transition in F(1) ATPase, *Proteins* 76 (2009) 747–762, <http://dx.doi.org/10.1002/prot.22386>.
- [71] Y. Ito, M. Ikeguchi, Molecular dynamics simulations of the isolated  $\beta$  subunit of F1-ATPase, *Chem. Phys. Lett.* 490 (2010) 80–83, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2010.03.015>.
- [72] K. Okazaki, G. Hummer, Phosphate release coupled to rotary motion of F1-ATPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 16468–16473, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1305497110>.
- [73] J. Czub, H. Grubmüller, Rotation triggers nucleotide-independent conformational transition of the empty  $\beta$  subunit of F1-ATPase, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 6960–6968, <http://dx.doi.org/10.1021/ja500120m>.
- [74] K. Nam, J. Pu, M. Karplus, Trapping the ATP binding state leads to a detailed understanding of the F1-ATPase mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 17851–17856, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1419486111>.
- [75] S. Mukherjee, A. Warshel, Dissecting the role of the  $\gamma$ -subunit in the rotary-chemical coupling and torque generation of F1-ATPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) 2746–2751, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1500979112>.
- [76] Y.M. Milgrom, R.L. Cross, Nucleotide binding sites on beef heart mitochondrial F1-ATPase. Cooperative interactions between sites and specificity of noncatalytic sites, 268 (1993) 23179–23185.
- [77] T. Amano, T. Matsui, E. Muneyuki, H. Noji, K. Hara, M. Yoshida, et al.,  $\alpha 3\beta 3\gamma$  complex of F1-ATPase from thermophilic bacillus PS3 can maintain steady-state ATP hydrolysis activity depending on the number of non-catalytic sites, *Biochem. J.* 138 (1999) 135–138.
- [78] Y.M. Milgrom, L.L. Ehler, P.D. Boyer, ATP binding at noncatalytic sites of soluble chloroplast F1-ATPase is required for expression of the enzyme activity, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 18725–18728.
- [79] J. Weber, S. Wilkemovents, E. Grell, A.E. Senior, Tryptophan fluorescence provides a direct probe of nucleotide-binding in the noncatalytic sites of *Escherichia coli* F1-ATPase, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 11261–11268.
- [80] P. Richard, B. Pitard, J.-L. Rigaud, ATP synthesis by the F0F1-ATPase from the thermophilic bacillus PS3 co-reconstituted with bacteriorhodopsin into liposomes: evidence for stimulation of ATP synthesis by ATP bound to a noncatalytic binding site, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 21571–21578, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.37.21571>.
- [81] D. Bald, T. Amano, E. Muneyuki, B. Pitard, J.L. Rigaud, J. Kruijff, et al., ATP synthesis by F0F1-ATP synthase independent of noncatalytic nucleotide binding sites and insensitive to azide inhibition, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 865–870, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.2.865>.
- [82] A.N. Malyan, ADP and ATP binding to noncatalytic sites of thiol-modulated chloroplast ATP synthase, *Photosynth. Res.* 88 (2006) 9–18, <http://dx.doi.org/10.1007/s11120-005-9025-9>.
- [83] J. Weber, C. Bowman, S. Wilke-Mounts, A.E. Senior,  $\alpha$ -aspartate 261 is a key residue in noncatalytic sites of *Escherichia coli* F1-ATPase, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 21045–21049, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.36.21045>.
- [84] N.B. Grodsky, C. Dou, W.S. Allison, Mutations in the nucleotide binding domain of the  $\alpha$  subunits of the F1-ATPase from thermophilic bacillus PS3 that affect cross-talk between nucleotide binding sites, 2960 (1998) 1007–1014, <http://dx.doi.org/10.1021/bi972349d>.
- [85] M. Yoshida, W. Allison, Characterization of the catalytic and noncatalytic ADP binding sites of the F1-ATPase from the thermophilic bacterium, PS3, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 5714–5721.
- [86] F.A. Kironde, R.L. Cross, Adenine nucleotide binding sites on beef heart F1-ATPase. Asymmetry and subunit location, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 3488–3495.
- [87] A.N. Malyan, W.S. Allison, Properties of noncatalytic sites of thioredoxin-activated chloroplast coupling factor 1, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1554 (2002) 153–158, [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728\(02\)00239-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728(02)00239-6).
- [88] P. Schmidtke, F.J. Luque, J.B. Murray, X. Barril, Shielded hydrogen bonds as structural determinants of binding kinetics: application in drug design, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 18903–18910, <http://dx.doi.org/10.1021/ja207494u>.
- [89] Y.M. Milgrom, L.L. Ehler, P.D. Boyer, The characteristics and effect on catalysis of nucleotide binding to noncatalytic sites of chloroplast F1-ATPase, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 11551–11558.
- [90] G. Cingolani, T.M. Duncan, Structure of the ATP synthase catalytic complex (F1) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18 (2011) 701–707, <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2058>.
- [91] Y. Shirakihara, A. Shiratori, H. Tanikawa, M. Nakasako, M. Yoshida, T. Suzuki, Structure of a thermophilic F1-ATPase inhibited by an  $\epsilon$ -subunit: deeper insight into the  $\epsilon$ -inhibition mechanism, *FEBS J.* 282 (2015) 2895–2913, <http://dx.doi.org/10.1111/febs.13329>.



**Figure S1.** Conformational fluctuation of the  $\beta$ -subunit's C-terminal domain observed in a 100 ns-long MD simulation. **A)** RMSF ( $\alpha$ -carbons) for MgATP-bound  $\beta_{TP}$  (solid line) and nucleotide-free  $\beta_E$  (dotted line). **B)** Temporal RMSD course for the  $\beta$ -subunits. **C)** Distance of the loop in the HTH motif to the corresponding position in crystal  $\beta_E$  (gray line) and  $\beta_{TP}$  (black line). For this measurement, the distances between the average position of the loop flanking residues  $\beta K^{382}, \beta S^{383}, \beta K^{415}$  and  $\beta L^{416}$  were calculated.

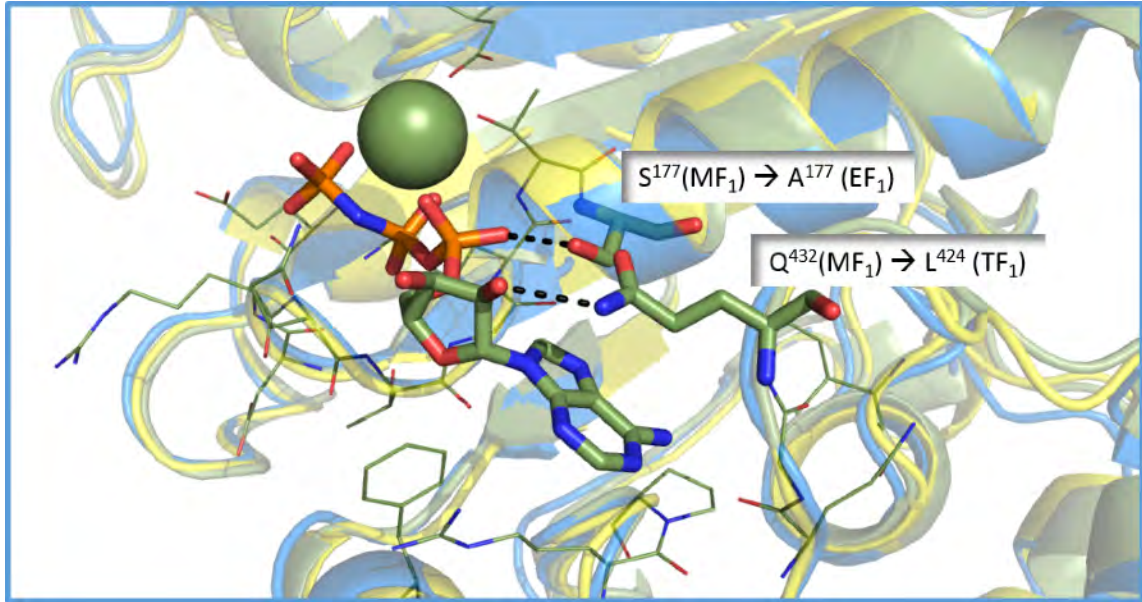


Figure S2. Superposition of noncatalytic sites from MF<sub>1</sub> (green colored; pdb code 2JDI), EF<sub>1</sub> (yellow colored; pdb code 3OAA) and TF<sub>1</sub> (blue colored; pdb code 4XD7). Residues at a distance  $\leq 5$  Å from the MgATP ligand and identical in the three species are shown in lines, while mutated residues (in relation to the bovine subunit) are in sticks.