



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

Estudio computacional del cambio conformacional de la subunidad no catalítica F1- α de la
ATP sintetasa mediante dinámica molecular

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Otto Hahn Herrera

Tutor: Dr. Enrique García Hernández

Instituto de Química UNAM

Ciudad de México, Noviembre 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Estudio computacional del cambio conformacional de la subunidad no catalítica F1- α
de la ATP sintetasa mediante dinámica molecular**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. Otto Hahn Herrera

Tutor: Dr. Enrique García Hernández

Instituto de Química UNAM



Ciudad de México, 2016

Una parte de los resultados obtenidos fueron publicados en la revista BBA Bioenergetics:

Autores: Otto Hahn-Herrera, Guillermo Salcedo, Xavier Barril, Enrique García-Hernández

Año: 2016

Título: Inherent conformational flexibility of F1-ATPase α -subunit

Revista: Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics

Volumen: 1857

Páginas: 1392-1402

doi: 10.1016/j.bbabbio.2016.04.283

Jurado Asignado

Presidente: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Primer Vocal: Dr. Arturo Rojo Domínguez

Segundo Vocal: Dr. José de Jesús García Trejo

Tercer Vocal: Dra. Karina Martínez Mayorga

Secretario: Dra. Laura Domínguez Dueñas

Lugar donde se realizó la tesis:

Departamento de Biomacromoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

M. en C. Otto Hahn Herrera

Sustentante

Dr. Enrique García Hernández

Asesor

A Biani
A mis padres, mi hermana y mi familia
A mis manitos

Agradecimientos

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 IN200115, así como del Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACyT), proyectos 235831 y 166472 y la beca 218841.

Índice general

| | |
|--|------------|
| 1. Introducción | XII |
| 2. Antecedentes | 1 |
| 2.1. El mecanismo de unión alternante | 2 |
| 2.2. El sector F_O | 3 |
| 2.3. El sector F_1 | 5 |
| 2.4. La subunidad β | 6 |
| 2.5. La subunidad α | 7 |
| 2.6. Interacción del Magnesio con nucleótidos di y tri fosfato | 10 |
| 3. Hipótesis | 12 |
| 4. Objetivos | 13 |
| 4.1. Objetivo general | 13 |
| 4.2. Objetivos particulares | 13 |
| 5. Metodología | 14 |
| 5.1. Métodos computacionales | 14 |
| 5.2. Métodos experimentales | 16 |
| 5.3. Dinámica molecular | 19 |
| 5.3.1. Ecuaciones e integradores | 21 |
| 5.3.2. Interacciones intermoleculares y campos de fuerza | 24 |
| 5.3.3. Modelos de disolvente | 26 |
| 5.3.4. Termostatos y barostatos | 27 |

| | |
|--|-----------|
| 5.4. Métodos de análisis | 28 |
| 5.4.1. Alineamiento de estructuras | 28 |
| 5.4.2. RMSD | 29 |
| 5.4.3. RMSF | 30 |
| 5.4.4. Radio de giro | 30 |
| 5.4.5. Correlación dinámica | 30 |
| 5.5. Agrupamiento | 31 |
| 5.6. Calorimetría de titulación isotérmica | 32 |
| 6. Resultados | 34 |
| 6.1. Conformación promedio de la subunidad α aislada. | 34 |
| 6.2. Termodinámica de interacción de la subunidad α aislada con MgATP | 36 |
| 6.3. Influencia del ion Mg(II) | 40 |
| 6.4. Flexibilidad estructural de la subunidad α aislada | 42 |
| 6.5. Análisis de los mapas de correlación dinámica de la subunidad α | 44 |
| 7. Conclusiones | 46 |
| 7.1. Discusión | 46 |
| 7.2. Perspectivas | 48 |
| A. Artículo | 49 |
| Bibliografía | 61 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| 2-1. Representación esquemática del complejo F_0F_1 de la ATP sintasa. Se puede apreciar el flujo de protones en la parte inferior del esquema en el sector F_0 y la zona del complejo F_1 con el anillo de subunidades α y β en la parte superior. | 1 |
| 2-2. Esquema del mecanismo de cambio de unión tal como se interpretan las mediciones de [1]: Pausa de unión a nucleótido, unión a nucleótido, pausa catalítica, liberación de fosfato. Las diferentes etapas del mecanismo se indican junto con el ángulo de rotación en el cual ocurren. | 3 |
| 2-3. Vista de el anillo F_1 : en rojo se muestran las subunidades α , en verde β y la subunidad γ en amarillo. | 5 |
| 2-4. La subunidad $F_1\beta$ El dominio N-terminal se muestra en rojo, el dominio de unión a nucleótido en verde y el C-terminal en magenta. Se puede observar la orientación del nucleótido y del $Mg(II)$ | 6 |
| 2-5. Coordinación del ion magnesio por los fosfatos β y γ del ATP. | 7 |
| 2-6. La subunidad $F_1\alpha$ El dominio N-terminal se muestra en rojo, el dominio de unión a nucleótido en verde y el C-terminal en magenta. Se puede observar la orientación del nucleótido y del $Mg(II)$ | 9 |
| 5-1. Equilibrio de unión ternario entre la subunidad $F_1 \alpha$ aislada (α), $Mg(II)$ y ATP. La habilidad del ATP para formar complejos bidentados con $Mg(II)$ ha sido tomada en cuenta. | 17 |
| 5-2. Ejemplo de un pozo de energía potencial para una molécula diatómica. La profundidad del pozo es $-\varepsilon$ y el ancho del pozo es σ | 20 |

| | |
|---|----|
| 5-3. La descripción física utilizada para describir el modelo de disolvente TIP3P, donde σ es el radio de la molécula, θ es el ángulo de la molécula y la contribución electrostática está dada por las cargas q_1 y q_2 . La distancia entre los átomos de oxígeno e hidrógeno se denomina l_1 | 26 |
| 6-1. Alineamiento estructural de la subunidad α (azul) a la subunidad β . A) y B) Mejor superposición global a β_E (gris claro) y β_{TP} (gris oscuro), respectivamente. C) alineamiento basado en los dominios centrales. | 35 |
| 6-2. RMSF de la dinámica de apo (punteada) y holo (sólida). Las estructuras fueron alineadas a la estructura promedio de la dinámica correspondiente | 36 |
| 6-3. Estructuras promedio de las trayectorias de dinámica molecular para α_{apo} (naranja y rojo) y α_{holo} (gris y negro). La estructura cristalina de α_{TP} , mostrada en caricatura azul, fue tomada del PDB con código 2JDI [2] | 37 |
| 6-4. “Clusters” principales sobre las estructuras de la dinámica comparados con la estructura cristalográfica (amarillo) la ocupación está indicada por el tono de la estructura de mayor ocupación (negro) a menor (gris claro). | 38 |
| 6-5. Curva de titulación de ATP sintasa mediante ITC. | 38 |
| 6-6. Entalpía de unión de la subunidad α con ATP medida experimentalmente en función de la temperatura. Se muestran los casos en presencia y ausencia de magnesio. . . | 39 |
| 6-7. Estructuras promedio de la subunidad α (A) y β (B) en presencia (amarillo) y ausencia (morado) de magnesio obtenidas de las trayectorias. | 41 |

- 6-8. Fluctuación conformacional de dominio C-terminal de la subunidad α . A) Se muestra una selección de conformeros observados en las trayectorias de dinámica molecular para $alpha_{holo}$. En comparación las estructuras de β_E (gris claro) y β_{TP} (gris oscuro) se muestran en caricatura, así como las conformaciones promedio de la subunidad α (cian). B) Curso temporal del RMSD para α_{apo} (línea gris) y α_{holo} (línea negra). Sólo se muestran los resultados de una corrida, aunque fueron obtenidos resultados similares para las demás réplicas. Los resultados promedio de RMSD para las dos réplicas fueron 1.7 ± 0.4 and 2.5 ± 0.7 Å para α_{apo} y α_{holo} , respectivamente. Los valores correspondientes para β_E y β_{TP} 3.0 ± 0.8 Å y 2.0 ± 0.5 , respectivamente. C) Distancia del loop en el motivo HTH de la subunidad α correspondiente al mismo loop en β_E (línea negra) y β_{TP} (línea gris). Para esta medida, las distancias fueron calculadas entre los centros geométricos de los residuos que flanquean al asa $\alpha A 401$, $\alpha A 402$, $\alpha Q 415$, $\alpha Q 416$ en las subunidades α , y $\beta K 382$, $\beta S 383$, $\beta K 415$, $\beta L 416$ en las subunidades β 43
- 6-9. Mapa de correlación dinámica de la subunidad α_{holo} a lo largo de la trayectoria. Las zonas en rojo indican correlaciones positivas más altas. En azul se muestran las correlaciones negativas. nótese la correlación entre el dominio de unión a nucleótido y el carboxilo terminal. 45
- 6-10. Mapa de correlación dinámica de la subunidad α_{apo} a lo largo de la trayectoria. Las zonas en rojo indican correlaciones positivas más altas. En azul se muestran las correlaciones negativas. Es importante comparar esta imagen con la obtenida para la subunidad holo, y notar que las correlaciones entre el dominio de unión a nucleótido y el domino C-terminal se ven mas débiles. 45

Capítulo 1

Introducción

El paso final de la cadena respiratoria es la generación de trifosfato de adenosina (ATP). Este proceso es llevado a cabo por la F_0F_1 ATP sintasa, la cual es una enzima multimérica que consiste en dos sectores rotatorios acoplados mecánicamente. La energía para esta reacción es derivada de la fuerza protón motriz. El sector transmembranal F_0 transmite la torca generada al sector intermembranal F_1 , el cual sintetiza el ATP a partir de ADP y fosfato a través de la acción alternada de sus tres sitios catalíticos [3]. En ausencia del gradiente transmembranal de protones o cuando es disociada de F_0 , F_1 convierte la energía química del ATP en energía rotacional, a través de la hidrólisis. La arquitectura más simple de F_1 con actividad catalítica yrotacional consiste en una estructura de tres pares de subunidades α/β (denominadas núcleo catalítico) [4], del cual surge la subunidad rotatoria γ . Recientemente, se ha demostrado que el anillo $\alpha_3\beta_3$ también es capaz de llevar a cabo la catálisis, aunque con actividad reducida [5]. Cada uno de los tres sitios catalíticos está formado por residuos de una subunidad β , complementados con unos pocos residuos de la subunidad α adyacente. Los sitios no son equivalentes tanto estructural como termodinámicamente y, actualmente, son denominados basados en su ocupación por nucleótido en la estructura original de F_1 de bovino (MF_1): β_{TP} para el unido a ATP, β_{DP} para el unido a ADP y β_E para el desocupado [3, 6]. β_{TP} y β_{DP} exhiben conformaciones casi sobreponibles con su carboxilo terminal adoptando una conformación cerrada, aunque distintas interacciones con las subunidades α y γ adyacente las vuelven diferentes entre sí. En contraste, la subunidad β_E muestra una conformación abierta, en la cual el dominio carboxilo terminal adopta una conformación abierta e interactúa marginalmente con las subunidades adyacentes. Se ha sugerido que β_{TP} es el sitio de alta afi-

nidad a ATP y β_{DP} es la subunidad lista para llevar a cabo la catálisis [7, 8]. Las tres subunidades α también son capaces de reconocer y unir nucleótidos, aunque sin presentar actividad catalítica. Los últimos años han sido prolíficos en la generación de datos teóricos y experimentales que permiten un entendimiento profundo de muchos aspectos del mecanismo rotatorio de F_1 . Sin embargo, no existe una descripción universalmente aceptada del mecanismo catalítico y muchos aspectos necesitan aún ser aclarados. Una revolución completa de la subunidad γ es impulsada por la hidrólisis de 3 moléculas de ATP. Cada ciclo de 120° consiste de dos subpasos rotatorios que interconvierten dos estados metaestables: la unión a ATP y la pausa catalítica [9]. A pesar de todo lo que se conoce sobre el mecanismo de F_1 y de su subunidad catalítica, el comportamiento conformacional de la subunidad α no ha sido explorado a detalle y su papel dentro del anillo F_1 no es completamente claro. En el presente estudio hemos combinado dinámica molecular sin restricciones con determinaciones calorimétricas de firmas termodinámicas para investigar la flexibilidad conformacional de las subunidades α aisladas, como un paso para profundizar la comprensión de su función dentro del anillo $\alpha_3\beta_3$. El plan del siguiente documento consiste en exponer los antecedentes pertinentes a este trabajo, la hipótesis, los objetivos derivados de ella, la metodología empleada, resultados y conclusiones.

Capítulo 2

Antecedentes

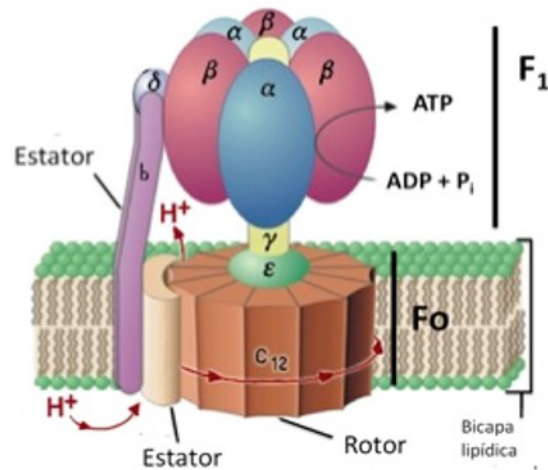


Figura 2-1: Representación esquemática del complejo F_0F_1 de la ATP sintasa. Se puede apreciar el flujo de protones en la parte inferior del esquema en el sector F_0 y la zona del complejo F_1 con el anillo de subunidades α y β en la parte superior.

La ATP sintasa es un complejo multimérico que se puede separar en dos sectores, uno extramembranal o F_1 , y otro transmembranal o F_0 2-1. En bacteria, la porción extramembranal está compuesta por las subunidades α , β , γ y ϵ con estequiometría: 3:3:1:1:1, mientras que la transmembranal está compuesta por las subunidades a, b, c con estequiometría 1:1:9-14.

El estudio molecular de esta enzima se inició en 1960, cuando Racker reportó el aislamiento de un factor soluble de extractos de mitocondrias de bovino. Basado en estos resultados, Mitchell

en 1961 propuso la hipótesis quimiosmótica, la cual postula que la fuerza protón motriz es un intermediario de alta energía que conecta la cadena respiratoria con la síntesis de ATP. Posteriormente, esta hipótesis fue verificada al comprobarse la formación de ATP en ausencia de luz dentro de cloroplastos mediante transiciones ácido-base. Esto condujo a experimentos para tratar de comprender cómo la energía almacenada en el flujo de protones podía utilizarse en la síntesis de ATP. Basándose en la cinética de la catálisis enzimática, Boyer propuso el mecanismo de cambio de unión, observando el intercambio de ^{18}O entre el agua y ATP/ P_i en sitios alternantes de la enzima [9].

2.1. El mecanismo de unión alternante

En 1978, Peter Mitchell propuso que la conversión energética en las mitocondrias pasa por el consumo de NADH para generar un gradiente electroquímico que fuerza el movimiento de protones a través de la membrana interna mitocondrial y que se denomina fuerza protón- motriz. Demostró que la fuerza protón-motriz es utilizada por la ATP sintasa para la generación de ATP a partir de ADP y fosfato, no sólo en mitocondrias, sino también en cloroplastos y eubacterias.

Conociendo tanto la estequiometría como la capacidad de unión de ATP de F_1 y de sus subunidades, Boyer propuso que la síntesis de ATP ocurre a través de un mecanismo de unión alternante [6, 7]. Este mecanismo involucra el cambio conformacional cooperativo de las tres subunidades β , y cada una de ellas presenta diferente afinidad por el nucleótido. Boyer propuso que γ , δ y ϵ giran como un cilindro asimétrico, resultando en una interacción alternada con los tres diferentes pares $\alpha\beta$. Esta rotación induce cambios estructurales en β , los cuales conducen a diferencias en la capacidad de unión durante el ciclo. Esto fue observado experimentalmente a través de la primera estructura cristalográfica de F_1 [6], la cual muestra las subunidades catalíticas en tres conformaciones diferentes.

Las propiedades mecánicas y motoras de F_1 han sido extensamente estudiadas usando como modelo a F_1 de *Bacillus PS3* [1, 10], mediante la unión de una sonda fluorescente a la subunidad γ del complejo F_1 . Al adicionar ATP a la solución, fue posible observar directamente la rotación de la sonda, evidenciando que la unión a ligando involucra la rotación de la subunidad γ dentro de $\alpha_3\beta_3$. La dirección de la rotación de hidrólisis es contrarreloj vista desde el lado de la membrana.

F_1 hidroliza 3 moléculas de ATP por revolución, compuesto de tres subpasos de 120° . Comenzando desde la orientación de la subunidad- γ a 0° (pausa de unión a ATP), la unión de ATP a la subunidad β con un sitio catalítico libre genera torque que promueve una rotación de 80° en la subunidad- γ . Posteriormente, el ATP dentro de la siguiente subunidad β es hidrolizado (pausa catalítica). La hidrólisis produce una inhibición por MgADP la cual es la causante de esta pausa. La liberación de fosfato producto de la hidrólisis por la siguiente subunidad produce el torque necesario para una rotación de 40° y así completar un ciclo de la rotación de 120° (ver 2-2).

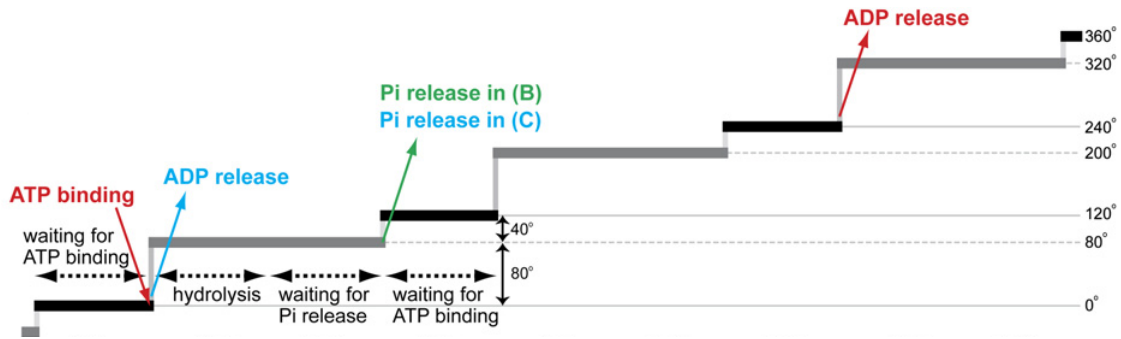


Figura 2-2: Esquema del mecanismo de cambio de unión tal como se interpretan las mediciones de [1]: Pausa de unión a nucleótido, unión a nucleótido, pausa catalítica, liberación de fosfato. Las diferentes etapas del mecanismo se indican junto con el ángulo de rotación en el cual ocurren.

Una de las facilidades que se encuentra al estudiar el complejo F_0F_1 es que ambos sectores pueden desacoplarse para su estudio sin pérdida completa de funcionalidad.

2.2. El sector F_0

Su estructura es la de un anillo oligomérico formado por las subunidades c, flanqueado por las subunidades a y b, las cuales se encuentran fuera del anillo. Las subunidades c (con estequiometría entre 10 y 14 dependiendo de la especie) se encuentran plegadas como 2 hélices α transmembranales conectadas por un asa polar. Dentro del oligómero, la hélice amino-terminal está anclada con mayor rigidez en el interior del anillo y la hélice carboxilo-terminal se encuentra débilmente empacada en la parte exterior. La translocación de protones a partir de la fuerza proton motriz se efectúa por la protonación de un grupo carboxilo dentro de la subunidad c (cD-61), el cual se encuentra cerca del centro de la región hidrófoba del extremo C-terminal y actúa como un puente para facilitar el paso de protones [3, 11, 12]. El mecanismo general para el tránsito

de protones a través de F_O involucra la participación de la subunidad a, la cual forma parte de la región del estator. Se ha llegado a determinar una topología estructural para la subunidad a en la región carboxilo terminal. Se ha propuesto una zona de cuatro hélices transmembranales, una región polar cerca del residuo aK66 y el extremo C-terminal en el citoplasma. Estas regiones constituyen dos terceras partes de la subunidad. Sin embargo, la estructura de la región amino terminal no ha sido determinada. Algunas propuestas consideran la presencia de una y otros de dos hélices extra dentro de esta región. En este mecanismo, se sugiere que el carboxilo desprotonado de la subunidad cD61 une al protón formando el complejo protón-carboxilato de un lado de la membrana originando un cambio conformacional que reorienta al residuo protonado. Posteriormente, la cadena lateral de la arginina aR210 desplaza al protón formando un puente salino con el carboxilo de cD61, permitiendo así su liberación del lado opuesto de la membrana. También existe evidencia de la probable participación de los residuos aGlu219 y aH245. Sin embargo, el mecanismo preciso aún no ha sido determinado y aunque la presencia de R210 no es necesaria durante el transporte pasivo de iones en ausencia de F_1 , es un aminoácido altamente conservado y cualquier mutación impide la translocación de protones y la síntesis de ATP [13–15]. Las subunidades b son un complejo dimérico que posee un segmento hidrofóbico de cerca de 30 residuos en la región amino terminal y se ha predicho que posee una hélice transmembranal. El restante 80% de la molécula es hidrofílica, con una longitud aproximada de 125 residuos y una zona hidrófoba en la región bV124-A132 en la región carboxilo terminal. Se ha determinado mediante dicroísmo circular que alrededor del 80% de la subunidad b consiste en hélices- α . Estudios como la reconstitución, fotomarcación intermembranal, proteólisis, unión a anticuerpos y mutagénesis, indican que la hélice transmembranal de la región amino-terminal interactúa con las subunidades a y c [16]. Se ha propuesto además una función de anclaje a la membrana. La función del segmento carboxilo-terminal se ha propuesto que es la unión y retención del anillo F_1 . Mediante mutagénesis dirigida, se ha establecido que la región b124-131 se encuentra involucrada en la formación del homodímero. La función de esta subunidad se ha ligado a la función de evitar que acompañe el movimiento de γ y al acoplamiento del paso de protones a través de F_O y la comunicación de sus efectos a F_1 .

2.3. El sector F_1

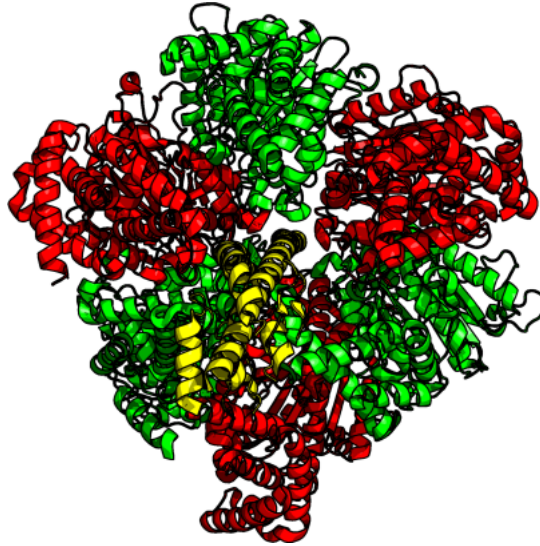


Figura 2-3: Vista de el anillo F_1 : en rojo se muestran las subunidades α , en verde β y la subunidad γ en amarillo.

El sector F_1 se compone de las subunidades α , β y γ , además de las subunidades inhibitorias que son especie específicas, tales como IF_1 , o ϵ . Es dentro de este sector que se lleva a cabo la síntesis de ATP. El sector está compuesto por un anillo hexamérico de 3 subunidades α y 3 β alternadas de 55 y 50 kDa respectivamente, y con la subunidad γ (32 kDa) insertada dentro del anillo 2-3. Las subunidades α y β tienen una estructura similar entre sí, la cual se encuentra dividida en 3 dominios [6] un barril de hojas beta en la región amino-terminal más alejado de la membrana, un dominio central de unión a nucleótido y un dominio carboxilo terminal formado por varias hélices α adyacente a la membrana. Los sitios catalíticos se encuentran localizados en las interfases α/β vecinas. Aunque los residuos involucrados en la catálisis pertenecen predominantemente a la subunidad β , la subunidad α contribuye un residuo al sitio catalítico R376, denominado dedo de arginina. El cual es fundamental para la estabilización de la carga negativa del fosfato γ , mediante la generación de un estado de transición pentacoordinado [6].



Figura 2-4: La subunidad $F_1\beta$ El dominio N-terminal se muestra en rojo, el dominio de unión a nucleótido en verde y el C-terminal en magenta. Se puede observar la orientación del nucleótido y del $Mg(II)$.

2.4. La subunidad β

La subunidad catalítica del anillo F_1 es la subunidad β (ver 2-4). La estructura de F_1 fue cristalizada por Abrahams [6] en 1994. Estudios cristalográficos y de dinámica molecular apuntan al cambio conformacional sufrido por la subunidad β debido a la unión a nucleótido tanto en el anillo F_1 como aislada. Estos cambios conformacionales se presentan como dos movimientos principales, la “mordida” por el carboxilo terminal caracterizada por la coordenada ϕ_b y el “cabeceo” del barril β caracterizado por el ángulo ϕ_t [17]. El movimiento de los diferentes dominios se encuentra concertado, especialmente en los residuos de los motivos de Walker y el dominio DELSEED [18]. En el sitio de alta afinidad los ligandos críticos son un oxígeno del hidroxil de $\beta Thr156$ (en la secuencia A de Walker), una molécula de agua unida por puente de hidrógeno por $\beta Asp242$ en el motivo B de Walker y dos moléculas de agua unidas por puente de hidrógeno a $\beta Glu185$. Las estructuras cristalinas con ATP muestran que dos oxígenos de los fosfatos β y γ del ATP, respectivamente, completan el octaedro de coordinación alrededor del ion Mg ver figura 2-5.

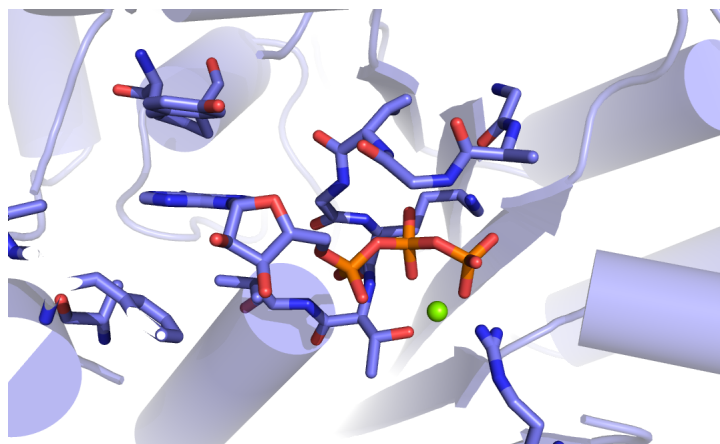


Figura 2-5: Coordinación del ion magnesio por los fosfatos β y γ del ATP.

Estudios mutacionales acoplados a ensayos de actividad han documentado el papel cuantitativo de los residuos del sitio catalítico en la unión de MgADP y MgATP y sus papeles en acelerar la catálisis [19–21]. Se ha encontrado que β Tyr331 está íntimamente relacionado a la unión del anillo purínico del nucleótido [22], en las estructuras cristalinas obtenidas se encuentra apoyado contra el anillo de adenina. Los residuos aromáticos (β Phe418, β Phe424) fueron observados en el sitio de unión de adenina [23]. Los residuos positivamente cargados requeridos para la unión y catálisis de MgATP son β Lys155 (en el motivo Walker A) y β Arg182 [24, 25]. Ambos residuos están involucrados en la unión del fosfato γ y en las estructuras obtenidas por rayos X se encuentran cercanos a los fosfatos del nucleótido. El residuo β Glu181 el cual une una molécula de agua, es crítico para la catálisis [26, 27]. Estudios posteriores indican que no se encuentra involucrado en la unión a nucleótido o en la coordinación de Mg [11, 13, 28]. Otros dos residuos críticos, β Arg246 y β Met209 [29], parecen ser responsables de orientar estereoquímicamente a β Glu181 tal que el agua atacante se alinea correctamente con el fosfato γ . Frasch [30] sugiere que β Tyr297 es importante para la unión de fosfato y MgADP durante la síntesis de ATP.

2.5. La subunidad α

La subunidad α es homóloga a la subunidad β [3]. Tiene una estructura similar a la de β (figura 2-6). Es importante notar que α carece de un residuo análogo a β -Glu185, por lo que es incapaz de catalizar la hidrólisis o síntesis de ATP por sí misma.

En contraste con β el papel de la subunidad α dentro de F_1 ha sido menos estudiado y clarificado [28]. Uno de sus funciones es contribuir al ensamblaje y estabilización estructural del anillo. Estudios mutacionales, eventualmente confirmados por estructuras cristalinas, han establecido que los sitios catalíticos son complementados por residuos de la subunidad α , con el papel preponderante de Arg376, también llamado el dedo de Arginina, como un residuo esencial para la formación del estado de transición catalítico [11]. Mas aún, existe clara evidencia de un mecanismo de comunicación entre las subunidades β propagado por las subunidades no catalíticas. Mutaciones al azar en EF_1 ayudaron a identificar una región de transmisión de señales en la subunidad α que aparentemente amplifican el cambio conformacional en el dedo de arginina inducido por el estado de transición, permitiendo la comunicación de largo alcance con otra subunidad β [13]. Otros estudios mutacionales indican que la cooperatividad negativa ocurre a través de interacciones entre subunidades α y β vecinas [29]. Estudios de unión a ligando muestran que el ATP unido a sitios no catalíticos de F_1 de cloroplasto y mitocondria, promueven la liberación de MgADP del sitio catalítico afectado [31, 32]. En línea con estas observaciones, estudios de mutagénesis dirigida al sitio de unión a nucleótido muestran que la supresión de la capacidad de unión a nucleótido en la subunidad α lleva a la inhibición por producto en los sitios catalíticos de TF_1 y F_1 de *Bacillus subtilis* [33, 34]. En contraste, EF_1 muestra actividad catalítica normal al suprimir los sitios no catalíticos [13]. En una serie de experimentos, en los cuales la subunidad γ fue progresivamente recortada y eventualmente eliminada por completo, el anillo $\alpha_3\beta_3$ retuvo la capacidad de catálisis rotatoria [5, 35, 36]. Mediante simulaciones de dinámica molecular, se ha sugerido que la comunicación en el anillo F_1 puede proceder a través de un mecanismo de empaque alternante, en el cual las subunidades α y β acoplan y desacoplan sus interacciones de manera secuencial, principalmente por cambios en sus dominios carboxilo terminal y los sitios de unión a nucleótido [37, 38]. También se ha sugerido que la subunidad α es determinante para que β adquiriera la conformación semicerrada [39].

En un estudio previo en nuestro grupo de trabajo, realizamos una caracterización calorimétrica de la asociación de la subunidad α de la bacteria termófila *Bacillus PS3* con MgADP y con ATP en presencia y ausencia del ion Mg. Haciendo uso de modelos de área superficial, fue posible mostrar que la energética de unión es consistente con las diferencias conformacionales entre su conformación abierta y unida a MgADP observadas en la estructura de F_1 . Así, el estudio se cons-



Figura 2-6: La subunidad $F_1\alpha$ El dominio N-terminal se muestra en rojo, el dominio de unión a nucleótido en verde y el C-terminal en magenta. Se puede observar la orientación del nucleótido y del $Mg(II)$.

tituyó en una evidencia energético-estructural de que la subunidad α en su forma aislada sufre el mismo tipo de cambio conformacional intrínseco que el observado en la estructura cristalográfica de F_1 . Adicionalmente, el propósito fue determinar el papel energético que juega el ion Mg^{2+} en el reconocimiento del ATP por parte de α , lo cual significa caracterizar la reacción



Se encontró que las firmas termodinámicas de las dos subunidades resultaron ser sensiblemente diferentes. Por un lado, la subunidad α mostró una dependencia más fuerte hacia la presencia de Mg para poder reconocer ATP.

Estos resultados sugieren que las subunidades α y β sufren ajustes conformacionales distintos en solución al unir nucleótidos. Interesantemente, independientemente de las condiciones de cristalización, presencia o ausencia de nucleótidos, o del organismo origen, en todas las estructuras tridimensionales de F_1 resueltas hasta la fecha, la subunidad α aparece con la misma conformación abierta, a diferencia de la subunidad β , que ha sido capturada cristalográficamente en diversas conformaciones. Desafortunadamente, hasta el momento no ha sido posible resolver experimentalmente las estructuras tridimensionales de las subunidades α aisladas. En extrac-

tos de mitocondria de corazón de bovino, *E. coli* y termófilo se han obtenido en la conformación semiabierta, unidas a nucleótidos [6, 7].

2.6. Interacción del Magnesio con nucleótidos di y tri fosfato

El ion magnesio destaca entre los iones metálicos divalentes utilizados por los seres vivos. Su concentración en el medio intracelular es de 0.5 mM aproximadamente, independientemente del tipo de célula. En solución acuosa se encuentra de forma hexahidratada ($\text{Mg}[\text{H}_2\text{O}]_6$) con una geometría octaédrica. Sus ángulos de unión son cercanos a los 90° en su primera capa de solvatación. Es capaz de formar una segunda capa mediante interacciones de su primera capa, por lo que tiene un radio de hidratación mayor que el de otros cationes divalentes, a pesar que su radio iónico es menor. Típicamente el magnesio actúa como un ácido de Lewis, activando nucleófilos unidos a su sustrato, promoviendo la ionización a formas aniónicas. El magnesio puede participar mediando la interacción enzima-sustrato, o uniéndose a la enzima para provocar cambios estructurales que la lleven a adoptar una conformación activa. La interacción con el magnesio puede ser mediante coordinación directa a las cadenas laterales o vía interacciones mediadas por agua en su esfera de solvatación. Los nucleótidos de fosfato son indispensables en diferentes roles dentro de un gran número de reacciones. El magnesio interactúa de manera no enzimática con estas moléculas, siendo 10 veces más afín a ATP respecto a ADP. Esta diferencia se ha explicado con el argumento de la mayor estabilización al formar quelatos con polifosfatos, mientras que otras explicaciones se enfocan en la neutralización de las cargas electrostáticas entre el magnesio y los fosfatos.[40]

Dentro de la ATP sintasa el papel del magnesio es vital ya que su ligando fisiológico es el complejo MgATP y se observa un marcado aumento de afinidad respecto al nucleótido aislado. Además se ha observado que la ausencia de Mg(II) inhibe la cooperatividad de unión entre los sitios catalíticos de la enzima. [11]. Comprender el efecto del Mg(II) en la ATP-sintasa es un paso fundamental para conocer su funcionamiento preciso. Promueve la unión de sustrato de forma cooperativa entre sitios [11], En la subunidad β de *E. coli* se ha identificado a los residuos βThr156 , βGlu185 y βAsp242 como los responsables del reconocimiento de Mg(II). El residuo βThr156 es el último que se encuentra dentro de la región del Loop P y su importancia se puede

explicar bajo el argumento de ser capaz de suplir parcialmente la primera capa de solvatación del magnesio, ya que el oxígeno anhidrido se encuentra a 2.3 Å de distancia del ion. Los residuos β Asp242 y β Glu185 tienen los oxígenos de sus respectivos carbonilos a 4 y 4.1 Å respectivamente, y utilizan moléculas de agua como intermediarios de su interacción. El β Asp242 se encuentra conservado en diversas proteínas que reconocen MgATP tales como ATP/ADP translocasa, adenilato cinasa y fosfofructocinasa (Walker1982). Otros residuos que han sido estudiados mediante mutaciones selectivas y tienen efecto sobre el reconocimiento de Mg(II) son: β Glu181, el cual tiene un efecto estabilizador del estado de transición en la hidrólisis, β K155 y β E192, con efectos en la unión de ATP o el complejo ADP fosfato, el primero se encuentra presente dentro del Loop P mientras que el segundo interactúa con el magnesio vía una molécula de agua. El efecto de las mutaciones parece disminuir en la unión a ADP respecto a ATP, apoyando la idea de diferentes conformaciones del sitio catalítico [41].

La dependencia de magnesio de la constante de unión en EF_1 ha sido estudiada mediante fluorometría donde se monitorea la disminución de intensidad de la señal de triptofano introducido mediante mutagénesis dirigida en la posición 331 de $E\beta$. Las constantes observadas para MgATP son de 0.028, 2.1 y 3.9 μ M para los sitios 1, 2 y 3, respectivamente, a diferencia de la constante de 71 μ M observada en los tres sitios para ATP en ausencia de metal.

En la unión de ADPMg se observaron K_d de 0.14 μ M para el sitio 1 y 20 μ M para los sitios 2 y 3, a diferencia de la K_d de 83 μ M para los tres sitios en la unión de ADP libre [42].

Capítulo 3

Hipótesis

Para mantener la integridad funcional del anillo F_1 , las subunidades α deben ser capaces de acompañar los movimientos de las subunidades β vecinas. Por lo tanto, la capacidad de cambio conformacional de las subunidades no catalíticas debe ser similar al de las subunidades catalíticas, aunque con un mínimo en su perfil de energía en una posición intermedia entre las conformaciones abierta y cerrada. En virtud de la muy alta conservación de los residuos que unen al nucleótido entre diferentes especies, la interacción con el nucleótido y el magnesio debe ser relevante en la función de las subunidades no catalíticas y significativamente diferente a la de las subunidades catalíticas.

Capítulo 4

Objetivos

4.1. Objetivo general

Caracterizar la plasticidad conformacional de la subunidad α de F1 ATP-sintasa mediante métodos computacionales.

4.2. Objetivos particulares

- Mediante dinámica molecular sin restricciones de 300 ns de duración, explorar el rango de movimiento de la subunidad α aislada.
- Caracterizar de manera cuantitativa la plasticidad conformacional de la subunidad α .
- Determinar la influencia del nucleótido sobre la flexibilidad conformacional de la subunidad α .
- Estudiar el efecto del magnesio en la unión a nucleótido por la subunidad α .
- Realizar un análisis comparativo del comportamiento conformacional de las subunidades α y β .

Capítulo 5

Metodología

5.1. Métodos computacionales

Todas las estructuras fueron obtenidas de la estructura de F₁ de *Bos taurus* con resolución de 2.1 Å (código PDB: 2JDI) [43]. Las cadenas fueron completadas con el módulo de python Modeller y la suite MOE (Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2015). La estructura fue protonada a 37 °C y 0.1 unidades de fuerza iónica utilizando el paquete Protonation3D contenido en MOE. Todas las simulaciones fueron llevadas a cabo con la suite de dinámica molecular AMBER 12 utilizando el potencial FF99SB [44]. Los parámetros para los iones magnesio [45] y ATP [46] fueron tomados de la base de datos de AMBER. Se utilizó el módulo de AMBER Leap para solvatar la proteína utilizando una caja octaédrica con una distancia de 18 Åa partir del borde de la proteína. Esta caja fue llenada con moléculas explícitas de agua modeladas utilizando el potencial TIP3P. La caja, con un volumen total de $1,4 \times 10^4 \text{ \AA}^3$, contiene 40,338 moléculas de agua. Se colocaron contraiones en posiciones aleatorias dentro de la caja, para neutralizar la carga del sistema.

Todas las simulaciones se llevaron a cabo bajo condiciones periódicas y las interacciones electrostáticas de largo alcance fueron calculadas utilizando el método de suma en malla de partículas de Ewald, tal como está implementado en el módulo PMEEMD en la suite AMBER, utilizando una distancia de corte de 9 Å para separar la electrostática directa y el método de malla de partículas de Ewald. Para controlar las vibraciones de los átomos de hidrógeno y permitir el uso de un

paso temporal de 2 fs, se utilizó el algoritmo SHAKE. Las estructuras fueron preparadas mediante una minimización por gradiente conjugado seguida de una termalización NVT y equilibrado NPT utilizando dinámica de Langevin, para equilibrar las moléculas de disolvente y relajar la estructura. Observando el curso temporal de las diferentes métricas tal como el radio de giro, la energía total y el RMSD de las posiciones atómicas, una termalización durante 10 ns de tiempo de simulación a la temperatura de producción resultó ser suficiente para equilibrar el sistema. Posteriormente, el sistema fue sometido a simulaciones de dinámica molecular no dirigidas durante 100 ns. Los archivos de entrada de PMEMD fueron generados con ayuda del programa pyMDmix [47].

El primer conjunto de simulaciones involucraron a la subunidad α aislada unida a MgATP; esta estructura la denominamos α_{holo} . Las posiciones atómicas iniciales fueron tomadas de la estructura de α_{TP} extraídas del PDB 2JDI. Se llevó a cabo otro conjunto de simulaciones partiendo de la misma estructura donde se eliminaron manualmente los átomos de MgATP; esta estructura será referida como α_{apo} . Para estudiar la influencia del magnesio en la unión a nucleótido, se llevaron a cabo simulaciones de la subunidad α unida a ATP en ausencia de magnesio. A fin de poder tener una referencia de comparación también realizamos simulaciones no constreñidas de las subunidades β_E , $\beta_{TP} - MgATP$ y $\beta_{TP} - ATP$ utilizando los parámetros anteriormente mencionados. Las medidas de distancia se llevaron a cabo con el programa PyMOL versión 1.8 (Schrodinger LLC), y el software VMD [48]. Se llevó a cabo un análisis de

grupos (*clustering*) restringido al dominio carboxilo terminal de la subunidad α utilizando el algoritmo de unión de promedios y una distancia de corte para el C-terminal de 1 Å para el agrupamiento [49]. Las estructuras promedio fueron generadas a partir de las trayectorias y analizadas con una variedad de métodos, incluyendo análisis mas profundos de la región de unión a nucleótido utilizando scripts generados con el módulo MDAnalysis [50]. Este módulo incluye el cálculo de la fluctuación de la desviación cuadrática media, para la cual se usó la estructura promedio de la trayectoria como referencia. Para cuantificar el cambio conformacional del dominio carboxilo terminal, se determinó el curso temporal de la distancia entre el motivo HTH (Hélice (R³⁵⁹-F³⁸¹)-Giro (A³⁸²-D³⁸⁹)-Hélice (A³⁹⁰-L⁴⁰⁶)) en la trayectoria de la subunidad α contra la región correspondiente en la subunidades β_E y β_{TP} (Hélice (S³⁶⁵-D³⁸⁶)-Giro (I³⁸⁷-S³⁹⁷)-Hélice (E³⁹⁸-L⁴¹⁴)). Para estas mediciones, se determinaron las distancias entre las posiciones promedio

de los residuos que flanquean al motivo de giro $\alpha A^{401}, \alpha A^{402}, \alpha Q^{415}$ y αQ^{416} en las subunidades α y $\beta K^{382}, \beta S^{383}, \beta K^{415}$ y βL^{416} en las subunidades β .

5.2. Métodos experimentales

Las mediciones experimentales descritas en esta sección fueron llevados a cabo por Guillermo Salcedo, estudiante del doctor Enrique García Hernández, durante su proyecto doctoral [51]. Son presentados aquí porque ayudan a esclarecer y justificar los resultados y la metodología seguida, ya que ambos proyectos estudian la capacidad de unión a nucleótidos de adenosina de la subunidad $F_1\alpha$.

Se sobreexpresó la subunidad α de *Geobacillus kaustophilus* en células de *E. coli* BL21 de Novagen. Esta subunidad, la cual comparte 98% de identidad con la subunidad α de *Bacillus PS3*, ha demostrado ser manejable durante caracterizaciones calorimétricas [51], ya que no es proclive a la agregación dentro de las celdas durante el tiempo que toman las determinaciones. La subunidad α recombinante fue purificada a homogeneidad tal como se describe en [52]. Las mediciones calorimétricas para la titulación de la subunidad α con ATP o MgATP fueron llevadas a cabo en un equipo MicroCalTM iTC₂₀₀ (GE Healthcare, Northampton, MA, USA). Todos los experimentos fueron llevados a cabo en solución con 0.05 M de buffer Tris-HCl a pH 8.0, adicionado con 0.1 M de NaCl y 10% de glicerol, en un intervalo de temperatura de 20 a 35 ° C. La concentración de la subunidad α fue típicamente de 20-50 μ M, mientras que la concentración de ligante en la jeringa fue de 0.5-1.0 mM para MgATP y 2-4 mM para ATP. En la titulación de la subunidad α con ATP, las soluciones de ligante y proteína fueron suplementadas con EDTA 2mM para quelar cualquier traza de magnesio en la solución. La titulación consistió en 20 a 30 inyecciones consecutivas de ligante a intervalos de 5 minutos entre inyecciones, utilizando una velocidad de agitación de 700 rpm. El calor de dilución del ligante fue obtenido añadiendo ligante a una solución de buffer en condiciones experimentales idénticas. En el caso de la titulación de la subunidad α con ATP, la constante de unión (K_b), el cambio en la entalpía de unión (ΔH_b) y la estequiometría (n) fueron determinadas mediante un ajuste no-lineal de los datos de la titulación utilizando un modelo de sitios de unión independientes e idénticos [53]:

$$Q = \frac{mM_1\Delta H_b V_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_b M_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_b M_t}\right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right] \quad (5-1)$$

Donde Q es el calor diferencial normalizado que se genera por mol de ligante, después de sustraer el calor de dilución, V_0 es el volumen de trabajo de la celda, y X_t y M_t son las concentraciones de ligante y macromolécula, respectivamente. Para la titulación de la subunidad α con MgATP, las soluciones de ligante y proteína contenían MgCl₂ 5mM. Las isotermas de unión resultantes fueron analizadas utilizando un modelo ternario en el cual la subunidad α puede unir ATP o MgATP, mientras que el ATP también puede encontrarse como Mg₂ATP:

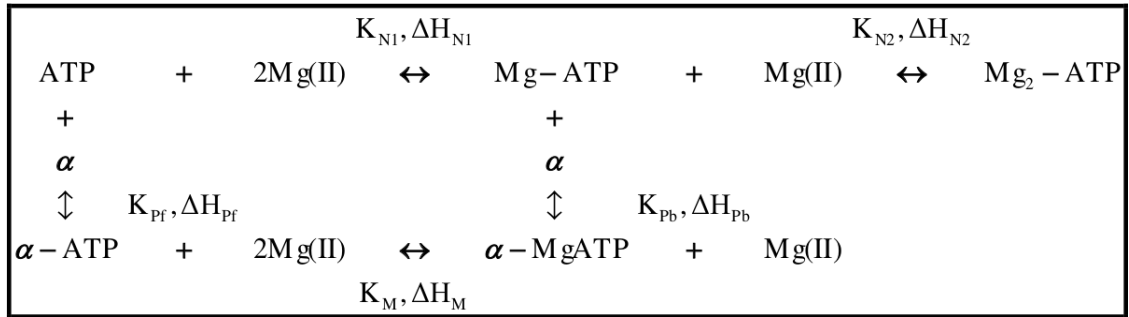


Figura 5-1: Equilibrio de unión ternario entre la subunidad F₁ α aislada (α), Mg(II) y ATP. La habilidad del ATP para formar complejos bidentados con Mg(II) ha sido tomada en cuenta.

Los subíndices N1 y N2 indican la asociación secuencial de dos átomos de magnesio al nucleótido, Pf y Pb indican la asociación de nucleótido libre y unido a metal, respectivamente, y M indica la asociación de Mg(II) a la subunidad unida a nucleótido. En este equilibrio acoplado de interacciones débiles, el ATP y MgATP compiten entre sí por el sitio de unión de α . La derivación del modelo de equilibrios acoplados ha sido presentada en detalle en [54]. En breve, cuando se aplica a la interacción con MgATP, el modelo tiene la forma:

$$\begin{aligned}
q_i = V_0 & \left(\left([\alpha \cdot ATP]_i - [\alpha \cdot ATP]_{i-1} \left(1 - \frac{v}{V_0} \right) \right) \Delta H_{Pf} \right. \\
& + \left([\alpha \cdot MgATP]_i - [\alpha \cdot MgATP]_{i-1} \left(1 - \frac{v}{V_0} \right) \right) (\Delta H_{Pb} + \Delta H_{N1}) \\
& + \left([MgATP]_i - [MgATP]_{i-1} \left(1 - \frac{v}{V_0} \right) - F_{MgATP} [ATP]_0 \frac{v}{V_0} \right) \Delta H_{N1} \\
& \left. + \left([Mg_2ATP]_i - [Mg_2ATP]_{i-1} \left(1 - \frac{v}{V_0} \right) - F_{Mg_2ATP} [ATP]_0 \frac{v}{V_0} \right) (\Delta H_{N1} + \Delta H_{N2}) \right) + q_{dil}
\end{aligned} \tag{5-2}$$

donde q_i es el calor generado por la i -ésima inyección, y q_{dil} es un término de ajuste introducido para tomar en cuenta el calor de dilución no corregido experimentalmente. F_{MgATP} y F_{Mg_2ATP} corresponden respectivamente, a la fracción de MgATP y Mg₂ATP en la jeringa introducidos en la celda por la inyección i . Finalmente, $[ATP]_0$ es la concentración de ATP en la jeringa y v es el volumen de inyección.

La concentración total de cada una de las especies se relaciona con las concentraciones de las especies moleculares libres a través de las constantes de equilibrio:

$$\begin{aligned}
[ATP]_T = [ATP] + K_{N1}[ATP][Mg(II)] + K_{N1}K_{N2}[ATP][Mg(II)]^2 + K_{Pf}[P][ATP] \\
+ K_{Pb}K_{N1}[P][ATP][Mg(II)]
\end{aligned} \tag{5-3}$$

$$\begin{aligned}
[Mg]_T = [Mg(II)] + K_{N1}[ATP][Mg(II)] + 2K_{N1}K_{N2}[ATP][Mg(II)]^2 \\
+ K_{Pb}K_{N1}[P][ATP][Mg(II)]
\end{aligned} \tag{5-4}$$

$$[P]_T = [P] + K_{Pf}[P][ATP] + K_{Pb}K_{N1}[P][ATP][Mg(II)] \tag{5-5}$$

Finalmente, se incluye un parámetro n como factor de normalización para corregir errores en la concentración de proteína relacionados con la determinación experimental y/o la presencia de proteína inactiva:

$$[P]_T = n[P]_0 \tag{5-6}$$

donde $[P]_0$ es la concentración experimental. En el ajuste de este modelo, los parámetros de formación de complejos de ATP con la subunidad α (determinados en experimentos independientes), y para MgATP y Mg₂ATP (tomados de [54]) y se mantuvieron fijos, mientras que los de la

interacción de la subunidad α con MgATP fueron los parámetros a ajustar. Se llevaron a cabo regresiones no lineales con el software Origin 7.0 y Affinimeter.

5.3. Dinámica molecular

Las fuerzas interatómicas son las responsables de la mayoría de los fenómenos físicos y químicos. Uno de los problemas fundamentales de la ciencia consiste en la determinación adecuada de estas fuerzas ya que pueden ser utilizadas para describir muchos otros fenómenos. En las siguientes secciones, vamos a suponer que las fuerzas intermoleculares pueden ser derivadas de la función del potencial interatómico V que depende de las posiciones atómicas, así para un sistema de N_A átomos cuyos vectores de posición son \vec{r}_i , con $i = 1, 2, \dots, N_A$ la fuerza \vec{F}_i sobre el i -ésimo átomo está determinada por:

$$\vec{F}_i = - \frac{\partial V(\vec{r}_1 \vec{r}_2 \dots \vec{r}_{N_A})}{\partial \vec{r}_i} \quad (5-7)$$

En el caso de interacciones entre dos cuerpos, es posible obtener algunas conclusiones generales de la forma de V . Esperamos que $V \rightarrow 0$ cuando la distancia interatómica $r \rightarrow \infty$. Si las partículas son dos iones cargados, la velocidad de decaimiento del potencial puede ser estimada porque podemos esperar que cuando la separación es grande $V \sim \frac{1}{r}$. Si las partículas actúan como dipolos entonces $V \sim \frac{1}{r^3}$. Cuando los átomos se encuentran cercanos entre sí esperamos que exista un potencial repulsivo tal que $V \sim \infty$ cuando $r \sim 0$. Si existe un enlace entre los átomos, entonces V tiene un valor mínimo en alguna distancia intermedia entre 0 e ∞ . Generalmente, esta distancia se encuentra entre 1 y 2 Å. Entonces, es posible trazar una curva para V como función de r que contenga estos atributos.

Las funciones de los potenciales interatómicos idealmente deben ser capaces de describir no sólo interacciones entre dos cuerpos, sino de las moléculas o sólidos de interés. Para los materiales covalentes la base del enlace es electrostática y se considera esféricamente simétrica, aunque, debido a las contribuciones diferentes de los orbitales atómicos se encuentra también una fuerte componente direccional. Además en los cristales moleculares y en proteínas, las interacciones de Van der Waals juegan un papel preponderante en su comportamiento fisicoquímico y en sus interacciones tanto internas como con ligantes y el medio.

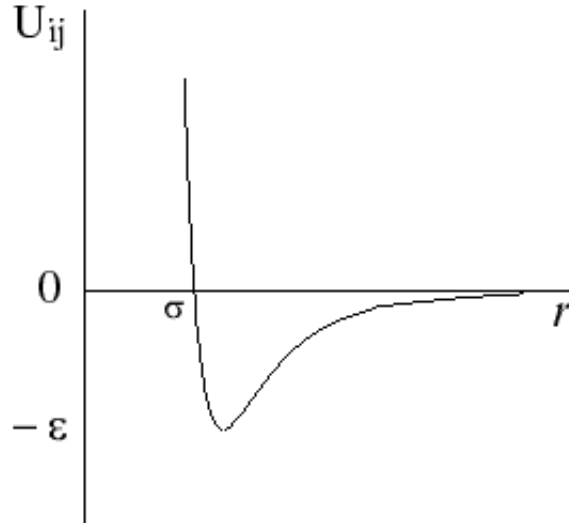


Figura 5-2: Ejemplo de un pozo de energía potencial para una molécula diatómica. La profundidad del pozo es $-\varepsilon$ y el ancho del pozo es σ .

Para el caso de sistemas de dos partículas y separaciones entre 1 y 4 Å, el potencial interatómico de Van der Waals es atractivo. La energía del dímero y la profundidad del pozo pueden fácilmente ajustarse a una forma funcional como la mostrada en la figura 5-2. Existen dos formas ampliamente utilizadas que son las funciones tipo Lennard-Jones y de Morse.

El potencial de Lennard-Jones fue desarrollado para representar gases nobles y se basa en la premisa de que los átomos de los gases nobles solo están ligeramente distorsionados de una configuración de capa cerrada. Estas interacciones pueden representarse como interacciones entre dipolos y ser descritas por un potencial atractivo de la forma $\frac{1}{r^6}$, donde r es la distancia interatómica. En distancias cortas la repulsión debe ser mayor que la atracción y entonces la forma del potencial Lennard-Jones está dada por:

$$V = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (5-8)$$

No existe una razón física para el exponente 12, mas que es mayor que 6 para lograr la repulsión a separaciones menores. De manera mas pragmática, el exponente facilita el cálculo del término repulsivo, ya que basta elevar al cuadrado el término atractivo. De esta forma la separación de equilibrio es $2^{1/6}\sigma$ y ε es la profundidad del pozo.

Los potenciales tipo Morse contienen también una parte atractiva y una parte repulsiva, pero

son modelados con funciones exponenciales decrecientes, evitando singularidades en la evaluación de las fuerzas y las energías. La forma más sencilla de expresar estos potenciales es:

$$V = Ae^{-a(r-r_{eq})} - Be^{-b(r-r_{eq})} \quad (5-9)$$

donde los parámetros a ajustar son A, a, b, B, r_{eq} . La energía total del sistema en la distancia de equilibrio es $A + B$.

5.3.1. Ecuaciones e integradores

La dinámica molecular puede ser descrita como el cálculo del movimiento de un sistema de partículas dado el conocimiento de las fuerzas de interacción entre ellas. Si denotamos la posición, velocidad y aceleración de la i -ésima partícula en un sistema de N partículas como \vec{r}_i, \vec{v}_i y \vec{a}_i , la dinámica del sistema puede ser determinada resolviendo las ecuaciones de Newton para cada partícula:

$$\frac{d\vec{r}_i}{dt} = \vec{v}_i \quad (5-10)$$

$$\frac{d\vec{v}_i}{dt} = \vec{a}_i = \frac{\vec{F}_i}{m_i} \quad (5-11)$$

Se asume que la forma de la fuerza puede ser derivada de la función del potencial interatómico $\vec{F}_i = -\nabla_i V$. Para un sistema no disipativo hay ciertas propiedades que pueden utilizarse en la construcción de algoritmos de integración. Existen ciertos algoritmos que se puede demostrar que conservan mejor la energía para un número grande de pasos de integración. En la práctica existen en realidad dos requerimientos para el uso de un método que son la velocidad de cálculo y la precisión. Entonces se debe buscar un método que minimice el número de evaluaciones de la fuerza y, si el método es de un orden suficientemente alto, maximice también el tamaño del paso de integración.

Uno de los métodos más utilizados y de los más robustos es el algoritmo de Verlet en sus dos versiones, el método de Verlet sobre las posiciones y el método de Verlet sobre las velocidades. El algoritmo de Verlet puede ser derivado utilizando una expansión en series de Taylor de $\vec{r}(t+h)$ alrededor de $\vec{r}(t)$, el error asociado al truncamiento de la serie se denota como $O(h^{(n)})$ donde n es

el orden asociado al error.

$$\vec{r}(t+h) = \vec{r} + h \frac{d\vec{r}(t)}{dt} + \frac{h^2}{2} \frac{d^2\vec{r}(t)}{dt^2} + \frac{h^3}{3} \frac{d^3\vec{r}(t)}{dt^3} + O(h^4)$$

Expandiendo ahora $\vec{r}(t-h)$ genera una expresión similar, excepto que los términos impares tienen un signo menos

$$\vec{r}(t-h) = \vec{r} - h \frac{d\vec{r}(t)}{dt} + \frac{h^2}{2} \frac{d^2\vec{r}(t)}{dt^2} - \frac{h^3}{3} \frac{d^3\vec{r}(t)}{dt^3} + O(h^4)$$

Sumamos ambas expresiones para obtener una expresión análoga al cálculo de la derivada mediante diferencia central.

$$\vec{r}(t+h) + \vec{r}(t-h) = 2\vec{r}(t) + h^2 \frac{d^2\vec{r}(t)}{dt^2} + O(h^4)$$

La primera ley de Newton puede ser utilizada para eliminar la segunda derivada.

$$\vec{r}(t+h) + \vec{r}(t-h) = 2\vec{r}(t) + h^2 \frac{\vec{F}}{m} + O(h^4) \quad (5-12)$$

El método de Verlet no genera explícitamente las velocidades de las partículas y esta es necesaria en una forma explícita para el cálculo de la energía cinética y para el uso de termostatos. Esto es un problema para el cálculo inicial de la energía donde se debe utilizar otro método para la evaluación de las velocidades. El algoritmo de velocidades de Verlet incluye las velocidades de las partículas de manera explícita en cada paso y se inicializa a sí mismo desde la posición y velocidad inicial. Matemáticamente es idéntico al algoritmo de Verlet original, en el sentido de que genera la misma trayectoria, si no tomamos en cuenta los errores de redondeo de la computadora.

La derivación es de la manera siguiente. Toda ecuación diferencial de n-ésimo grado puede ser reducida a un conjunto de n ecuaciones diferenciales de primer grado. En particular la ecuación de movimiento clásica $\frac{d^2\vec{r}}{dt^2} = \vec{F}/m$ es de segundo grado y puede ser reducida a dos ecuaciones de primer grado. Sea $\vec{v}(t) = \frac{d\vec{r}(t)}{dt}$ y las dos ecuaciones son:

$$\frac{d\vec{r}(t)}{dt} = \vec{v}(t)$$

$$\frac{d\vec{v}(t)}{dt} = \frac{\vec{F}(\vec{r}(t))}{m}$$

La derivación del algoritmo por diferencias finitas puede hacerse utilizando expansiones en series de Taylor. Comenzando con $\vec{r}(t+h)$

$$\vec{r}(t+h) = \vec{r}(t) + h \frac{d\vec{r}(t)}{dt} + h^2 \frac{d^2\vec{r}(t)}{dt^2} + O(h^3)$$

substituyendo $\vec{v}(t)$ y $\frac{\vec{F}}{m}$

$$\vec{r}(t+h) = \vec{r}(t) + h\vec{v}(t) + h^2 \frac{\vec{F}(\vec{r}(t))}{m} + O(h^3)$$

Expandiendo la segunda función $\vec{v}(t+h)$ alrededor de $\vec{v}(t)$

$$\vec{v}(t+h) = \vec{v}(t) + h \frac{d\vec{v}}{dt} + \frac{h^2}{2} \frac{d^2\vec{v}}{dt^2} + O(h^3)$$

Ahora necesitamos una expresión para $\frac{d^2\vec{v}}{dt^2}$ en términos de cantidades conocidas. Esto se hace expandiendo $\frac{d\vec{v}(t+h)}{dt}$ alrededor de $\frac{d\vec{v}(t)}{dt}$

$$\frac{d\vec{v}(t+h)}{dt} = \frac{d\vec{v}(t)}{dt} + h \frac{d^2\vec{v}}{dt^2} + O(h^2)$$

Para poder emplear esta expresión en la ecuación anterior multiplicamos por $\frac{h}{2}$ y reacomodamos los términos

$$\frac{h^2}{2} \frac{d^2\vec{v}}{dt^2} = \frac{h}{2} \left(\frac{d\vec{v}(t+h)}{dt} - \frac{d\vec{v}(t)}{dt} \right) + O(h^3)$$

Entonces, la expresión para $\vec{v}(t+h)$ se convierte en:

$$\vec{v}(t+h) = \vec{v}(t) + h \frac{d\vec{v}}{dt} + \frac{h}{2} \left(\frac{d\vec{v}(t+h)}{dt} - \frac{d\vec{v}(t)}{dt} \right) + O(h^3)$$

y substituyendo la primera ley de Newton podemos reescribir esta expresión como:

$$\vec{v}(t+h) = \vec{v}(t) + h \frac{d\vec{v}}{dt} + \frac{h}{2m} \left(\vec{F}(\vec{r}(t+h)) - \vec{F}(\vec{r}(t)) \right) + O(h^3) \quad (5-13)$$

5.3.2. Interacciones intermoleculares y campos de fuerza

Dada la forma y los potenciales modelo que se mencionan anteriormente, en este capítulo vamos a tomar como ejemplo el potencial UFF (*Universal Force Field*) [55] para indicar los diferentes términos y contribuciones que se utilizan en un potencial utilizado en investigación y no como un modelo didáctico.

Lo primero que debemos tomar en cuenta es la necesidad de utilizar diferentes parámetros para representar diferentes tipos de enlace para un mismo elemento. Es decir, no es lo mismo el oxígeno en un óxido metálico que en el carboxilo de un ácido graso.

La forma del campo de fuerza UFF es:

$$E = E_r + E_\theta + E_\phi + E_\omega + E_{vdw} + E_{el} \quad (5-14)$$

E_r es la elongación de los enlaces covalentes. Esta interacción es modelada mediante el oscilador armónico o el potencial de Morse.

$$E_r = \frac{1}{2} k_{ij} (r - r_{ij})^2 \quad (5-15)$$

$$E_r = D_{ij} \left[e^{-\alpha(r-r_{ij})} - 1 \right]^2 \quad (5-16)$$

donde k_{ij} es la constante de fuerza en unidades de (kcal/mol)/angstrom², r_{ij} es la distancia de enlace natural en angstroms, D_{ij} es la energía de disociación del enlace en kcal/mol y

$$\alpha = \sqrt{\frac{k_{ij}}{2D_{ij}}}$$

En general las distorsiones angulares pueden ser modeladas mediante expansiones en series de Fourier, debido a que pueden construirse de tal manera que sus derivadas no contengan singularidades y que posean las distorsiones adecuadas para los movimientos de gran amplitud, observados a veces en las simulaciones de dinámica molecular y, por último, los coeficientes de la expansión pueden optimizarse para satisfacer condiciones a la frontera apropiadas y físicamente justificables. La forma general de estas distorsiones es:

$$E_\gamma = K \sum_{n=0}^m C_n \cos(n\gamma) \quad (5-17)$$

donde K es un término que depende del ángulo de enlace nativo observado experimentalmente, m es el límite donde se trunca la expansión de Fourier, y γ es el ángulo de interés.

Para el caso del término de la energía de doblez (E_θ), θ es el ángulo entre los átomos I,J,K y los coeficientes C_n se eligen de tal manera que representen adecuadamente la energía de repulsión para que en el caso de $\theta = \theta_0$.

$$E_\theta = K_{ijk} \sum_{n=0}^m C_n \cos(n\theta)$$

La torsión (E_ϕ) entre los enlaces IJ y KL conectados mediante un enlace común JK y los ángulos dihedros (E_ω) se determinan mediante una expansiones en series de Fourier. Estas series tienen la forma:

$$E_\phi = k_{IJKL} \sum_{n=0}^m C_n \cos(n\phi)$$

donde los coeficientes dependen de la barrera rotacional, la periodicidad del potencial y el ángulo de equilibrio.

En el caso de la inversión para el átomo I unido exactamente a 3 átomos JKL

$$E_\omega = k_{IJKL} \sum_{n=0}^m C_n \cos(n\omega)$$

La expansión se hace tomando en cuenta, los ángulos formados por el los enlaces IJ, IK, IL con el plano JKL, de manera tal que las constantes tomen en cuenta las diferentes constantes vibracionales determinadas por espectroscopía del infrarrojo y k_{ijkl} tome en cuneta la energía vibracional necesaria para mantener el ángulo ω_0 . Posteriormente, los datos son ajustados a valores cristalográficos de los hidruros correspondientes y las constantes de fuerza son determinadas mediante espectroscopía de infrarrojo.

donde los coeficientes C_n se eligen de tal manera que haya un mínimo en el ángulo de equilibrio $\gamma = \gamma_0$

Las interacciones tipo Van der Waals son determinadas utilizando el potencial de Lennard-

Jones

$$E_{vdw} = D_{ij} \left\{ -2 \left[\frac{r_{ij}}{r} \right]^{12} + \left[\frac{r_{ij}}{r} \right]^6 \right\} \quad (5-18)$$

La energía electrostática es determinada mediante el uso de un potencial Coulómbico utilizando cargas efectivas.

$$E_{el} = 332,0637 \frac{Q_i Q_j}{\epsilon_0 R_{ij}} \quad (5-19)$$

5.3.3. Modelos de disolvente

Los modelos de disolvente explícito son útiles herramientas que nos permiten modelar las propiedades del agua líquida y su interacción con solutos. Este es un problema abierto, y aún hoy se realizan sofisticados cálculos para la determinación de la estructura de dímeros y otros polímeros y clatratos de agua. Existen consideraciones específicas para el cálculo explícito de propiedades del agua líquida como sus parámetros críticos, la anomalía de la densidad o su función de distribución radial.

Existen en la literatura alrededor de 400 modelos de agua distintos, indicando así la falta de éxito en dar una descripción atomística completa del problema. Uno de los modelos más utilizados en el ámbito de la dinámica molecular de proteínas es el modelo TIP3P

Descripción del sistema:

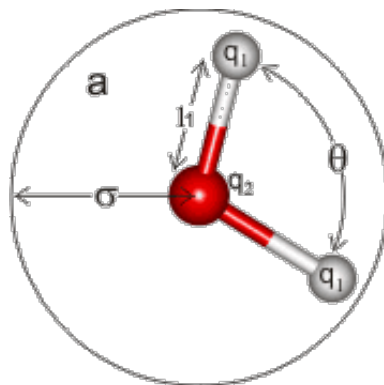


Figura 5-3: La descripción física utilizada para describir el modelo de disolvente TIP3P, donde σ es el radio de la molécula, θ es el ángulo de la molécula y la contribución electrostática está dada por las cargas q_1 y q_2 . La distancia entre los átomos de oxígeno e hidrógeno se denomina l_1 .

Los parámetros utilizados son:

Tabla 5-1: Parámetros del modelo TIP3P.

| σ Å | ϵ kJmol ⁻¹ | l_1 Å | q_1 e | q_2 e | θ ° |
|------------|--------------------------------|---------|---------|---------|------------|
| 3.15061 | 0.6364 | 0.9572 | +0.4170 | -0.8340 | 104.52 |

Donde σ y ϵ son valores expresados como una función del potencial de Buckingham la cual es mas suave en el área repulsiva que la función r^{-12} de Lennard Jones original.

Esto le permite al potencial decaer de manera más suave con la distancia. En la tabla 5-1 se presentan los parámetros utilizados para el modelo TIP3P.

5.3.4. Termostatos y barostatos

El termostato de Nosé-Hoover

El método de Nosé y Hoover consiste en extender el número de coordenadas del sistema para considerar una variable artificial \vec{s} con una masa asociada $Q > 0$ y una velocidad $\dot{\vec{s}}$. La magnitud de Q determina el acoplamiento entre el reservorio de temperatura y el sistema y, por lo tanto, influye las fluctuaciones de temperatura.

$$\frac{d\vec{r}}{dt} = \frac{\vec{p}}{m}$$

$$e \frac{d\vec{p}}{dt} = \vec{F} - \vec{s}\vec{p}$$

$$\frac{d\vec{s}}{dt} = \frac{p^2/m - 3Nk_B T}{Q} \quad (5-20)$$

El barostato de Berendsen

Uno de los barostatos más utilizados en simulaciones, y el cual se encuentra implementado en la suite AMBER, es el barostato de Berendsen. El barostato de Berendsen es una técnica en la cual para mantener la presión en control y se escala según el volumen de la celda donde se lleva a cabo la simulación.

Utilizando la definición de la presión instantánea P

$$P = \rho T + \frac{vir}{V} \quad (5-21)$$

donde vir es la expresión del virial:

$$vir = \frac{1}{3} \sum_{i>j} \vec{f}(r_{ij}) r_{ij} \quad (5-22)$$

y $V = L^3$ es el volumen del sistema. $\vec{f}(r_{ij})$ es la fuerza ejercida por la partícula i sobre la partícula j . El barostato de Berendsen utiliza un factor de escalamiento $\mu(P)$ para ajustar los tamaños dentro de la celda. Entonces,

$$\vec{r} \longrightarrow \mu \vec{r} L \longrightarrow \mu L$$

en la implementación μ se define como:

$$\mu = \left[1 - \frac{\Delta t}{\tau_P} (P - P_0) \right]^{-3} \quad (5-23)$$

Donde Δt es el tamaño de paso del integrador, τ_P es el tiempo característico del barostato y P_0 es la presión objetivo. Es importante notar que para sistemas no cúbicos existe una derivación tensorial análoga.

5.4. Métodos de análisis

5.4.1. Alineamiento de estructuras

El alineamiento de estructuras consiste en un caso especial de análisis estadístico de la forma en el cual se analizan rotaciones, traslaciones y escalamientos. El caso donde no se utilizan escalamientos se denomina algoritmo de Kabsch y consiste en trasladar ambos conjuntos de vectores a las coordenadas de sus centroides respectivos, y determinar la rotación óptima mediante el cálculo de la matriz de covarianzas A

$$A = P^T Q \quad (5-24)$$

y

$$A_{ij} = \sum_{k=1}^N P_{ki} Q_{kj} \quad (5-25)$$

Entonces la rotación óptima $U = (A^T A)^{1/2} A^{-1}$

Esta formulación se encuentra con el problema de que no existe solución si A no tiene inversa.

Si se utiliza la descomposición en valores singulares U puede determinarse como:

$$A = V S W^T$$

$$d = \text{sign}(\det(WV^T))$$

$$U = W \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & d \end{pmatrix} V^T$$

El problema a resolver es el de la minimización de la distancia entre posiciones equivalentes en cuerpos rígidos utilizando transformaciones conformes (rotación, traslación). Coutsias et al [56] fueron los primeros en desarrollar el formalismo de cuaterniones para encontrar la transformación óptima que minimiza el RMSD entre dos conjuntos de vectores.

El algoritmo de alineamiento de estructuras durante una dinámica molecular está íntimamente ligado con la determinación de las medidas de similaridad estructural empleadas. Una de las medidas mas utilizadas es el RMSD

5.4.2. RMSD

La desviación cuadrática media es la medida de la distancia interatómica promedio entre los átomos de proteínas sobrepuestas. La forma de este indicador es la siguiente:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |\vec{v}_i - \vec{w}_i|^2}$$

donde los vectores \vec{v}_i y \vec{w}_i se refieren a las posiciones del átomo i-ésimo en las estructuras v y

w y N es el número total de puntos a considerar.

5.4.3. RMSF

El RMSF es una medida estadística de la autocorrelación que existe entre los diferentes residuos de la proteína a lo largo de una trayectoria de dinámica molecular. Se define como:

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{i=1}^T (x_i - x_0)^2}$$

donde T es el número de puntos dentro de la trayectoria a considerar, y x_i es la posición de la partícula al tiempo i, y x_0 es la posición de la partícula en la estructura de referencia.

5.4.4. Radio de giro

El radio de giro de un polímero se define como la distribución de los componentes que lo forman alrededor de un eje de rotación, para un tiempo t dado, el radio de giro se define matemáticamente como:

$$R_g^2 = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N (\vec{r}_k - \vec{r}_{media})^2 \quad (5-26)$$

donde \vec{r}_k es la posición del átomo k-ésimo y \vec{r}_{media} es la posición promedio de los átomos en toda la trayectoria de dinámica molecular.

Esta medida de dispersión es útil para estimar si existen cambios significativos en la estructura de polímeros tales como proteínas y nos da una manera de cuantificarlos a gran escala.

5.4.5. Correlación dinámica

La correlación dinámica es la medida de la correlación que existe entre las posiciones de una estructura a lo largo del tiempo. Matemáticamente se define como:

$$DCCM = \begin{pmatrix} r_{1,1} & r_{1,2} & \cdots & r_{1,n-1} & r_{1,n} \\ r_{2,1} & \ddots & & & \vdots \\ \vdots & & \ddots & & \vdots \\ r_{n-1,1} & & \cdots & & \vdots \\ r_{n,1} & r_{n,2} & \cdots & r_{n,n-1} & r_{n,n} \end{pmatrix} \quad (5-27)$$

donde $r_{i,j}$ es el coeficiente de correlación entre las series temporales de las coordenadas de los átomos i y j . La correlación se calcula como:

$$r_{ij} = \frac{cov(i,j)}{\sigma_i \sigma_j} \quad (5-28)$$

donde $cov(i,j)$ es la covarianza entre las series i y j , σ_i es la desviación estándar de la serie i y σ_j es la de la serie j .

Los mapas de correlación dinámica son una medida de la relación que existe entre los movimientos de los residuos en una proteína o entre dos proteínas en un complejo.

Uno de los problemas de esta medida, es que no nos informa sobre la magnitud del movimiento observado, simplemente nos habla del grado de correlación entre los carbonos de los diferentes residuos.

5.5. Agrupamiento

Los métodos de “*clustering*” o agrupamiento de estructuras nos indican que estructuras son más similares entre sí que entre estructuras pertenecientes a diferentes clusters.

En general no existe un único algoritmo de agrupamiento, sino un conjunto de técnicas. Estas técnicas tienen aplicaciones en diferentes campos, pero nos enfocaremos principalmente en las utilizadas en la bioinformática.

El método de agrupamiento implementado dentro del programa cpptraj en AmberTools es el método conocido como “single linkage clustering” y pertenece a la familia de algoritmos de agrupamiento jerárquico.

El método consiste en generar una matriz de distancias de dimensiones $n \times n$ donde n es el número de estructuras a agrupar. En el primer paso, cada estructura forma parte de su propio

grupo, por lo que se tienen n grupos. Las distancias entre grupos serán iguales a las distancias de los objetos que contienen.

Los dos grupos más cercanos entre sí se fusionan generando un nuevo grupo y se calculan las distancias de cada grupo al nuevo grupo. En el caso de “single linkage clustering” la distancia entre un grupo y otro se define como la distancia mínima entre los miembros de cada grupo. Se repite el paso anterior hasta obtener un sólo grupo, o llegar al número especificado de grupos.

5.6. Calorimetría de titulación isotérmica

La calorimetría de titulación isotérmica es una técnica física para encontrar los parámetros termodinámicos de interacciones en solución. Usualmente se utiliza para estudiar la unión de moléculas pequeñas a macromoléculas como ADN o proteínas. Se utiliza para determinar la afinidad de unión, cambios en la entalpía, y la estequiometría. A partir de estas medidas se puede determinar la energía de Gibbs de la unión y cambios en la entropía.

Un calorímetro de titulación isotérmica se compone de dos celdas idénticas fabricadas de materiales térmicamente conductivos y químicamente inertes como Hastelloy u oro, rodeados por un baño adiabático. Circuitos termoacopladores altamente sensibles son utilizados para detectar diferencias de temperatura entre una celda de referencia (llena de buffer o agua) y la celda con muestra. Antes de la adición a ligante, se suministra una potencia constante (<1 mW) a la celda de referencia. Esto dirige un circuito de retroalimentación, activando un calentador localizado en la celda con muestra. Durante el experimento, el ligante es titulado con alícuotas de volumen conocido, causando que haya calor generado o absorbido por la reacción (dependiendo si es exotérmica o endotérmica, respectivamente). Las medidas consisten en la entrada de potencia dependiente del tiempo requerido para mantener la temperatura entre las celdas de muestra y referencia. En una reacción exotérmica, la temperatura en la celda de muestra aumenta debido a la adición de ligante. Esto causa que la retroalimentación de poder a la celda de muestra sea disminuido. En una reacción endotérmica, ocurre lo opuesto, el circuito de retroalimentación aumenta la potencia suministrada para mantener una temperatura constante entre las dos celdas. Las observaciones son graficadas como la potencia para mantener la referencia y la muestra a temperaturas idénticas a lo largo del tiempo. Como resultado de esto, los experimentos consis-

ten en una serie de picos de potencia a lo largo del tiempo, con cada pico correspondiendo a una inyección de ligante.

Estos picos son integrados con respecto al tiempo para producir el calor total intercambiado por inyección. El patrón de estos efectos de calor como función de la razón molar [ligante]/[macromolécula] puede entonces ser analizado para obtener los parámetros de la interacción a estudiar.

Capítulo 6

Resultados

6.1. Conformación promedio de la subunidad α aislada.

Entre las múltiples estructuras cristalinas de F₁-ATPasa reportadas hasta la fecha, elegimos la estructura de bovino F₁ (MF₁) en la cual no hubieron inhibidores presentes durante la cristalización. Por esta razón, se la conoce como la estructura de estado basal para el intermediario de la pausa catalítica [2]. En esta estructura, las tres subunidades α , denominadas α_{TP} , α_{DP} y α_E (basándose en el sitio catalítico que complementan), muestran conformaciones casi idénticas.

Como se ilustra en la Figura 6-1 A-B, la subunidad α se alinea a β_E o β_{TP} con un RMSD virtualmente idéntico (2.3 y 2.4 Å, respectivamente). Sin embargo, cuando el alineamiento se restringe a los dominios centrales de las dos subunidades, es evidente que aunque la subunidad α tiene un sitio de unión cerrado [6, 57], la orientación de su dominio carboxilo terminal (residuos 380-510) muestra una conformación abierta (Figura 6-1C).

Para intentar elucidar la plasticidad conformacional de la subunidad α aislada, realizamos simulaciones de dinámica molecular no restringidas de 100 ns de duración. Para modelar la estructura inicial de la subunidad aislada, extrajimos la conformación α_{TP} de MF1 (código PDB 2JDI), ya que entre las tres subunidades α presentes en la estructura es la que muestra la menor correlación de movimientos con las estructuras adyacentes [28]. Se generaron dos trayectorias para la subunidad ligada a MgATP (α_{holo}), y 2 para la conformación inicial donde se removieron las coordenadas del nucleótido (α_{apo}).

Primero, determinamos la raíz cuadrada de la media de la fluctuación (RMSF), donde se ob-

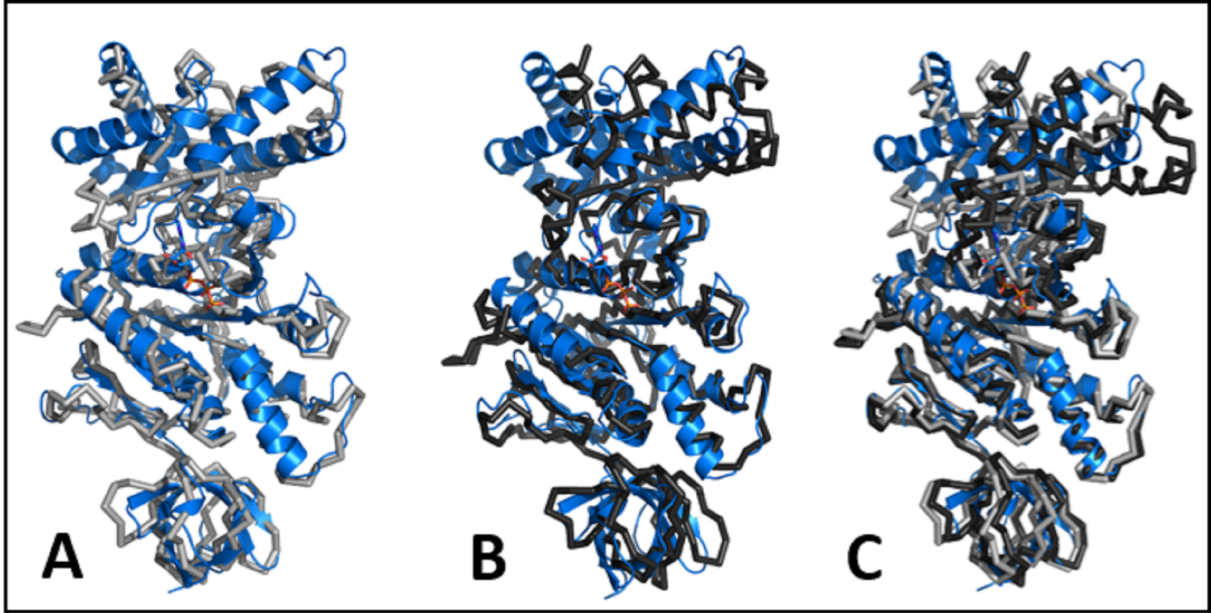


Figura 6-1: Alineamiento estructural de la subunidad α (azul) a la subunidad β . A) y B) Mejor superposición global a β_E (gris claro) y β_{TP} (gris oscuro), respectivamente. C) alineamiento basado en los dominios centrales.

serva que el núcleo del dominio central (residuos 199-272) muestra la menor movilidad a lo largo de la trayectoria (Figura 6-2). Por lo tanto, todas las trayectorias fueron alineadas utilizando esta región como un ancla. Un acercamiento similar fue utilizado para zonas específicas de la subunidad β .

Las dos trayectorias independientes para α_{apo} generaron estructuras promedio muy similares entre sí y a la estructura inicial (Figura 6-3), mientras que las estructuras promedio para las dos trayectorias de α_{holo} adoptaron una estructura ligeramente más cerrada.

El análisis de “clustering” restringido al carboxilo terminal reveló que la subunidad α ocupa de manera mayoritaria un número reducido de conformaciones, todas ellas similares a la conformación promedio, como se muestra en la Figura 6-4 para α_{holo} . Resultados similares fueron obtenidos para α_{apo} (Tabla 6-1). Esto muestra que, al menos en la escala de tiempo estudiada, la subunidad α adopta una conformación estable similar a la abierta cuya topología cambia poco ante la unión a nucleótido.

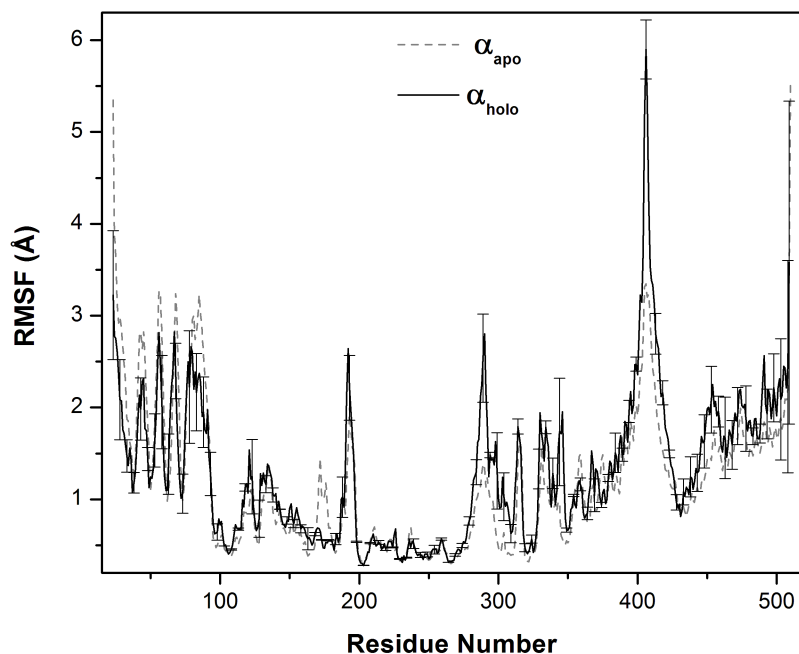


Figura 6-2: RMSF de la dinámica de apo (punteada) y holo (sólida). Las estructuras fueron alineadas a la estructura promedio de la dinámica correspondiente

6.2. Termodinámica de interacción de la subunidad α aislada con MgATP

Debido a las limitaciones inherentes a los métodos de dinámica molecular, la validación de los resultados de las simulaciones es algo deseable. Para este propósito, nos basamos en determinaciones calorimétricas efectuadas por Guillermo Salcedo dentro de nuestro grupo de investigación. Se determinaron los parámetros de unión de la subunidad α aislada en función de la temperatu-

Tabla 6-1: Fracciones de la población en los diferentes clusters

| Cluster | α_{apo} | α_{holo} |
|---------|-----------------|-----------------|
| 1 | 0.49 ± 0.04 | 0.30 ± 0.02 |
| 2 | 0.25 ± 0.01 | 0.17 ± 0.06 |
| 3 | 0.12 ± 0.02 | 0.14 ± 0.06 |
| 4 | 0.06 ± 0.02 | 0.10 ± 0.02 |
| Suma | 0.92 ± 0.00 | 0.71 ± 0.11 |

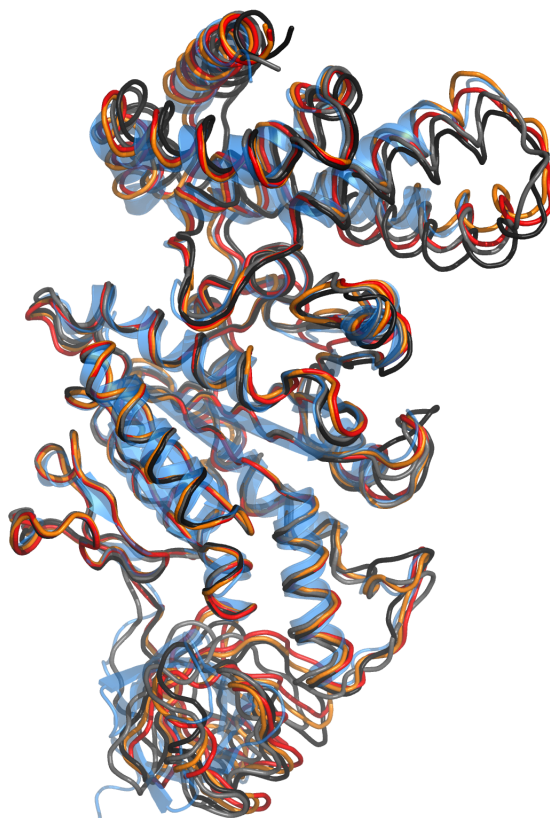


Figura 6-3: Estructuras promedio de las trayectorias de dinámica molecular para α_{apo} (naranja y rojo) y α_{holo} (gris y negro). La estructura cristalina de α_{TP} , mostrada en caricatura azul, fue tomada del PDB con código 2JDI [2]

ra, con el fin de cuantificar la capacidad calorífica de unión (ΔC_p). Esta función termodinámica es determinada principalmente por la reorganización del solvente alrededor de las superficies del ligante y la proteína, y, por lo tanto, es un excelente reportero de la cantidad de cambios conformacionales que ocurren durante la formación de complejos [58–60]. La Figura 6-5 muestra como ejemplo de las determinaciones calorimétricas, las isotermas obtenidas a 35 °C para la titulación de la subunidad α con ATP y MgATP. Los datos calorimétricos para la titulación con ATP en ausencia de Mg tuvieron un buen ajuste utilizando un modelo de un sólo sitio de unión. En presencia de Mg(II), se ajustó a los datos un modelo de unión que toma en cuenta la formación de todas las especies en el Esquema 5-1. Para reducir el número de grados de libertad, los valores experimentales para la asociación con ATP por la subunidad α , así como valores previamente determinados para la formación de los complejos MgATP/Mg₂ATP [54] fueron utilizados como

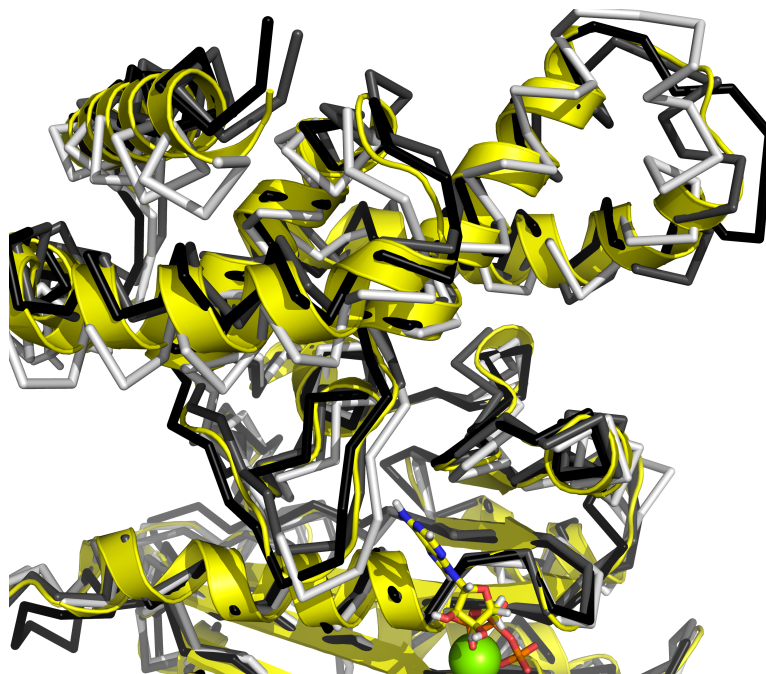


Figura 6-4: “Clusters” principales sobre las estructuras de la dinámica comparados con la estructura cristalográfica (amarillo) la ocupación está indicada por el tono de la estructura de mayor ocupación (negro) a menor (gris claro).

valores fijos al ajustar el modelo ternario.

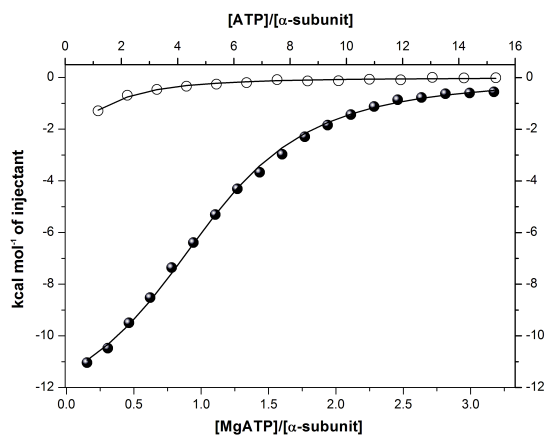


Figura 6-5: Curva de titulación de ATP sintasa mediante ITC.

La tabla 6-2 recopila los resultados calorimétricos obtenidos en el rango de 20 a 35 °C. Estas mediciones complementan las reportadas previamente para la misma subunidad a la misma temperatura [51]. Como ha sido notado anteriormente, la formación del complejo se encuentra

Tabla 6-2: Energética de unión de la subunidad α aislada a MgATP y ATP

| Temperatura °C | K_b (mM ⁻¹) | ΔG_b (kcal/mol) | ΔH_b (kcal/mol) | $-T\Delta S_b$ (kcal/mol) |
|-----------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| α -MgATP | | | | |
| 20 | 303 ± 58 | -7.4 | -12.3 ± 0.7 | 4.9 |
| 25 | 616 ± 13 | -7.9 | -12.1 ± 0.4 | 4.2 |
| 30 | 220 ± 30 | -7.4 | -12.3 ± 0.8 | 4.9 |
| 35 | 79 ± 18 | -6.9 | -11.9 ± 0.7 | 5.0 |
| α -ATP | | | | |
| 20 | 2.6 ± 0.3 | -4.6 | -4.6 ± 0.7 | 0 |
| 25 | 1.8 ± 0.1 | -4.5 | -4.5 ± 0.7 | 0 |
| 30 | 2.0 ± 0.5 | -4.6 | -4.5 ± 0.7 | 0.1 |
| 35 | 1.9 ± 0.7 | -4.6 | -4.4 ± 0.7 | 0.2 |

guiada entálpicamente, exhibiendo una contribución tres veces mayor en presencia del ion magnesio. Mientras que la unión a nucleótido en ausencia del metal es casi isoentrópica, una contribución entrópica desfavorable significativa se observa en presencia de Mg(II). Como resultado de esta compensación parcial entálpica/entrópica, la afinidad a nucleótido ante la adición de Mg(II) cambia del rango milimolar a micromolar.

La tabla 6-2 muestra que la entalpía y entropía de unión permanecen casi constantes en el intervalo de temperatura muestreado. El análisis por regresión lineal de la dependencia térmica de ΔH_b ($\Delta C_{p_b} = \frac{\partial \Delta H_b}{\partial T}$) resulta en un cambio en la capacidad calorífica pequeño y positivo para la interacción de la subunidad α con MgATP ($20 \pm 15 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) ver Figura (6-6).

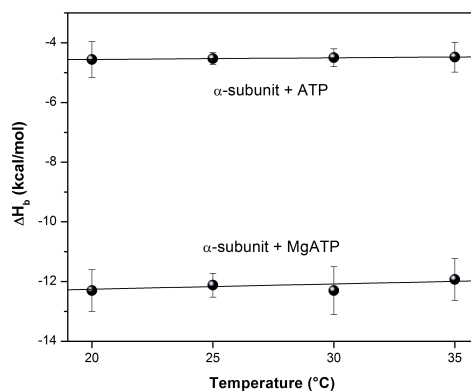


Figura 6-6: Entalpía de unión de la subunidad α con ATP medida experimentalmente en función de la temperatura. Se muestran los casos en presencia y ausencia de magnesio.

Esta magnitud contrasta con el ΔC_{p_b} negativo ($-150 \pm 20 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) reportados para la unión de la subunidad β aislada [54]. Previamente, ha sido determinado que este cambio se encuentra de acuerdo con el gran cambio conformacional de abierta a cerrada que sufre la subunidad catalítica ante la unión a nucleótido [54, 61]. En contraste, incrementos en la capacidad calorífica se observan raramente en eventos de complejación proteína-ligante y han sido racionalizados en términos de interacciones dominantes del tipo polar-polar [18, 62, 63]. Para obtener una estimación de ΔC_{p_b} basada en la estructura se utilizó la conformación observada observada en la estructura cristalina de MF₁ [2]. Asumiendo una interacción tipo cuerpo rígido entre α_{TP} y MgATP, la formación del complejo sería acompañada del enterramiento de 513 y 260 Å² de áreas polar y no polar, respectivamente.

$$\begin{aligned} \Delta C_p &= \sum_{i=1}^N \Delta A_i & (6-1) \\ &= -0,26\Delta A_{pol} + 0,45\Delta A_{np} \\ &= -0,26(-513) + 0,45(-260) \end{aligned}$$

De acuerdo a datos de compuestos modelo [58], estos cambios en el área expuesta generan un cambio de ΔC_{p_b} esperado de $7 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, una magnitud que se compara favorablemente con la determinada calorimétricamente. Por lo tanto, este resultado sugiere que la subunidad α aislada sufre cambios conformacionales limitados ante la unión a nucleótido, con el ΔC_{p_b} experimental determinado principalmente por el ocultamiento de las superficies polares del nucleótido y la proteína en la interfase de unión.

6.3. Influencia del ion Mg(II)

Como fue notado previamente en nuestro grupo por Salcedo et al. [51], una diferencia significativa entre las subunidades catalíticas y no catalíticas es la mayor dependencia de la segunda a Mg(II) para el reconocimiento de ATP. De acuerdo a los datos en la Tabla 6-2, la constante heterotrópica para la subunidad α , definida como la razón de la constante de unión a nucleótido en la presencia de Mg(II) con la constante determinada en ausencia del metal, varía entre 308 a 25 °C

y 42 a 35 °C, y es de sólo 8 para la subunidad β . Para explorar los factores estructurales determinantes de este comportamiento tan disímulo, generamos trayectorias de dinámica molecular de la subunidad α complejada a ATP sin metal.

Trayectorias similares fueron generadas para la subunidad β complejada con ATP y MgATP. Se observa que en las estructuras promedio de ambas subunidades (Figura 6-7), la ausencia de Mg(II) provoca un deslizamiento de 1-2 Å del nucleótido dentro del sitio de unión hacia la (α Q⁴³⁰/ β Q⁴¹⁶), la cual se encuentra a un residuo de distancia del extremo C-terminal del motivo HTH.

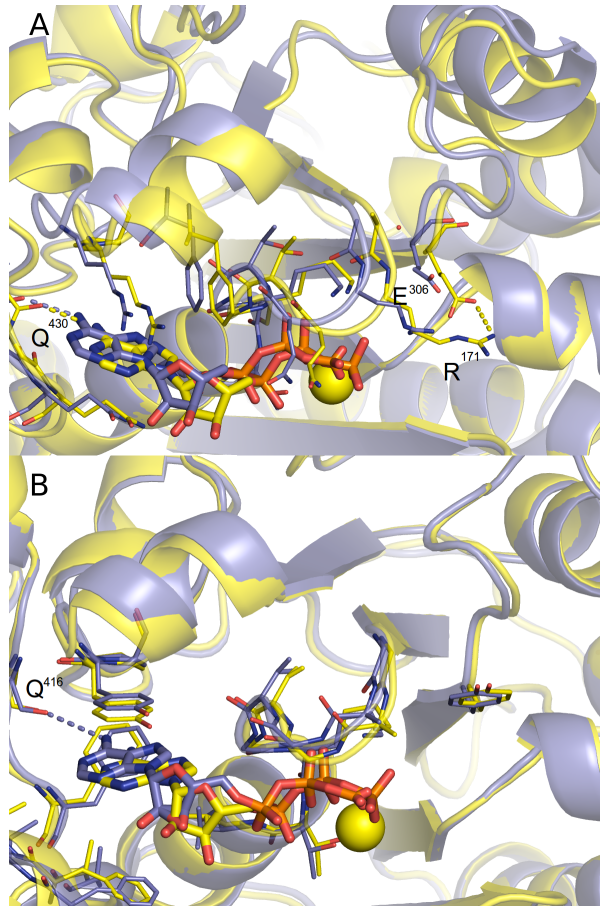


Figura 6-7: Estructuras promedio de la subunidad α (A) y β (B) en presencia (amarillo) y ausencia (morado) de magnesio obtenidas de las trayectorias.

Tanto en la estructura promedio como en el cristal, el grupo carbonilo de α Q⁴³⁰ se encuentra unido por un puente de hidrógeno a la amina primaria de la adenosina (N6), una interacción que se conserva en ausencia de Mg(II) (Figura 6-7A). En contraste, β Q⁴¹⁶ no interacciona con el

ATP tanto en ausencia de Mg(II) como en el cristal, mientras que el deslizamiento del nucleótido permite la unión por puente de hidrógeno al N6 de la adenina (Figure 6B). Por lo tanto, la subunidad β parece que compensa la pérdida de interacciones mediadas por Mg(II) formando un puente de hidrógeno adicional. Además de esta diferencia, se puede observar en la Figura 6-7 que la ausencia de metal produce un rearrreglo del sitio de unión de la subunidad α que involucra un desplazamiento del P-loop (R¹⁷¹-G¹⁷⁵) que afecta las interacciones de cadena lateral entre R¹⁷¹ y E³⁰⁶. Esto provoca un relajamiento del empaque de las cadenas de las hélices α F y G en los segmentos G²⁹⁶-E³⁰⁷ y Y³³⁷-I³⁴⁵. En cambio, en la subunidad β estos rearrreglos no se observaron.

6.4. Flexibilidad estructural de la subunidad α aislada

A pesar de los desplazamientos limitados observados para las estructuras promedio de α_{apo} y α_{holo} , la inspección visual de las trayectorias alineadas revela que el dominio carboxilo terminal exhibe un amplio rango de movimiento. La Figura 6-8A muestra una selección de los confórmeros de las trayectorias, los cuales fueron elegidos para abarcar el rango de movimiento entre β_E y β_{TP} . Además de estos confórmeros, un número de conformaciones menos pobladas fueron observadas que se desvían de la línea hipotética creada por la interpolación lineal describiendo la transformación entre β_E y β_{TP} [64]. La Figura 6-8B muestra el curso temporal del RMSD del dominio C-terminal. El rango de fluctuación es similar al reportado para la subunidad β aislada [65]. La figura 6-8C muestra la distancia de desplazamiento del asa en el motivo HTH de la subunidad α , en relación con la posición del motivo correspondiente en las subunidades β_E y β_{TP} . La distancia entre los confórmeros de β es de 13 Å, el cual es comparable con los movimientos observados en la subunidad α . En conjunto, estas observaciones substancian la conclusión de que la subunidad α es capaz de recorrer casi todo el espacio conformacional entre las conformaciones cerrada y abierta de la subunidad β . Un análisis comparativo de los datos en la figura 6-8 revelan lo que parece ser un efecto consistentemente distintivo del MgATP sobre la movilidad de la subunidad α , a saber: que el dominio C-terminal es capaz de sufrir desplazamientos mayores en la forma unida a nucleótido. De hecho, el RMSD y las amplitudes del desplazamiento del motivo HTH de la subunidad complejada son comparables a las exhibidas por la subunidad β_E , mientras que la ausencia de nucleótido provoca una movilidad similar a la de β_{TP} . Una conclusión

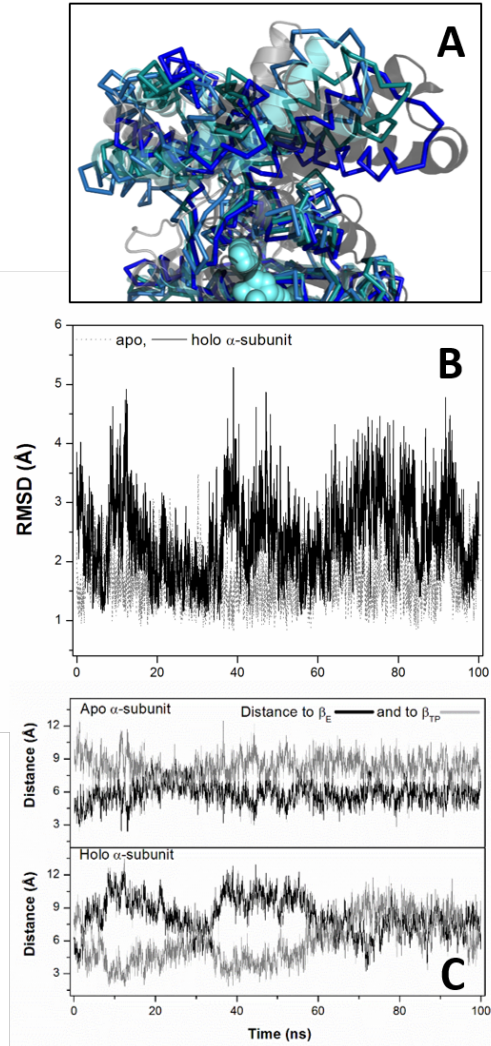


Figura 6-8: Fluctuación conformacional de dominio C-terminal de la subunidad α . A) Se muestra una selección de conformeros observados en las trayectorias de dinámica molecular para α_{holo} . En comparación las estructuras de β_E (gris claro) y β_{TP} (gris oscuro) se muestran en caricatura, así como las conformaciones promedio de la subunidad α (cian). B) Curso temporal del RMSD para α_{apo} (línea gris) y α_{holo} (línea negra). Sólo se muestran los resultados de una corrida, aunque fueron obtenidos resultados similares para las demás réplicas. Los resultados promedio de RMSD para las dos réplicas fueron 1.7 ± 0.4 and 2.5 ± 0.7 Å para α_{apo} y α_{holo} , respectivamente. Los valores correspondientes para β_E y β_{TP} 3.0 ± 0.8 Å y 2.0 ± 0.5 , respectivamente. C) Distancia del loop en el motivo HTH de la subunidad α correspondiente al mismo loop en β_E (línea negra) y β_{TP} (línea gris). Para esta medida, las distancias fueron calculadas entre los centros geométricos de los residuos que flanquean al asa $\alpha A 401$, $\alpha A 402$, $\alpha Q 415$, $\alpha Q 416$ en las subunidades α , y $\beta K 382$, $\beta S 383$, $\beta K 415$, $\beta L 416$ en las subunidades β .

similar a esta puede extraerse de comparar los resultados de RMSF del carboxilo terminal entre ambas estructuras, los cuales son menores en α_{apo} que en α_{holo} . Adicionalmente, los resultados de “clustering” indican que, en presencia del nucleótido, los 4 clusters más ocupados abarcan una fracción menor del total de conformeros visitados en la trayectoria.

6.5. Análisis de los mapas de correlación dinámica de la subunidad α .

El estudio de la matriz de correlación dinámica permite ver de manera gráfica la correlación existente entre diferentes dominios o secciones de una proteína, o la interacción entre dominios de dos proteínas. En este caso nos interesó aplicar esta métrica para comprobar si los rangos de movimiento exhibidos a lo largo de las trayectorias se encontraban en concierto y presentaban interacciones de largo alcance (Figuras 6-9, 6-10).

A lo largo de la diagonal principal, se puede observar que las interacciones se corresponden con la estructura tridominio pudiéndose observar 3 cuadros a lo largo de la diagonal principal en ambas figuras. En el caso de α_{apo} se puede observar que las correlaciones entre el dominio de unión a nucleótido y el dominio C-terminal se encuentran debilitadas. Esto parece reforzar la noción de que la unión a nucleótido aumenta el rango conformacional accesible a la subunidad α .

En ambos casos, es importante notar que las correlaciones entre el dominio amino terminal, y el resto de la proteína, son un artefacto provocado por estudiar la proteína aislada, estos movimientos no se observan cuando la proteína se encuentra dentro del anillo F₁ [37]. En ambos casos la región de unión a nucleótido y su correlación con el carboxilo terminal se presentan con correlaciones positivas, y significativas, lo que sugiere una comunicación interdominio que puede estar relacionada al cambio conformacional.

Como se puede observar en la figura 6-9 en la subunidad aislada unida a nucleótido existen correlaciones entre el movimiento del amino terminal con el carboxilo terminal y más importante aún de la zona de unión a nucleótido con el carboxilo terminal. Movimientos similares han sido reportados para la subunidad β [66] y para las subunidades α y β dentro del anillo F₁.

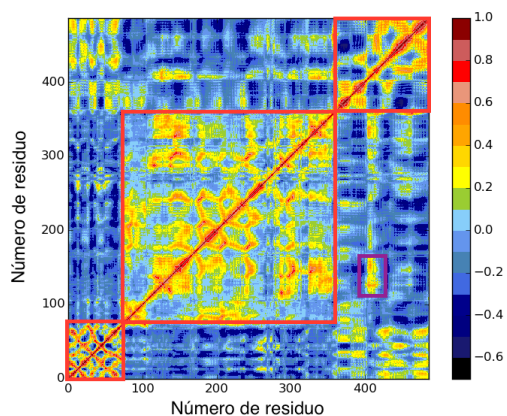


Figura 6-9: Mapa de correlación dinámica de la subunidad α_{holo} a lo largo de la trayectoria. Las zonas en rojo indican correlaciones positivas más altas. En azul se muestran las correlaciones negativas. nótese la correlación entre el dominio de unión a nucleótido y el carboxilo terminal.

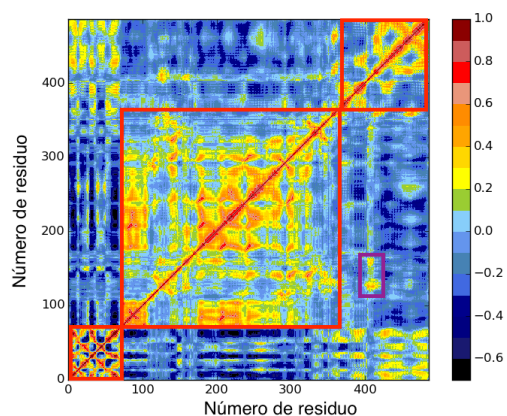


Figura 6-10: Mapa de correlación dinámica de la subunidad α_{apo} a lo largo de la trayectoria. Las zonas en rojo indican correlaciones positivas más altas. En azul se muestran las correlaciones negativas. Es importante comparar esta imagen con la obtenida para la subunidad holo, y notar que las correlaciones entre el dominio de unión a nucleótido y el dominio C-terminal se ven más débiles.

Capítulo 7

Conclusiones

7.1. Discusión

En comparación con lo que se sabe de la subunidad β , se conoce muy poco acerca del comportamiento conformacional de la subunidad α , y el papel que juega en el mecanismo rotatorio de ATP sintasa. Estas subunidades comparten un origen filogenético común, probablemente debido a un evento de duplicación genética. [49] Ambas poseen una estructura tridominio casi superponible y poseen modos de unión a nucleótido y energías de interacción similares [5, 31]. Sin embargo, sus funciones son substancialmente diferentes. Hemos llevado a cabo una caracterización estructural y energética de la perturbación sufrida por la subunidad α aislada ante la unión a nucleótido. El análisis de los parámetros de unión y las trayectorias de dinámica molecular revelan que el evento de asociación modifica la conformación molecular promedio de manera marginal en la subunidad α . Dicha conformación es muy similar a la observada en F_1 , indicando que la subunidad α se encuentra en una conformación relajada de la estructura encontrada en la pausa catalítica. F_0F_1 ATP sintasa posee un mecanismo rotatorio sofisticado capaz de acoplar las energías mecánica y química con una eficiencia cercana al 100% [50, 53, 67]. De manera similar a un motor macroscópico, la optimización del mecanismo depende de varios factores, incluyendo el hecho de que los componentes deben ofrecer la menor resistencia a la rotación, para evitar la disipación de la torca. En este sentido, no es sorprendente que las diferentes tendencias conformacionales de las subunidades α y β son una propiedad inherente que se manifiesta en el comportamiento de las subunidades aisladas.

Numerosos estudios han documentado la gran flexibilidad conformacional de la subunidad β y su rol para propulsar el mecanismo de catálisis rotatoria [17, 18, 24, 28, 29, 38, 39, 44, 57–66, 68, 69]. En ausencia de nucleótido, la subunidad catalítica es proclive a visitar brevemente conformaciones similares a la conformación cerrada, aunque esta última conformación es estabilizada sólo en presencia de sustrato [17, 18, 44]. Durante las simulaciones no restringidas, la subunidad α también muestra una gran flexibilidad estructural, con desplazamientos en el dominio carboxilo terminal tan grandes como los presentados en la subunidad β . Por lo tanto, la subunidad no catalítica también posee una superficie de energía potencial bastante plana, aunque con el mínimo global optimizado para colocar el dominio carboxilo terminal en una conformación abierta. Esto permite especular que el ancestro común de las subunidades α y β ya poseía la capacidad de sufrir cambios conformacionales tipo bisagra. Una pregunta aún abierta es por qué la subunidad α retuvo la habilidad de unir nucleótido. Esta propiedad es relevante para la función de la enzima, ya que experimentos de mutagénesis dirigida han mostrado que se requieren sitios catalíticos competentes para evitar la inhibición por producto [70]. En este estudio hemos encontrado que ante la unión a nucleótido las fluctuaciones estructurales de la subunidad α aumentan de manera significativa, especialmente en el dominio carboxilo terminal, permitiéndole visitar conformaciones cercanas a las de β_{TP} . Este comportamiento contrasta con el de la subunidad β , cuya estructura se rigidiza ante la unión a nucleótido. De hecho, la movilidad de la subunidad α unida a nucleótido es comparable a la de la subunidad β libre y viceversa. De acuerdo al mecanismo de cambio de empaque, los contactos formados entre las subunidades α y β son un elemento clave en el mecanismo rotatorio [28]. En particular, β_{DP} muestra movimientos altamente correlacionados en su dominio carboxilo terminal con los dominios equivalentes de las subunidades no catalíticas adyacentes α_{DP} y α_E . Por lo tanto, rearrreglos conformacionales en β_{DP} pueden ser comunicados a otras subunidades catalíticas vía desplazamientos en las subunidades α . Es tentador proponer que la capacidad de unión a nucleótido de las subunidades α fue conservada evolutivamente para permitirle alcanzar con un costo energético menor conformaciones transientes que facilitan la comunicación entre subunidades β . Una diferencia notable evidenciada por la comparación de las firmas energéticas de las subunidades α y β es la mayor dependencia de la presencia de Mg(II) de la subunidad no catalítica para reconocer ATP. Aunque, ambas subunidades presentan un efecto cooperativo heterotrópico positivo, la afinidad de

la subunidad α se incrementa de manera dramática en presencia del ion. Consecuentemente las simulaciones revelaron claras perturbaciones en el sitio de unión de la subunidad α unido a ATP sin metal. El deslizamiento del nucleótido dentro del sitio produce un desplazamiento del loop P, con el consiguiente desempaquetamiento de las hélices F y G. En contraste, incluso cuando se encuentra un desplazamiento del nucleótido similar en la subunidad β en ausencia de Mg(II), el sitio de unión permanece inalterado relativo a la conformación promedio con MgATP, lo cual concuerda con la menor constante heterotrópica exhibida por la subunidad catalítica. Estos comportamientos contrastantes correlacionan con la función de cada subunidad. Al únicamente ser capaz de unión y no de catálisis, la subunidad α posee un sitio de unión optimizado para interactuar con MgATP en el estado basal. Por el contrario, la ausencia de metal genera una completa pérdida de la capacidad catalítica de la subunidad β , indicando que su sitio activo se encuentra optimizado para estabilizar al nucleótido en el estado de transición de la catálisis.

7.2. Perspectivas

Queda mucho trabajo por hacer, para caracterizar completamente el cambio conformacional de α . Una de las primeras tareas sería la generación de un perfil de energía libre, mediante métodos alquímicos tales como el muestreo en sombrilla. Como en el caso de β la caracterización del enlace α MgATP mediante métodos híbridos utilizando mecánica cuántica y mecánica molecular no debe ser descartado.

Apéndice A

Artículo



Inherent conformational flexibility of F₁-ATPase α -subunit



Otto Hahn-Herrera^{a,1}, Guillermo Salcedo^{a,1}, Xavier Barril^{b,c}, Enrique García-Hernández^{a,*}

^a Instituto de Química Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04630, D.F., Mexico

^b Catalan Institution for Research and Advanced Studies (ICREA), Passeig Lluís Companys 23, 08010 Barcelona, Spain

^c 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:

F₀F₁-ATP synthase

Noncatalytic subunit

Conformational flexibility

Isothermal titration calorimetry

Molecular dynamics simulation

ABSTRACT

The core of F₁-ATPase consists of three catalytic (β) and three noncatalytic (α) 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 β -subunits, it is clear that α -subunits have to respond to these changes in order to be able to transmit information during the rotary mechanism. However, the conformational behavior of α -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 α -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 α -subunit is essentially barrierless, which is ideal to accompany and transmit the movement of the catalytic subunits. Calorimetric measurements of the recombinant α -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 F₁ crystal structure, but they reveal an increased conformational flexibility of the isolated α -subunit upon MgATP binding, which might explain the evolutionary conserved capacity of α -subunits to recognize nucleotides with considerable strength. Furthermore, we elucidate the different dependencies that α - and β -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 F₀F₁-ATP synthase, a multimeric enzyme consisting of two coupled rotary sectors. Driven by a proton-motive force, the membrane sector F₀ transmits torque to the soluble sector F₁, 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 F₀, F₁ reversibly converts chemical energy into rotational energy through ATP hydrolysis. The simplest F₁ architecture with full rotary and hydrolytic activity consists of a ring of three pairs of α/β -subunits (the so-called catalytic core) [2], from which the rotary rod-like γ -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 β -subunit, complemented with a few residues from an adjacent α -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 F₁ (MF₁): β_{TP} for ATP-bound, β_{DP} for ADP-bound and β_E for empty [1,4]. β_{TP} and β_{DP} exhibit nearly superimposable conformations with the carboxyl-terminal (C-terminal) domain adopting a closed orientation, although distinct interactions established with the adjacent γ - and α -subunits make them largely different from each other. In contrast, β_E shows an open conformation, in which the C-terminal domain interacts marginally with adjacent subunits. It has been suggested that β_{TP} is the high-affinity ATP binding site and β_{DP} is the subunit ready to carry out catalysis [5,6]. The three α -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; MgCl₂, magnesium chloride; ATPase, adenosine 5'-triphosphatase; MF₁, TF₁, and EF₁, bovine, thermophilic *Bacillus* PS3 and *Escherichia coli* F₁ sectors, respectively; β_{DP} , β_{TP} , and β_E , β subunits in the crystal structure of F₁, bound to MgADP and MgATP, and empty, respectively; α_{apo} and α_{holo} , isolated α -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; ΔH_b , binding enthalpy; ΔG_b , binding Gibbs free energy; ΔS_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 (E. García-Hernández).

¹ 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 γ -subunit revolution is driven by the hydrolysis of three ATP molecules. Each 120° 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 β -subunits, one empty and one bound to MgATP, with conformations resembling the crystal structures of β_{TP} and β_E , respectively. The third catalytic subunit adopts a “half-closed” conformation, β_{HC} , assumed to be bound to just-formed ADP + Pi products. Upon ATP binding, β_E closes to adopt the β_{TP} conformation, providing the energy for an 80° rotation of the γ -subunit, with the concomitant release of ADP from β_{HC} , the opening of the latter into a β_E -like conformation, and the transformation of β_{TP} into β_{DP} . All these changes convert F_1 from an ATP-binding dwell (β_{TP} , β_E , β_{HC}) into a catalytic dwell state (β_{DP} , β_{TP} , β_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° 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 β_E [13]. In this structure, β_{TP} and β_{DP} are bound to MgADP-fluoroaluminate, showing conformations very similar to those observed in other F_1 structures, while the third β -subunit, binding ADP and sulfate, adopts a partially closed conformation (β_{TP} , β_{DP} , β_{HC}). After catalysis takes place at β_{DP} , this subunit transforms into β_{HC} , and a subsequent 40° rotation of γ -subunit allows Pi liberation from β_E , driving F_1 again into the ATP-binding dwell structure (β_{HC} , β_{TP} , β_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 α -subunits in the catalytic engine has been much less addressed and clarified [21]. A major – and obvious – role of α -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 α -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 β -subunits propagated by the noncatalytic subunits. Random mutations on EF_1 helped to identify a signal transmission region in the α -subunit that seemingly amplifies a conformational change in the arginine finger induced by the transition state, allowing long-range communication with another β -subunit [23]. Other mutational studies have indicated that negative cooperativity occurs through interactions between neighboring α - and β -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 α -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 γ -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 α - and β -subunits sequentially couple and uncouple their interactions, mainly by changes in the C-terminal domains and the nucleotide binding sites [31,32]. The α -subunit has been also suggested as determinant for the β -subunit to acquire the half-closed conformation [33].

It is our interest to study the conformational flexibility of the α -subunit, as its role inside the F_1 ring is not completely clear. Calorimetric characterizations revealed that the isolated α - and β -subunits share similar energetic strategies for recognizing nucleotides [34–36]. Nevertheless, based on crystallographic evidence, it has been suggested that α -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 α -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 α -subunit by performing 100-ns long unbiased MD simulations. In our simulations, we observed that on average the conformation of the α -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 α -subunit/MgATP complex. We also found that large movements of nucleotide-bound α -subunit, comparable to those observed from the open-to-closed conformation in β -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 α -subunit upon MgATP binding, which might explain the evolutionary conserved capacity of α -subunits to recognize nucleotides with considerable strength. Additionally, we addressed the possible determinants of the largely different dependences that α - and β -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°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

sufficient to equilibrate the system. After that, the system was subjected to unbiased MD simulations for another 100 ns. Running scripts were set up with the help of the pyMDmix software [41].

The first set of simulations involved the isolated α -subunit bound to MgATP nucleotide, and will be referred to as α_{holo} henceforth. The initial atomic positions were taken from the α_{TP} coordinates extracted from the PDB file 2JDI. A second simulation run was set up starting with the α_{TP} coordinates from which MgATP was manually erased; this will be referred to as α_{apo} . To study the influence of magnesium in nucleotide binding, simulations of the α -subunit bound to metal-free ATP were carried out. For comparison, we also carried unbiased molecular dynamics calculations of the isolated β_{E} , β_{TP} -MgATP and β_{TP} -ATP subunits using the aforementioned parameters. Distance measurements were carried out using the PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 (Schrödinger, LLC), and the VMD [42] software. Clustering analysis restricted to the C-terminal domain of the α -subunit was carried out with the CPPTRAJ utility from the AmberTools 14 suite of programs, using the average-linkage algorithm, and a C-terminal domain distance cutoff of 1 Å for clustering [43]. Average structures were generated from the dynamics and analyzed with a variety of methods including further analysis of the nucleotide binding pocket using python scripts included in the MDAnalysis module [44]. This module includes root-mean-square fluctuation (RMSF) calculations which were carried out between the time-average structure used as a reference and the whole dynamics. To further quantify the conformational fluctuations of the C-terminal domain, the temporal course of the distance between the HTH (Helix(R³⁵⁹-F³⁸¹)-Turn(A³⁸²-D³⁸⁹)-Helix(A³⁹⁰-L⁴⁰⁶)) motif in the α -subunit trajectory against the corresponding HTH (Helix(S³⁶⁵-D³⁸⁶)-Turn(I³⁸⁷-S³⁹⁷)-Helix(E³⁹⁸-L⁴¹⁴)) motif in the β_{E} and β_{TP} conformations was measured. For this measurement, distances were calculated between the average position of the loop flanking residues αA^{401} , αA^{402} , αQ^{415} , and αQ^{416} in the α -subunits, and βK^{382} , βS^{383} , βK^{415} , and βL^{416} in the β -subunits.

2.2. Experimental methods

α -Subunit from *Geobacillus kaustophilus* was overexpressed in *E. coli* BL21 cells (Novagen). This subunit, which shares 98% identity with *Bacillus PS3* α -subunit, has proven amenable for calorimetric characterizations [36], since it is not prone to aggregate in vitro in the timespan of the measurements. Recombinant α -subunit was purified to homogeneity as described elsewhere [45].

Calorimetric measurements for the titration of α -subunit with ATP or MgATP were carried out using a MicroCal™ iTc₂₀₀ System (GE Healthcare, Northampton, MA, USA). All experiments were performed in a 0.05 M Tris-HCl buffer solution, pH 8.0, supplemented with 0.1 M NaCl and 10% glycerol, in the temperature range of 20 to 35 °C. The α -subunit concentration was typically 20–50 μM , while ligand concentration in the syringe was 0.5–1.0 mM for MgATP and 2–4 mM for ATP. In the titration of α -subunit with Mg(II)-free ATP, ligand and protein solutions were supplemented with 2 mM EDTA to sequester any residual trace of the metal ion in the solution. The titration schedule consisted of 20–30 consecutive injections of ligand 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 identical conditions and the injection schedule used with the protein sample. In the case of the titration of α -subunit with Mg(II)-free nucleotide, the binding constant (K_{b}), the enthalpy change (ΔH_{b}), and the stoichiometry (n) were determined by the nonlinear fitting of normalized titration data using an identical and independent binding site model [46]:

$$Q = \frac{nM_t \Delta H_b V_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_b M_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_b M_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right] \quad (1)$$

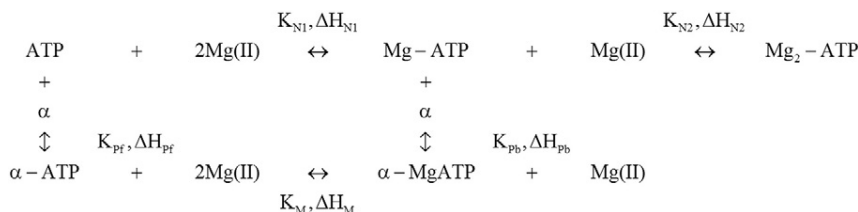
where Q is the normalized differential heat evolved per mol of ligand, after correction for dilution heats of the ligand, V_0 is the working volume of cell, and X_t and M_t are the ligand and macromolecule concentrations, respectively. For the titration of α -subunit with Mg(II)-bound ATP, both the ligand and protein solutions contained 5 mM MgCl₂. The resulting binding isotherms were analyzed using a ternary model in which α -subunit may bind ATP or MgATP, while ATP may also be in the form of Mg₂ATP, as depicted in Scheme 1. In this Scheme, subscripts N1 and N2 stand for the stepwise association of two magnesium atoms to the nucleotide, Pf and Pb for the association of metal-free and metal-bound nucleotide to the α -subunit, respectively, and M for the association of Mg(II) to the nucleotide-prebound subunit. In this coupled equilibrium of weak interactions, ATP and MgATP compete with each other for the α -subunit binding site. Derivation of the coupled-equilibria model has been presented in detail elsewhere [35]. In brief, when applied to the interaction with MgATP, the model has the form:

$$q_i = V_0 \left(\left([\alpha \cdot \text{ATP}]_i - [\alpha \cdot \text{ATP}]_{i-1} \left(1 - \frac{v}{V_0} \right) \right) \Delta H_{\text{Pf}} \right. \\ + \left([\alpha \cdot \text{MgATP}]_i - [\alpha \cdot \text{MgATP}]_{i-1} \left(1 - \frac{v}{V_0} \right) \right) (\Delta H_{\text{Pb}} + \Delta H_{\text{N1}}) \\ + \left([\text{MgATP}]_i - [\text{MgATP}]_{i-1} \left(1 - \frac{v}{V_0} \right) - F_{\text{MgATP}} [\text{ATP}]_0 \frac{v}{V_0} \right) \Delta H_{\text{N1}} \\ + \left([\text{Mg}_2\text{ATP}]_i - [\text{Mg}_2\text{ATP}]_{i-1} \left(1 - \frac{v}{V_0} \right) - F_{\text{Mg}_2\text{ATP}} [\text{ATP}]_0 \frac{v}{V_0} \right) (\Delta H_{\text{N1}} + \Delta H_{\text{N2}}) \\ + q_{\text{dil}} \quad (2)$$

where q_i stands for the heat evolved in the i -th injection, and q_{dil} is a fitting term introduced to account for experimentally uncorrected dilution heat effects. F_{MgATP} and $F_{\text{Mg}_2\text{ATP}}$ correspond, respectively, to the fraction of MgATP and Mg₂ATP complexes in the syringe introduced in the cell just by injection i . Finally, $[\text{ATP}]_0$ stands for the ATP concentration in the syringe, and v for the injection volume.

The total concentration of each species in Eq. (2) is related to the concentrations of free molecular counterparts through the equilibrium constants:

$$[\text{ATP}]_{\text{T}} = [\text{ATP}] + K_{\text{N1}} [\text{ATP}] [\text{Mg}(\text{II})] + K_{\text{N1}} K_{\text{N2}} [\text{ATP}] [\text{Mg}(\text{II})]^2 + K_{\text{Pf}} [\text{P}] [\text{ATP}] \\ + K_{\text{Pb}} K_{\text{N1}} [\text{P}] [\text{ATP}] [\text{Mg}(\text{II})] \\ [\text{Mg}]_{\text{T}} = [\text{Mg}(\text{II})] + K_{\text{N1}} [\text{ATP}] [\text{Mg}(\text{II})] + 2K_{\text{N1}} K_{\text{N2}} [\text{ATP}] [\text{Mg}(\text{II})]^2 \\ + K_{\text{Pb}} K_{\text{N1}} [\text{P}] [\text{ATP}] [\text{Mg}(\text{II})] \\ [\text{P}]_{\text{T}} = [\text{P}] + K_{\text{Pf}} [\text{P}] [\text{ATP}] + K_{\text{Pb}} K_{\text{N1}} [\text{P}] [\text{ATP}] [\text{Mg}(\text{II})] \quad (3)$$



Scheme 1. Ternary binding equilibrium among isolated F1-ATPase α -subunit (α), Mg(II) and ATP. The ability of ATP to form a bidentate complex with Mg(II) is taken into account.

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 α subunit (determined in independent experiments), and for MgATP and Mg₂ATP (taken from [35]) were kept fixed, while those for the interaction of α -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).

3. Results

3.1. Average conformation of the isolated α -subunit

Among the multiple crystal structures of F₁-ATPase reported so far [14,19,20], we chose the structure of bovine F₁ (MF₁) 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 α -subunits, named as α_{TP} , α_{DP} and α_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 α -subunit aligns to β_E or β_{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 α -subunit presents a closed binding site [4,47],

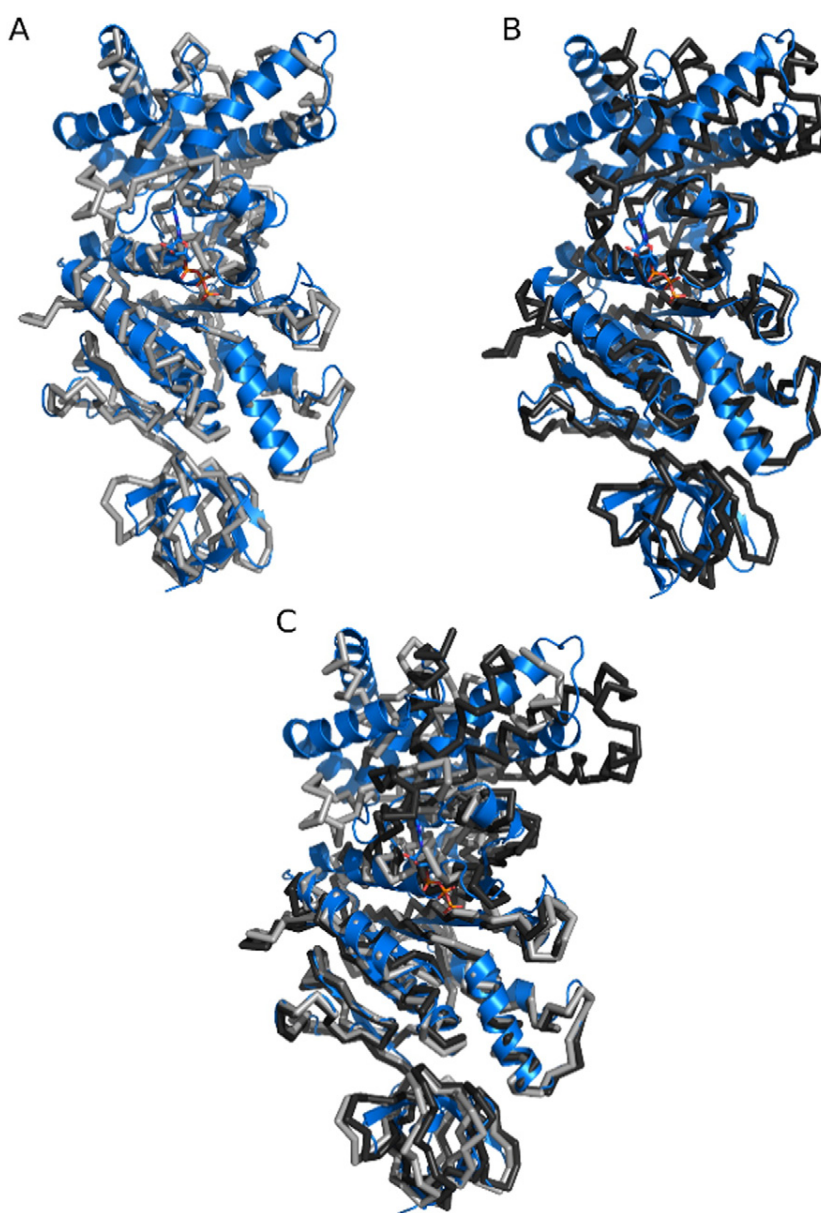


Fig. 1. Structural alignment of the α -subunit (blue) to the β -subunit. A) and B) Best global superposition to β_E (light gray) and β_{TP} (dark gray), respectively. C) Alignment based on the central domains. Coordinates were taken from the F₁ ground-state structure (PDB code 2JDI) [37].

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 α -subunit, full unrestricted 100 ns-long molecular dynamics simulations were carried out. To model the initial structure of the isolated subunit, we extracted the α_{TP} conformation from MF₁ (PDB code 2JDI), because among the three α -subunits, it shows the weakest correlated motions with adjacent β - and γ -subunits [31]. Two replicas were run for the MgATP complexed subunit (α_{holo}), and two for an initial conformation in which the nucleotide coordinates were erased (α_{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 β -subunit [48,49]. The two independent trajectories for α_{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 α_{holo} adopted a slightly more closed conformation. Furthermore, a clustering analysis restricted to the C-terminal domain revealed that the α -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 α_{holo} replicas. Similar results were obtained for α_{apo} (Table 1). Thus, it follows that at least in the spanned timescale, the α -subunit adopts a stable open-like conformation, whose overall topology remains nearly unchanged upon nucleotide binding.

3.2. Thermodynamics of the interaction of isolated α -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 α -subunit as a function of temperature, with the aim of quantifying the binding heat capacity ($\Delta C_{p,b}$). 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 α -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

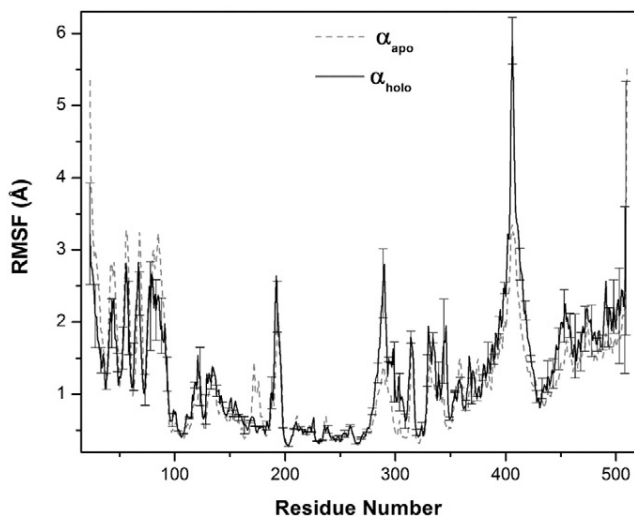


Fig. 2. Root-mean-square-fluctuations (α -carbons) for the MgATP-bound (solid line) and nucleotide-free (dotted line) α -subunit. Values shown are the average of the two replica for each system. For simplicity, dispersion bars are shown only for α_{holo} , although similar dispersions were observed for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

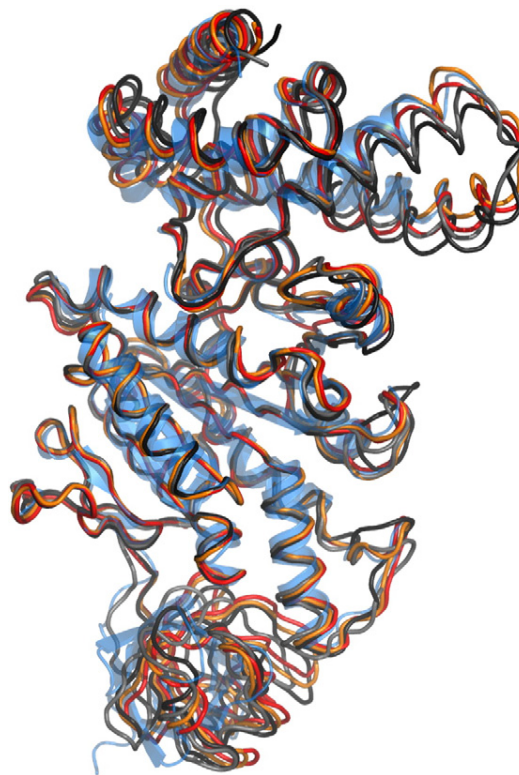


Fig. 3. Average structures from MD trajectories for α_{apo} (orange and red) and α_{holo} (gray and black). The crystal structure of α_{TP} , shown in blue cartoon, was taken from the pdb file 2JDI [37].

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 α -subunit association with ATP, as well as previously determined data for the formation of the complexes MgATP/Mg₂ATP [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

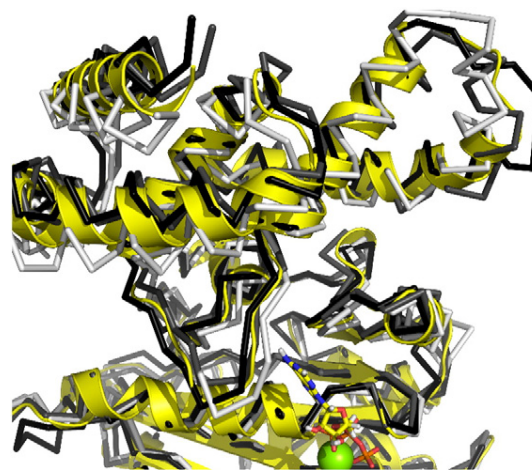


Fig. 4. Clustering results of one of the MD trajectories for α_{holo} . The average structure is shown in cartoon. More (less) populated clusters are colored in darker (lighter) gray. A similar behavior was observed for the other α_{holo} 's MD trajectory.

Table 1
Population fractions of the four major clusters in the MD runs of the isolated α -subunit.

| Cluster | α_{apo} | α_{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 ΔH_b ($\Delta C_{p_b} = \partial \Delta H_b / \partial T$) yields small and positive heat capacity changes for the interaction of the α -subunit with MgATP ($20 \pm 15 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). This magnitude contrasts with the negative ΔC_{p_b} ($= -150 \pm 20 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) reported for the binding of MgATP to the isolated β -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 ΔC_{p_b} , we used the α -subunit's conformation as observed in the crystal structure of MF₁ [37]. Assuming a rigid-body like association between α_{TP} and MgATP, complex formation would be accompanied by the burying of 513 and 260 \AA^2 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 α -subunit undergoes limited conformational changes upon ligand binding, with the experimental ΔC_{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

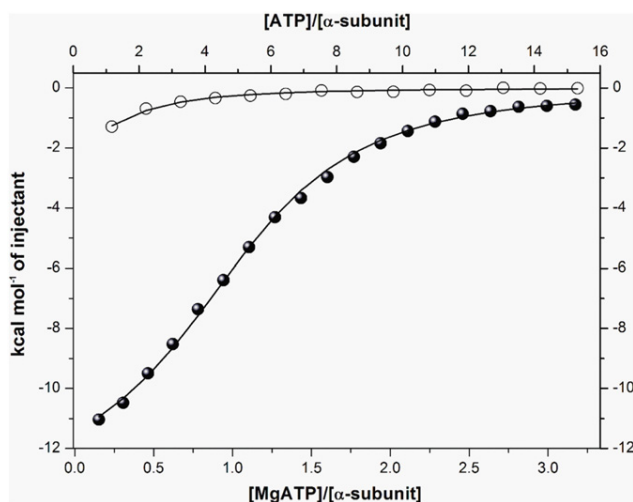


Fig. 5. Calorimetric isotherms for the binding of ATP (open symbol) and MgATP (solid symbol) to the isolated α -subunit at 35 °C, in an 0.05 M Tris HCl buffer solution supplemented with 0.1 M NaCl, pH 8.0.

Table 2
Binding energetics of the isolated α -subunit to free and Mg(II)-bound ATP^{a,b}.

| Temperature (°C) | K_b^c (mM ⁻¹) | ΔG_b (kcal/mol) | ΔH_b (kcal/mol) | $-\Delta S_b$ (kcal/mol) |
|------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| α -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 |
| α -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 |

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

^b In the presence of Mg(II), an average fitting binding stoichiometry of 0.9 ± 0.1 was obtained. In the absence of the metal ion, the stoichiometry was fixed to 1 in order to get fitting convergence.

^c K_b corresponds to K_{Pr} or K_{Pb} in Scheme 1 for the binding of Mg(II)-free or Mg(II)-bound nucleotide to the α -subunit, respectively (Scheme 1).

show on Mg(II) for ATP recognition. According to data in Table 2, the heterotropic constant for the α -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 β -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 α -subunit complexed to metal-free ATP were carried out. Similar runs were obtained for the β -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, αQ^{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, βQ^{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 β -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 α -subunit binding site, which involves a displacement of the P-loop (D¹⁷⁰-G¹⁷⁵), disrupting the sidechain-to-sidechain interaction between R¹⁷¹ and E³²⁸. In turn, a packing loosening is observed between the α -helices F (G²⁹⁶-E³⁰⁷) and G (Y³³⁷-I³⁴⁴) 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 α -subunit structure were observed only in the absence of Mg(II). Conversely, no rearrangement of the β -subunit's binding site was evident due to Mg(II) removal. In a crystal structure of MF₁ seemingly representing a posthydrolysis, preproduct-release intermediate conformation [57], β_{TP} and β_{DP} were found occupied by MgADP, while β_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 β -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 α -subunit

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

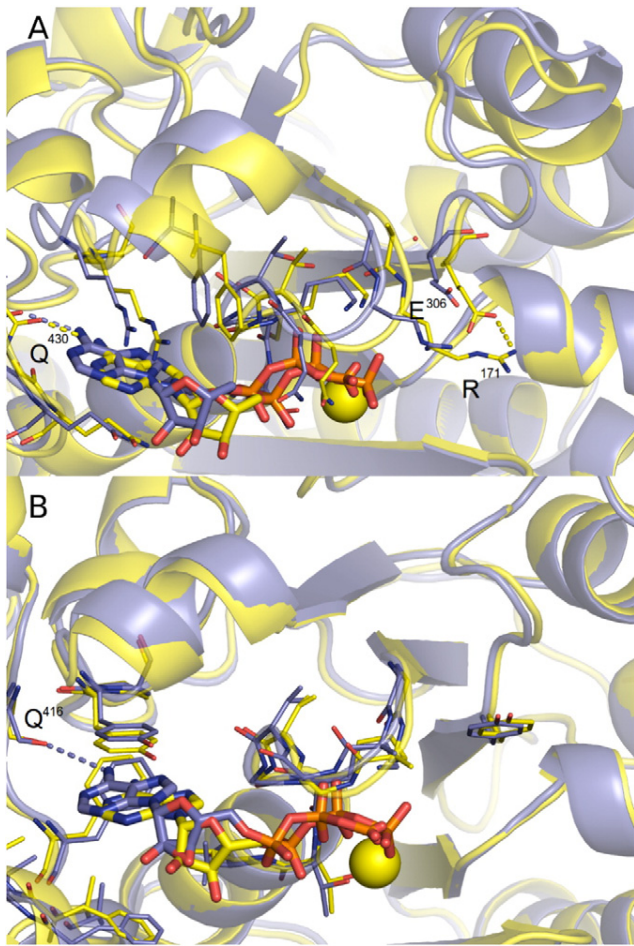


Fig. 6. Average structures of ATP-complexed α -subunit (A) and β -subunit (B) in presence (yellow-colored) and absence (purple-colored) of magnesium.

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

A comparative analysis of data in Fig. 7 reveals what seems to be a consistently distinctive effect of MgATP on the α -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 β_E , while nucleotide depletion yields a mobility similar to β_{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 α_{apo} than in α_{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.

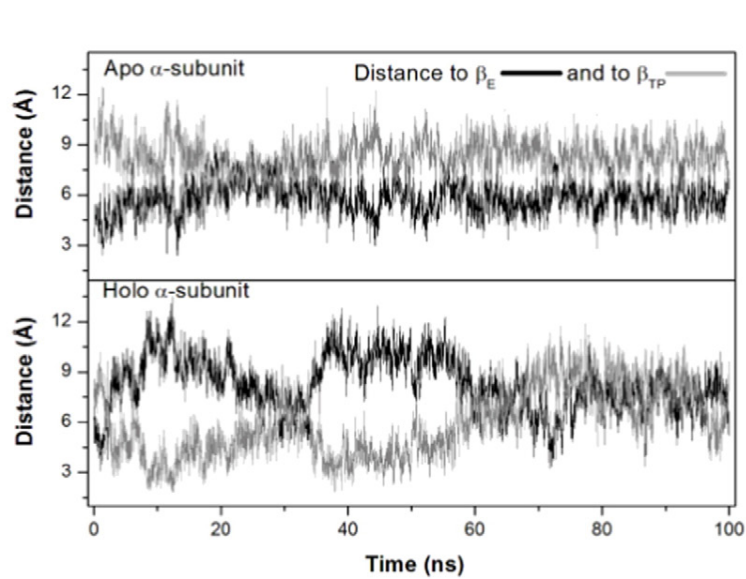
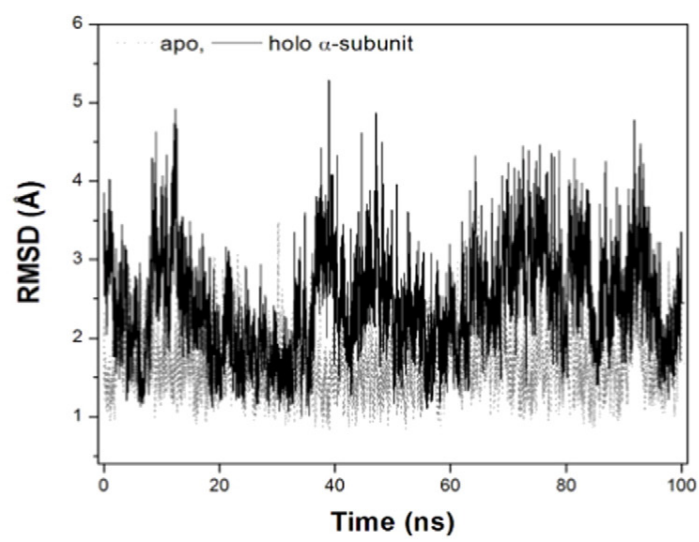
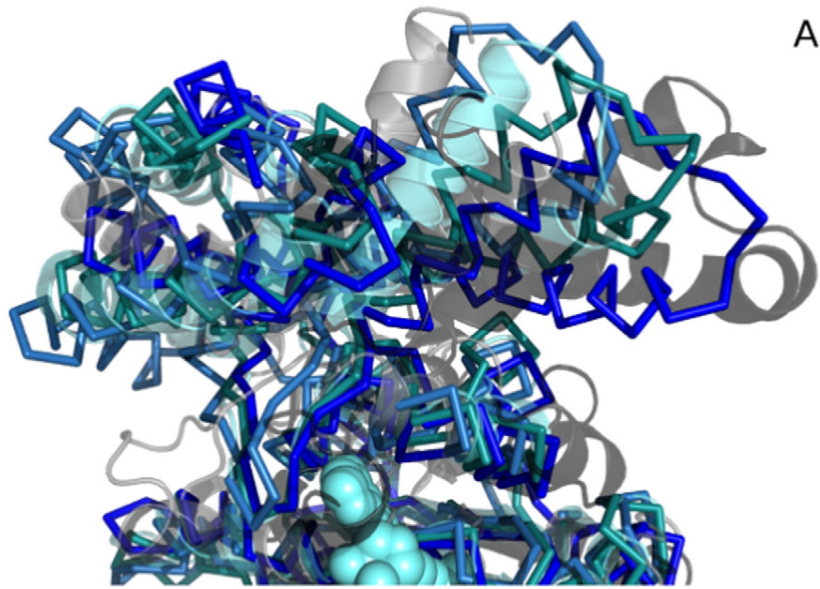
4. Discussion

Compared with the β -subunit, much less is known about the conformational behavior of the α -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 α -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 α -subunit. In turn, the conformation it adopts as an isolated subunit is very similar to that observed in F_1 , indicating that the α -subunit is in a relaxed form in the catalytic dwell structure of the enzyme. F_1F_0 -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 α - and β -subunits be an inherent property that manifest in the behavior of the isolated subunits.

Numerous studies have documented the large conformational flexibility of the β -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 α -subunit also showed ample structural flexibility, with displacements in the C-terminal domain that can be as large as those exhibited by the β -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 α - and β -subunits already possessed the ability to undergo hinge-like conformational transitions.

A still open question is why the α -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 α -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 α -subunit's C-terminal domain. A) Selection of conformers (ribbons) observed during MD simulation of α_{holo} . For comparison, crystal β_E (light gray) and β_{TP} (dark gray) structures are shown in cartoons, as well as the average α -subunit conformation (cyan). B) Temporal RMSD course for α_{apo} (gray line) and α_{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 ± 0.4 and 2.5 ± 0.7 Å for α_{apo} and α_{holo} , respectively. Corresponding values for β_E and β_{TP} were 3.0 ± 0.8 Å and 2.0 ± 0.5 , respectively (Fig. S1). C) Distance of the loop in the α -subunit's HTH motif to the corresponding loop in β_E (black line) and β_{TP} (gray line). For this measurement, distances were calculated between the average position of the loop flanking residues αA^{401} , αA^{402} , αQ^{415} , αQ^{416} in the α -subunits, and βK^{382} , βS^{383} , βK^{415} , βL^{416} in the β -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 CF₀F₁ noncatalytic sites [82]. On the other hand, from the apparently normal growth of modified *E. coli* strains bearing ATP synthase with α -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 α -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 α -subunit increase significantly, particularly in the C-terminal domain, allowing it to visit conformations closer to that of β_{TP} . This behavior contrasts with that of the β -subunit, whose structure stiffens in the nucleotide-bound form. In fact, the α -subunit's mobility bound to (free of) nucleotide is comparable to that of the empty (nucleotide-bound) β -subunit. According to the packing exchange mechanism, the distinct formed between the α - and β -subunits is a key element in the rotary mechanism [31]. In particular, β_{DP} shows highly correlated movements in its C-terminal domain with the equivalent domains of the adjacent noncatalytic subunits α_{DP} and α_E . Therefore, conformational rearrangements in β_{DP} can be communicated to the other catalytic subunits via displacements of the C-terminal domain in the α -subunits. It is tempting to propose that the nucleotide-binding ability of α -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 β -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 α -subunit has a relatively rapid nucleotide-binding equilibrium. This observation is in line with the MD findings obtained here of a flexible, open-like α -subunit, and in agreement with the behavior observed for TF₁, whose noncatalytic sites exchange nucleotides rapidly [85]. In contrast, other F₁ sectors have been reported to retain nucleotides more persistently [23,86,87]. EF₁ 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 F₁ sectors. Early structural analysis led to propose that MF₁ 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, α -subunits of evolutionary distant F₁ 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 CF₁ [87,89] and MF₁ [86]. In these instances, the asymmetric environment within F₁ (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 α - and β -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 α -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* α -subunit are 3.2 and 0.8 μM^{-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 ~4. It is not clear to us to what extent the differences between the two isolated α -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 EF₁ 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 ~140, which falls in the range found in the present study for the isolated α -subunit. Consistent with this last result, an analysis of the crystal structures of MF₁, EF₁ [90] and TF₁ [91] reveal that the noncatalytic sites of the three species are very similar to each other (Fig. S2). Therefore, inter-species binding differences among α -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 α -subunits from different species.

In agreement with our calorimetric determinations, MD simulations revealed clear perturbations in the α -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 β -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 α -subunit has a binding site optimized to interact with MgATP in ground state. Conversely, the absence of the metal elicits a complete loss of β -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 α -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.bbabi.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>.

- [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 β 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 β 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 β -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 γ -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 β 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 β 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 γ -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., $\alpha\beta\gamma$ complex of F1-ATPase from the 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. Wilkmounts, 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. Kruij, 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, α -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 α 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 ϵ -subunit: deeper insight into the ϵ -inhibition mechanism, *FEBS J.* 282 (2015) 2895–2913, <http://dx.doi.org/10.1111/febs.13329>.

Bibliografía

- [1] Rikiya Watanabe and Hiroyuki Noji. Chemomechanical coupling mechanism of F(1)-ATPase: catalysis and torque generation. *FEBS letters*, 587(8):1030–5, may 2013.
- [2] Matthew W Bowler, Martin G Montgomery, Andrew G W Leslie, and John E Walker. Ground state structure of F1-ATPase from bovine heart mitochondria at 1.9 Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 282(19):14238–14242, 2007.
- [3] P D Boyer. The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annual Review of Biochemistry*, 66:717–749, 1997.
- [4] K Miwa and M Yoshida. The $\alpha\beta\beta_3$ complex, the catalytic core of F1-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(17):6484–7, sep 1989.
- [5] Takayuki Uchihashi, Ryota Iino, Toshio Ando, and Hiroyuki Noji. High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F1-ATPase. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6043):755–8, aug 2011.
- [6] J P Abrahams, A G W Leslie, R Lutter, and J E Walker. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart-mitochondria. *Nature*, 370(6491):621–628, 1994.
- [7] De Yang, Qian Chen, David M Hoover, Patricia Staley, Kenneth D Tucker, Jacek Lubkowski, and Joost J Oppenheim. Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(3):448–55, sep 2003.
- [8] Hui Z Mao and Joachim Weber. Identification of the β TP site in the x-ray structure of F1-ATPase as the high-affinity catalytic site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47):18478–83, 2007.

- [9] R Yasuda, H Noji, M Yoshida, K Kinoshita, and H Itoh. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase. *Nature*, 410(6831):898–904, apr 2001.
- [10] Thomas Bilyard, Mayumi Nakanishi-Matsui, Bradley C Steel, Teuta Pilizota, Ashley L Nord, Hiroyuki Hosokawa, Masamitsu Futai, and Richard M Berry. High-resolution single-molecule characterization of the enzymatic states in *Escherichia coli* F1-ATPase. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 368(1611):20120023, mar 2013.
- [11] Sashi Nadanaciva, Joachim Weber, Susan Wilke-Mounts, and Alan E. Senior. Importance of F1-ATPase residue α -Arg-376 for catalytic transition state stabilization. *Biochemistry*, 38(47):15493–15499, nov 1999.
- [12] George Oster and Hongyun Wang. Reverse engineering a protein: the mechanochemistry of {ATP} synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1458(2–3):482 – 510, 2000.
- [13] Joachim Weber and Alan E Senior. Catalytic mechanism of F1-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1319(1):19–58, mar 1997.
- [14] Robert K. Nakamoto, Christian J. Ketchum, , and Marwan K. Al-Shawi. Rotational coupling in the f0f1 atp synthase. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 28(1):205–234, 1999. PMID: 10410801.
- [15] K. Altendorf, W. Stalz, J. Greie, and G. Deckers-Hebestreit. Structure and function of the f(o) complex of the atp synthase from *Escherichia coli*. *Journal of Experimental Biology*, 203(1):19–28, 2000.
- [16] Roderick A Capaldi and Robert Aggeler. Mechanism of the f1f0-type {ATP} synthase, a biological rotary motor. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(3):154 – 160, 2002.
- [17] Gerardo Pérez-Hernández, Enrique García-Hernández, Rafael a. Zubillaga, and Marietta Tuena De Gómez-Puyou. Structural energetics of MgADP binding to the isolated β

- subunit of F1-ATPase from thermophilic *Bacillus PS3*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 408(2):177–183, 2002.
- [18] Bernhard Kuhle and Ralf Ficner. EIF5B employs a novel domain release mechanism to catalyze ribosomal subunit joining. *EMBO Journal*, 33(10):1177–1191, 2014.
- [19] Hendrik Sielaff, Henning Rennekamp, Siegfried Engelbrecht, and Wolfgang Junge. Functional halt positions of rotary FOF1-ATPase correlated with crystal structures. *Biophysical Journal*, 95(10):4979–87, nov 2008.
- [20] R Ian Menz, John E Walker, and Andrew 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(3):331–341, 2001.
- [21] Kei-ichi Okazaki and Shoji Takada. Structural comparison of F1-ATPase: interplay among enzyme structures, catalysis, and rotations. *Structure (London, England : 1993)*, 19(4):588–98, apr 2011.
- [22] Toshiharu Suzuki, Kazumi Tanaka, Chiaki Wakabayashi, Ei-ichiro Saita, and Masasuke Yoshida. Chemomechanical coupling of human mitochondrial F1-ATPase motor. *Nat. Chem. Biol.*, 10(11):930–936, 2014.
- [23] Neil B. Grodsky, Chao Dou, and William S. Allison. Mutations in the nucleotide binding domain of the α subunits of the f1-atpase from thermophilic bacillus ps3 that affect cross-talk between nucleotide binding sites. *Biochemistry*, 37(4):1007–1014, 1998. PMID: 9454591.
- [24] Kazuhiko Kinosita, Kengo Adachi, and Hiroyasu Itoh. Rotation of F1-ATPase: how an ATP-driven molecular machine may work. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33:245–268, 2004.
- [25] Christoph von Ballmoos, Alexander Wiedenmann, and Peter Dimroth. Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. *Annual Review of Biochemistry*, 78:649–672, 2009.
- [26] John E. Walker. The ATP synthase: The understood, the uncertain and the unknown. *Biochem. Soc. Trans.*, 41:1–16, 2013.

- [27] Wolfgang Junge and Nathan Nelson. ATP Synthase. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1):631–57, 2015.
- [28] A N Malyan. Noncatalytic nucleotide binding sites: properties and mechanism of involvement in ATP synthase activity regulation. *Biochemistry (Moscow)*, 78(13):1512–23, dec 2013.
- [29] Pierre Falson, André Goffeau, Marc Boutry, and Jean Michel Jault. Structural insight into the cooperativity between catalytic and noncatalytic sites of F1-ATPase, 2004.
- [30] Wayne D. Frasch. Vanadyl as a probe of the function of the f1-atpase-mg²⁺ cofactor. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 32(5):539–546, 2000.
- [31] M B Murataliev. Adenine nucleotide binding at a noncatalytic site of mitochondrial F1-ATPase accelerates a Mg(2+)- and ADP-dependent inactivation during ATP hydrolysis. *Biochemistry*, 31(51):12885–12892, 1992.
- [32] J M Jault and 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(3):1558–1566, jan 1993.
- [33] T. Matsui, E. Muneyuki, M. Honda, W. S. Allison, C. Dou, and M. Yoshida. Catalytic activity of the $\alpha 3\beta 3\gamma$ complex of F1-ATPase without noncatalytic nucleotide binding site. *Journal of Biological Chemistry*, 272(13):8215–8221, mar 1997.
- [34] Toru Ishikawa and Yasuyuki 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(9):e107197, jan 2014.
- [35] Shou Furuike, Mohammad Delawar Hossain, Yasushi Maki, Kengo Adachi, Toshiharu Suzuki, Ayako Kohori, Hiroyasu Itoh, Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinoshita. Axle-less F1-ATPase rotates in the correct direction. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5865):955–8, feb 2008.
- [36] Mohammad Delawar Hossain, Shou Furuike, Yasushi Maki, Kengo Adachi, Toshiharu Suzuki, Ayako Kohori, Hiroyasu Itoh, Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinoshita. Neither

helix in the coiled coil region of the axle of F1-ATPase plays a significant role in torque production. *Biophysical Journal*, 95(10):4837–44, nov 2008.

- [37] Yuko Ito and Mitsunori Ikeguchi. Molecular dynamics simulations of the isolated β subunit of F1-ATPase. *Chemical Physics Letters*, 490(1-3):80–83, 2010.
- [38] Yuko Ito and Mitsunori Ikeguchi. Molecular dynamics simulations of F1-ATPase. In Keli Han, Xin Zhang, and Mingjun Yang, editors, *Protein Conformational Dynamics, Advances in Experimental Medicine and Biology*, volume 805, chapter 17, pages 67–85. Springer International Publishing, Switzerland, 2014.
- [39] Yuko Ito and Mitsunori Ikeguchi. Mechanism of the $\alpha\beta$ conformational change in F1-ATPase after ATP hydrolysis: free-energy simulations. *Biophysical journal*, 108(1):85–97, 2015.
- [40] Peiming Wang, Reed M Izatt, John L Oscarson, and Sue E Gillespie. ^1H NMR Study of Protonation and Mg(II) Coordination of AMP, ADP, and ATP at 25, 50, and 70 °C. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(22):9556–9560, 1996.
- [41] A.E. Senior, S. Nadanaciva, and J. Weber. Rate acceleration of atp hydrolysis by f(1)f(o)-atp synthase. *Journal of Experimental Biology*, 203(1):35–40, 2000.
- [42] Joachim Weber, Sean T. Hammond, Susan Wilke-Mounts, and Alan E. Senior. Mg $^{2+}$ coordination in catalytic sites of f1-atpase. *Biochemistry*, 37(2):608–614, 1998. PMID: 9425083.
- [43] Matthew W Bowler, Martin G Montgomery, Andrew G W Leslie, and John E Walker. How azide inhibits ATP hydrolysis by the F-ATPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(23):8646–8649, 2006.
- [44] David A. Case, J. T. Berryman, R. M. Betz, D. S. Cerutti, T. E. Cheatham, III, T. A. Darden, R. E. Duke, T. J. Giese, H. Gohlke, A. W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, P. Li, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K. M. Mer, D. M. York, and P. A. Kollman. *AMBER 2014*. University of California, San Francisco, 2014.
- [45] Olof Allnér, Lennart Nilsson, and Alessandra Villa. Magnesium Ion-Water Coordination and Exchange in Biomolecular Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(4):1493–502, apr 2012.

- [46] Kristin L Meagher, Luke T Redman, and Heather A Carlson. Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field. *Journal of Computational Chemistry*, 24(9):1016–25, jul 2003.
- [47] Daniel Alvarez-Garcia and Xavier Barril. Molecular simulations with solvent competition quantify water displaceability and provide accurate interaction maps of protein binding sites. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(20):8530–8539, 2014.
- [48] W Humphrey, A Dalke, and K Schulten. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1):33–38, feb 1996.
- [49] Daniel R. Roe and Thomas E. Cheatham. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 9(7):3084–3095, 2013.
- [50] Naveen Michaud-Agrawal, Elizabeth J Denning, Thomas B Woolf, and Oliver Beckstein. MDAnalysis: a toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 32(10):2319–27, jul 2011.
- [51] Guillermo Salcedo, Patricia Cano-Sánchez, Marietta Tuena De Gómez-Puyou, Adrián Velázquez-Campoy, and Enrique García-Hernández. Isolated noncatalytic and catalytic subunits of F1-ATPase exhibit similar, albeit not identical, energetic strategies for recognizing adenosine nucleotides. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(1):44–50, 2014.
- [52] Alan E. Senior. ATP Synthase: Motoring to the Finish Line. *Cell*, 130(2):220–221, 2007.
- [53] Nancy O. Pulido, Eneas A. Chavelas, Francisco Turner, and Enrique García-Hernández. Current applications of isothermal titration calorimetry to the study of protein complexes. In Enrique García-Hernández and D. Alejandro Fernández-Velasco, editors, *Advances in Protein Physical Chemistry*, pages 115–138. Transworld Research Network, India, 2008.
- [54] Nancy O. Pulido, Guillermo Salcedo, Gerardo Pérez-Hernández, Concepción José-Núñez, Adrián Velázquez-Campoy, and Enrique García-Hernández. Energetic effects of magne-

sium in the recognition of adenosine nucleotides by the F1-ATPase β subunit. *Biochemistry*, 49(25):5258–5268, 2010.

- [55] A. K. Rappe, C. J. Casewit, K. S. Colwell, W. A. Goddard, and W. M. Skiff. Uff, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*, 114(25):10024–10035, 1992.
- [56] Evangelos A. Coutsiias, Chaok Seok, and Ken A. Dill. Using quaternions to calculate rmsd. *Journal of Computational Chemistry*, 25(15):1849–1857, 2004.
- [57] Jianpeng Ma, Terence C Flynn, Qiang Cui, Andrew G W Leslie, John E Walker, and Martin Karplus. A dynamic analysis of the rotation mechanism for conformational change in F1-ATPase. *Structure*, 10(02):921–931, 2002.
- [58] K P Murphy and E Freire. Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 43:313–61, jan 1992.
- [59] Ninad V Prabhu and Kim A Sharp. Heat capacity in proteins. *Annual Review of Physical Chemistry*, 56:521–48, jan 2005.
- [60] S Vega, O Abian, and A Velazquez-Campoy. On the link between conformational changes, ligand binding and heat capacity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1860:868–878, oct 2016.
- [61] Hiromasa Yagi, Nobumoto Kajiwara, Tomoyuki Iwabuchi, Kenya Izumi, Masasuke Yoshida, and Hideo Akutsu. Stepwise propagation of the ATP-induced conformational change of the F 1-ATPase β subunit revealed by NMR. *Journal of Biological Chemistry*, 284(4):2374–2382, 2009.
- [62] Eneas A Chavelas and Enrique García-Hernández. Heat capacity changes in carbohydrates and protein-carbohydrate complexes. *The Biochemical Journal*, 420(2):239–247, 2009.
- [63] Lee A Freiburger, Oliver M Baettig, Tara Sprules, Albert M Berghuis, Karine Auclair, and Anthony K Mittermaier. Competing allosteric mechanisms modulate substrate binding in a dimeric enzyme. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(3):288–94, mar 2011.

- [64] Takashi Yoshidome, Yuko Ito, Mitsunori Ikeguchi, and Masahiro Kinoshita. Rotation mechanism of F1-ATPase: crucial importance of the water entropy effect. *Journal of the American Chemical Society*, 133(11):4030–9, mar 2011.
- [65] Qiang Cui, Guohui Li, Jianpeng Ma, and Martin Karplus. A normal mode analysis of structural plasticity in the biomolecular motor F1-ATPase. *Journal of Molecular Biology*, 340(2):345–372, 2004.
- [66] Ulrich Kleinekathöfer, Barry Isralewitz, Markus Dittrich, and Klaus Schulten. Domain motion of individual F1-ATPase β -subunits during unbiased molecular dynamics simulations. *Journal of Physical Chemistry A*, 115(25):7267–7274, 2011.
- [67] Alan E Senior, Alma Muharemagić, and Susan Wilke-Mounts. Assembly of the stator in *Escherichia coli* ATP synthase. Complexation of α subunit with other F1 subunits is prerequisite for δ subunit binding to the N-terminal region of α . *Biochemistry*, 45:15893–15902, 2006.
- [68] David M Rees, Martin G Montgomery, Andrew G W Leslie, and John E Walker. Structural evidence of a new catalytic intermediate in the pathway of ATP hydrolysis by F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(28):11139–43, jul 2012.
- [69] Johann P. Gogarten and Lincoln Taiz. Evolution of proton pumping atpases: Rooting the tree of life. *Photosynthesis Research*, 33:137–146, 1992.
- [70] M Karplus and J Kuriyan. Molecular dynamics and protein function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(19):6679–6685, 2005.