



Universidad Nacional Autónoma
de México

Facultad de Ciencias

Efectos energéticos del magnesio en
el reconocimiento de ADP por la
subunidad β de la ATP-sintasa de
Bacillus PS3.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

GUILLERMO SALCEDO BARRIENTOS



Facultad de Ciencias
UNAM

DIRECTOR DE TESIS: DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ

2008



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.

| |
|---|
| Datos de alumno. Salcedo Barrientos Guillermo 52114205 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 30012268-0 |
| Datos del tutor. García Hernández Enrique |
| Datos del sinodal 1 Dr. Alejandro Sosa Peinado |
| Datos del sinodal 2 Dra. Marieta Tuena Sangri |
| Datos del sinodal 3 Dr. Edgar Vázquez Contreras |
| Datos del sinodal 4 M en IBB. Claudia Segal Kischinevzky |

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Enrique García Hernández en el departamento de Bioquímica del Instituto de Química de la UNAM, en colaboración con los laboratorios 104 y 105 oriente del Instituto de Fisiología celular, UNAM; laboratorio de Fisicoquímica de la Facultad de Química UNAM y Laboratorio de Fisicoquímica de Proteínas de la Facultad de Medicina UNAM. Agradezco el apoyo otorgado por los proyectos de CONACyT (47097, 41328) y UNAM PAPIIT (IN217106-3)

Agradecimientos

A mi padre, que aunque pasamos momentos malos, me ayudo a salir de ellos. Espero que los que puedan surgir en un futuro (por que seguro seguiremos pasando, por la simple razón de ser parte de la vida), sean mínimos y los superemos. Muchas gracias por ayudarme a llegar hasta aquí, aunque falta mucho por caminar. Te quiero mucho y espero ayudarte a ti, de la misma forma que me ayudaste a mí, GRACIAS.

A mi familia, aunque tenemos demasiadas diferencias, son parte de lo que soy ahora.

A la M. en Ciencias Bioquímicas Nancy Olivia Pulido Mayoral, por su apoyo en el desarrollo de la presente tesis, tanto en la parte técnica, como en la teórica.

A la Q. F. B. María Concepción José Núñez, por su invaluable ayuda en la purificación de la subunidad β de la ATP-sintasa de *Bacillus PS3* y su paciencia para enseñarme el uso de equipos.

Sin su tiempo no habría logrado este paso tan importante (Nany y Cony... gracias)

A la Dra. Marietta Tuena de Gómez Puyou y al Dr. Armando Gómez Puyou por permitirme participar en este proyecto y aunque me gustaría haber aportado tanto como ustedes lo hicieron, me quede con mucho. Por permitirme trabajar en su grandioso laboratorio, gastar algunos reactivos y lo más importante el poder conocer sobre sus proyectos a futuro y las maravillosas personas que se encuentran a su alrededor. Gracias por ayudarme a abrir la mirada hacia el futuro y conocer desde otra perspectiva la ciencia.

Al doctor Enrique García Hernández (Kiki), gracias a tu apoyo logre terminar este proyecto y conocer sobre el mundo de las proteínas, aunque aun me falta mucho por comprender ese grandioso universo que son las proteínas.

A los doctores del taller “de los genes a la función de las proteínas” (Mario Calcagno, Alejandro Fernández, Alejandro Sosa, Georgina Garza y Edgar Vázquez), su ayuda y su personalidad, dejaron una marca en mi persona, gracias.

A I laboratorio de Físicoquímica de la Facultad de Química, gracias por dejarme usar el calorímetro sin cobro alguno.

A los miembros del KiKixKlan (Eneas, Gabriel, Nancy, Martiniano,... y ahora Carmen)

A I laboratorio de Bioquímica II del Instituto de Química de la UNAM.

A los compañeros de los laboratorios 104 y 105 oriente del Instituto de Fisiología Celular (Beatriz Aguirre, Sra. Guadalupe Franco y Paulette), gracias a su calidez junto a la de Cony me permitió sentirme como en casa.

A todas aquellas chicas lindas que me permitieron soñar un poco.

A mis compañeros y amigos, con los que pase momentos de risa y de tristeza.

Aquéllos profesor que me apoyaron para salir adelante, desde el grado que fuera hasta este momento.

Por todos aquellos que aunque no están de forma individual, me ayudaron a darle forma a la persona que soy, con muchos defectos, pero alegre.

Indice General

| | |
|--|-----|
| Indice de figuras | ii |
| Índice de Tablas..... | iii |
| Resumen..... | iv |
| Capítulo I..... | 1 |
| Introducción..... | 1 |
| 1.1 ATP..... | 1 |
| 1.2 ATP-sintasa (estructura, función y mecanismo catalítico)..... | 2 |
| 1.2.1 Sector transmembranal (F0)..... | 3 |
| 1.2.2 Sector hidrosoluble (F1)..... | 5 |
| 1.2.3 Acoplamiento y mecanismo..... | 8 |
| Capítulo II..... | 12 |
| Antecedentes del estudio y planteamiento del problema..... | 12 |
| 2.1 Características del magnesio, interacción con nucleótidos di y trifosfato..... | 12 |
| 2.2 Magnesio y ATP-sintasa..... | 14 |
| 2.3 Calorimetría e interacción proteína-ligando..... | 17 |
| Capítulo III..... | 26 |
| Objetivos..... | 26 |
| 3.1 General..... | 26 |
| 3.2 Particulares..... | 26 |
| Capítulo IV..... | 27 |
| Método..... | 27 |
| 4.1 Purificación T β | 27 |
| 4.2 Calorimetría de Titulación Isotérmica (CTI) | 29 |
| 4.3 Determinación de la constante de unión fluorométrica..... | 29 |
| Capítulo V..... | 31 |
| Resultados y Discusión..... | 31 |
| 5.1 Calorimetría de formación del complejo ADP-Mg..... | 31 |
| 5.2 Calorimetría subunidad T β (T β -ADP•Mg, T β -ADP) | 35 |
| 5.3 Fluorescencia de la unión T β -ADP y T β - ADP•Mg..... | 36 |
| 5.4 Parámetros termodinámicos para la unión T β - ADP•Mg por modelos de área superficial..... | 37 |
| 5.5 Papel energético del Mg ²⁺ | 38 |
| Capítulo VI..... | 40 |
| Conclusiones..... | 40 |
| Capítulo VII..... | 41 |
| Perspectivas..... | 41 |
| Apendice A..... | 42 |
| Apendice B..... | 45 |
| Fluorescencia..... | 45 |
| Apendice C..... | 48 |
| <i>Bacillus termophilus</i> PS3..... | 48 |
| Abreviaciones..... | 49 |
| Bibliografía..... | 50 |

Resumen

La participación de los metales en la catálisis de las proteínas se ha observado en diversos casos. La amplia gama de funciones que presentan los diferentes metales en las metaloproteínas ha despertado el interés en muchos investigadores, quienes han incrementado la información de este tema tan importante para el conocimiento de la vida. Las diferentes propiedades que presenta cada metal los convierte en piezas fundamentales en las funciones de las proteínas.

La importancia del magnesio se reconoce ya sea porque es el octavo elemento más abundante de la tierra o por ser el catión divalente más abundante dentro de las células (Maguire y Cowan, 2002). Su capacidad de formar una estructura octaédrica en solución lo coloca en un lugar importante, en el metabolismo de los nucleótidos de fosfato, en particular de la porción en la que se encuentran los fosfatos. Energéticamente, el adenosín trifosfato (ATP) es una molécula fundamental en la realización de muchas reacciones ya que la hidrólisis del enlace fosfo-anhidro entre los fosfatos 2 (β) y 3 (γ), libera $7.5 \text{ kcal mol}^{-1}$, energía utilizada para el desplazamiento de reacciones con una barrera de energía alta.

Siendo la ATP-sintasa la enzima encargada de producir el ATP en la fosforilación oxidativa, su estudio puede permitirnos conocer el papel del Mg^{2+} en la enzima; y especialmente en la subunidad β catalítica, que requiere la formación de los complejos ADP-Mg o ATP-Mg para realizar sus funciones.

Se observó una diferencia energética obteniendo mediante calorimetría de titulación isotérmica (CTI) los parámetros termodinámicos para la unión de ADP en presencia o ausencia de magnesio a la subunidad β de la ATP-sintasa de *Bacillus PS3* (termófilo, Apéndice C) y para la formación del complejo ADP-Mg. El cambio en los valores de entalpía (ΔH), entropía (ΔS), energía libre (ΔG) y la constante de unión (K), para la fijación del ADP en la subunidad β en presencia o ausencia del metal, muestran que la presencia del magnesio resulta en un mejor reconocimiento del ligando, con valores más favorables de entalpía y una constante de asociación más grande. Estructuralmente, se intentó observar algún cambio a partir de la fluorescencia de los residuos de tirosina de la subunidad β , pero no se logró observar una diferencia que permitiera dilucidar el papel estructural del metal y su relación con la energética.

La función energética del magnesio implica una mejor complementariedad entre el sitio dentro de la subunidad β y el ligando, con un efecto directo sobre el reconocimiento de los

fosfatos, fenómeno observado con el $\Delta[\Delta H]$ de unión favorable y el aumento en la constante de asociación. La contribución energética del metal solo en la reacción ($T\beta \cdot ADP + Mg^{2+}$), tiene un efecto entrópico, que dirige la reacción a un ΔG favorable ($-4.89 \text{ kcal mol}^{-1}$). En la comparación con el reconocimiento de $ATP/ATP \cdot Mg^{2+}$, se observa una contribución tanto entálpica como entrópica, teniendo el reconocimiento de los tres fosfatos un cambio más favorable en presencia del metal.

Capítulo I

Introducción

1.1 ATP

La energía liberada en la reacción de hidrólisis del ATP, es una de las fuentes de energía de mayor uso en el metabolismo celular. El ΔG de hidrólisis del enlace fosfoanhidro entre los fosfatos β y γ es igual a $-7.5 \text{ kcal mol}^{-1}$, a un pH de 7. La energía de activación es relativamente alta (cinéticamente estable), por lo que una ruptura rápida solo se lleva a cabo bajo catálisis enzimática, Figura 1. La función del ATP como molécula portadora de energía facilita el flujo de energía de una gran variedad de reacciones catabólicas que requieren de energía (Lehninger, 2001; Penefsky, 1979).

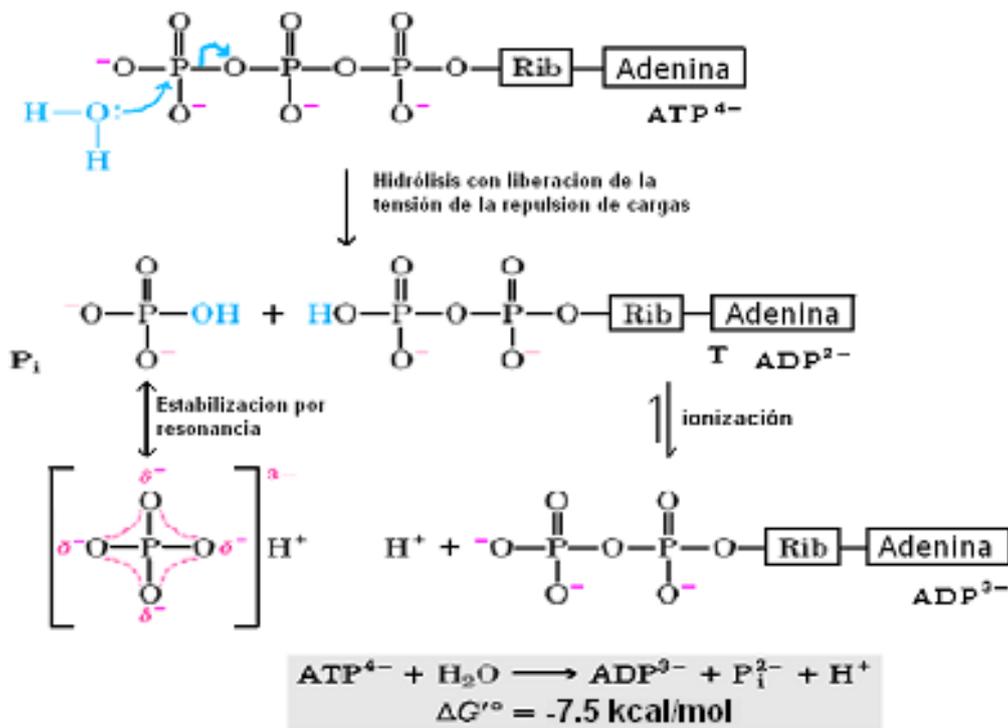


Figura 1. Hidrólisis del ATP

La energía libre liberada durante los procesos metabólicos es conservada a partir de la síntesis de ATP por medio de la unión entre ADP y Pi. Esta energía recaudada en forma de ATP durante la fosforilación oxidativa y la fotorrespiración es una de las más utilizadas durante el anabolismo (biosíntesis). De ahí la importancia de la ATP-sintasa. En la cadena transportadora de electrones, diversos complejos de la membrana de

mitocondrias, cloroplastos y bacterias generan un gradiente de protones, que acoplado a la sintasa de ATP, proveen de la energía necesaria para formar el enlace fosfoanhidro entre el fosfato β del ADP y el fosfato inorgánico (Pi) (Voet, 1995; Shirakihara, *et al.*, 1997; Senior, *et al.*, 2002).

1.2 ATP-sintasa (estructura, función y mecanismo catalítico)

La ATP-sintasa es una de las enzimas más ubicuas en los seres vivos y muestra en promedio, un 60% de los aminoácidos de la subunidad catalítica conservados (Yoshida, M. *et al* 2001). Esta es una proteína compleja de aproximadamente 500 kDa en *Bacillus PS3* y de 530 en *Escherichia coli*. Su estructura en bacterias está constituida por 8 subunidades diferentes, y que dependiendo de la especie puede cambiar el número de subunidades. Se ha dividido en dos sectores: F_0 $a_b_2c_{9-12}$ (sector transmembranal) y F_1 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ (sector hidrosoluble) (Nakamoto, *et al.*, 1999). F_1 también es conocido como F_1 -ATPasa, por su capacidad de hidrolizar ATP en ausencia de F_0 .

El estudio molecular de esta enzima se inició en 1960, cuando Efraim Racker, junto con sus colegas reportaron el aislamiento de un factor soluble de la mitocondria bovina. En 1961, Peter Mitchell propuso la hipótesis quimiosmótica, que postula el potencial electroquímico de protones ($\Delta\psi$) como un estado intermediario de alta energía, que conecta el potencial de membrana con la síntesis de ATP en F_1F_0 . Posteriormente, se observó que esta hipótesis podía ser real al comprobarse la formación de ATP, en la ausencia de luz en cloroplastos, mediante un experimento de transición ácido-base. Esto llevó a tratar de entender cómo la energía almacenada en el flujo de protones podría utilizarse en la síntesis de ATP. Con base en la cinética de catálisis enzimática, Boyer propuso el mecanismo de cambio de unión, observando el intercambio de ^{18}O entre el H_2O y Pi / ATP, en sitios alternantes (Yoshida, 2001).

La separación de los sectores F_1F_0 (Figura 2), es uno de los métodos utilizados para comprender el funcionamiento de la enzima. Al colocar la enzima en un medio con baja fuerza iónica, es posible separar la porción transmembranal (involucra la translocación de protones) y la porción soluble (cataliza la síntesis o hidrólisis del ATP). Esto ha permitido conocer más a fondo la contribución de cada sector en el funcionamiento de la enzima, que involucra interacciones específicas y el cambio de conformación entre las subunidades (Boyer, 1997).

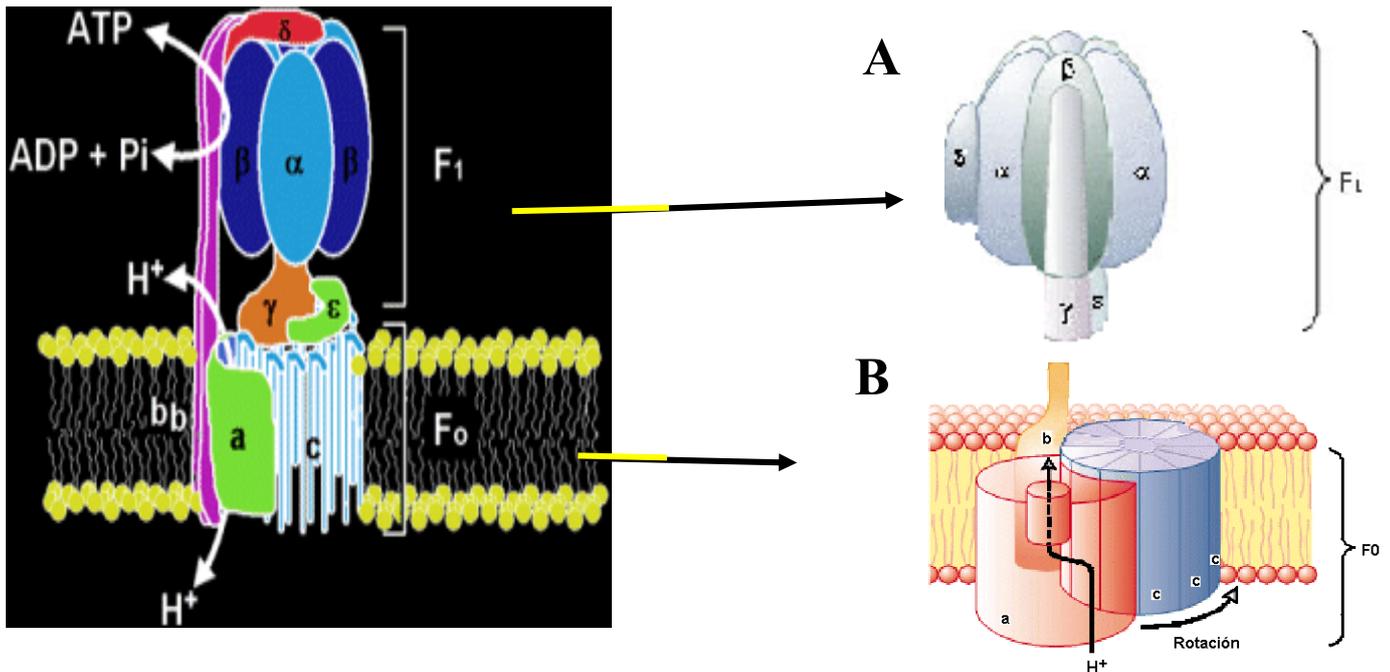


Figura 2. Esquema de la ATP-sintasa de bacteria: A, sector hidrosoluble; B, sector transmembranal.

1.2.1 Sector Transmembranal (F₀)

La estructura 3D completa de F₀ no ha sido resuelta como complejo, pero existen estructuras de las subunidades aisladas, obtenidas por difracción de rayos X y resonancia magnética nuclear. Además, diversos estudios por varias metodologías genéticas y bioquímicas han llevado a identificar aminoácidos y regiones críticas en el funcionamiento del complejo. Su estructura general está dada por la posición del anillo oligomérico de subunidades c, flanqueado por las subunidades a y b₂ que se encuentran fuera del anillo (Figura 2B).

Las subunidades c (estequiometría 10-14, dependiendo de la especie) se encuentran plegadas como 2 hélices- α transmembranales conectadas por un asa polar. En el ensamblaje oligomérico, la hélice N-terminal está metida con mayor rigidez en el interior del anillo y la hélice C-terminal está débilmente empacada en la parte exterior del anillo. La traslocación de protones a partir del potencial electroquímico se lleva a cabo por la protonación de un grupo carboxilo dentro de la subunidad c (D61), que se localiza cerca del centro de la región hidrofóbica de la porción C-terminal y actúa como puente en el paso de los protones (Weber y Senior, 1997; Papa, *et al.*, 1999; Oster y Wang, 2000; Boyer, 1997).

El mecanismo general para el paso del protón a través de F_0 involucra la participación de la subunidad a , que forma parte del estator. Se ha logrado establecer una topología estructural para esta subunidad, de la región C-terminal con la presencia de 4 hélices transmembranales, una región polar cerca del residuo α K66 y el extremo C-terminal en el citoplasma. Estas regiones constituyen dos terceras partes de la subunidad. Sin embargo, la estructura de la región N-terminal no se ha logrado determinar; algunos modelos consideran la presencia de una hélice, otros de dos hélices extra dentro de esta región. En este mecanismo, se sugiere que el carboxilo desprotonado de la subunidad c (c D61) une al protón de un lado de la membrana formando el complejo protón-carboxilato, originando un cambio conformacional que reorienta al residuo protonado. Posteriormente, la cadena lateral de la arginina α R210 desplaza al protón formando un puente salino con el carboxilo de c D61, permitiendo su liberación al lado opuesto de la membrana. También se cree que pueden participar los residuos α Glu219 y α H245. Sin embargo, el mecanismo preciso aún no está determinado y aunque la presencia de R210 no es necesaria en el transporte pasivo de iones cuando F_1 es removido, es un aminoácido altamente conservado dentro de la subunidad y cualquier mutación termina con la traslocación de protones y síntesis de ATP (Altendorf, *et al.*, 2000; Nakamoto, *et al.*, 1999; Weber y Senior, 1997).

Por otra parte, las subunidades b son un complejo dimérico que posee un segmento hidrofóbico de alrededor de 30 aminoácidos en la región N-terminal y se ha predicho que forma una hélice transmembranal. El 80% restante de la molécula es hidrofílica, de aproximadamente 125 aminoácidos, con una zona hidrofóbica en la región b V124-A132 de la parte C-terminal. Por dicroísmo circular (DC) se ha determinado una composición de 80% hélice- α . Estudios diversos como reconstitución de la subunidad, fotomarcación intramembranal, proteólisis limitada, unión a anticuerpos y estudios sobre mutagénesis, muestran que la hélice transmembranal N-terminal interactúa con las subunidades a y c . Además, tiene una función de anclaje a la membrana. El funcionamiento del segmento extramembranal hidrofílico C-terminal es requerido para la unión de F_1 . Mediante mutagénesis dirigida se estableció que la región b 124-131 está involucrada en la formación del homodímero. La función de esta subunidad podría estar ligada al anclaje del sector F_1 y al acoplamiento entre el paso de protones a través de F_0 y sus efectos en F_1 .

1.2.2 Sector hidrosoluble (F₁)

Los estudios cinéticos y estructurales de este sector proveen de información valiosa sobre algunos de los factores involucrados en el reconocimiento de los nucleótidos, como el papel de los residuos presentes en el sitio de unión en presencia de los ligandos, análogos e inhibidores. La integración de estos datos de diferente origen permite relacionar los datos cinéticos con los efectos estructurales presentes durante el reconocimiento y entender el posible efecto de muchas de mutaciones dentro del sitio de unión (Asp242, Arg182, Lys155 en *E. coli*), así como identificar residuos claves en el funcionamiento de la enzima y el proceso de reconocimiento. El avance en la obtención de cristales con mayor resolución, como campo clave en la obtención de datos estructurales, permitió la obtención en primera instancia de la estructura de este sector de mitocondria de corazón de bovino en 1994, con una resolución de 2.8Å (Abrahams, J. *et al* 1994); probablemente corresponde a la estructura inhibida, ya que no se encontró fosfato unido en la subunidad β que contenía ADP. Posteriormente, se obtuvo la de *Bacillus PS3*, con una resolución de 3.2Å (Shirakihara, *et al.*, 1997); la de hígado de rata con 2.8Å de resolución (Bianchet, M. *et al.*, 1998) y cloroplasto con 3.2Å (Groth, *et al.*, 2001). En el caso del cristal de *Bacillus*, el cual se obtuvo sin sustratos o inhibidores presentes, existe una simetría entre subunidades, a diferencia de la asimetría presentada en el cristal de bovino, en donde las subunidades β se observan con 3 conformaciones diferentes.

Dentro de la estructura F₁ de varias especies, el núcleo catalítico de la enzima está siempre formado por el cilindro hexamérico de 3 subunidades α y 3 subunidades β (catalíticas) intercaladas, de 55 y 50 kDa respectivamente y con la subunidad γ (32 kDa) en la parte interior del hexámero. Las subunidades α y β tienen una estructura dividida en tres dominios: un barril- β N-terminal más alejado de la membrana, un dominio central de unión al nucleótido y un dominio helicoidal C-terminal adyacente a la membrana. Los sitios catalíticos se localizan en las interfaces de α/β vecinas. Aunque los residuos involucrados en la catálisis pertenecen predominantemente a la subunidad β , la participación de α es necesaria para la catálisis, ayudando a estabilizar la carga negativa que se genera en el fosfato terminal mediante un estado de transición pentacoordinado (Abrahams, *et al.*, 1994).

El dominio N-terminal (residuos 1-82) en la subunidad β de *Bacillus PS3* (T β) Figura 3, consiste de 6 hebras que forman un barril- β , en comparación con la subunidad β de

mitocondria (M β), existe una inserción de 7 residuos en la región de β 36-42, que aumenta el contacto con el barril- β de la subunidad α vecina. En la interfase entre las subunidades α y β , en donde se encuentra esta inserción, se forma un puente de hidrógeno entre β Asn40 y α Arg90, además de interacciones de van der Waals que forman β Asp38- α Ser21 y β Glu41- α Met48. Esta región puede tener una función en la estabilidad térmica del complejo F₁ relacionada con las condiciones en las que habita este organismo.

El dominio de unión a nucleótido (T β 83-354) consiste de una hoja- β compuesta por 9 hebras, rodeadas por 8 hélices- α (9 en M β) y una lámina- β antiparalela de 2 hebras pequeñas. La conformación de las tres subunidades β de *Bacillus PS3* es simétrica y similar a la conformación vacía (M β _E) observada en mitocondria, y se ha descrito como una conformación abierta debido a que el residuo T β Glu190 (M β Glu188) se encuentra lejos del ion de sulfato presente en la cristalización, que podría representar la posición del fosfato γ . Para F₁ de mitocondria, la estructura asimétrica observada, con tres conformaciones diferentes en la subunidad β , depende del nucleótido contenido, Mg•AMP-PNP (sitio β _{TP}), Mg•ADP (sitio β _{DP}) y sin nucleótido (β _E). En la conformación β _{TP}, se propone la participación M β Glu188 como activador de una molécula de agua para que pueda llevar a cabo un ataque nucleofílico sobre el fosfato terminal. En este dominio se encuentra el asa-P (asa de unión a fosfato; T β 158-165) presente en una gran cantidad de proteínas que reconocen el motivo di-tri-fosfato. Este contiene una secuencia muy conservada (GGAGVGKT). Existen otros residuos implicados en la catálisis, como la T β Arg191 (E β Arg182 y M β Arg189), que pudiera actuar mediante una molécula de agua en la interacción con el fosfato β ó γ dependiendo del nucleótido, T β Asp252 (M β Asp256 y E β 242), implicado en la unión del ion Mg²⁺ y T β Tyr341 (M β Tyr345) que se encuentra localizado en el interior del sitio y contribuye dentro de la bolsa de unión a la adenina. En esta bolsa de unión hidrofóbica también se encuentran involucrados los residuos T β Val416, T β Ala417 y T β Val166 (Bianchet, A. *et al.*, 1998).

En el dominio C-terminal que se encuentra más cercano a la membrana (T β 355-470), se observa un racimo de 6 hélices- α , que está muy cercano al asa-P. En éste se localiza la secuencia DELSEED, importante tanto en el acoplamiento de F₀-F₁, como en la cooperatividad entre sitios catalíticos, mediante interacciones con otras subunidades (Figura 3).

El funcionamiento rotacional de la enzima ha llevado a la subdivisión de las subunidades de acuerdo a su papel en el mecanismo rotatorio. En donde el conjunto de subunidades α_3/β_3 , b_2 , a y δ , forman el estator y las subunidades γ , ϵ y c constituyen el rotor.

Rodeada por el hexámero α/β se encuentra la subunidad γ (32 kDa) formada por una hélice- α central de 90 Å de largo constituida por los residuos 209-272 de la porción C-terminal, que emerge por la parte superior. La mitad inferior de esta hélice forma una espiral izquierda con una segunda hélice- α compuesta por los aminoácidos γ 1-45. Esta estructura sobresale alrededor de 30 Å de la parte inferior del eje. El tercer segmento de la subunidad (73-90) forma una pequeña hélice- α y un asa en la región del tallo. Se ha demostrado el funcionamiento de γ como eje en la rotación del hexámero α/β . Además, la presencia de esta subunidad es necesaria para que se lleven a cabo interacciones cooperativas entre las subunidades (Nakamoto, *et al.*, 1999; Oster, y Wang, 2000)

La subunidad ε de *E. coli* es homóloga a la subunidad ε de termófilo. Con un tamaño de 15 kDa, ε consiste de dos dominios: el dominio N-terminal o barril- β de 10 hebras (ε 3-86) formando un sándwich de 2 láminas de 5 hebras y el dominio C-terminal con dos hélices- α (ε 91-138) formando una hélice-vuelta-hélice. El funcionamiento de ε es el acoplar los cambios conformacionales ocurridos tanto en el paso de protones como en la unión de ligandos en los sitios catalíticos, así como la regulación por reconocimiento de ATP (Shigeyuki, *et al.*, 2007). La conformación que presentan las dos hélices del extremo carboxilo-terminal ha sugerido un papel importante en el papel de ε como inhibidor selectivo de la hidrólisis de ATP y regulador de la dirección en la catálisis rotacional (Nakamoto, *et al.*, 1999; Weber y Senior, 1997).

Por NMR se ha resuelto la mayor parte de la estructura 3D de la subunidad δ (1-134). La principal característica es el racimo de 6 hélices- α en el dominio N-terminal, que interactúa con F_1 vía el dominio N-terminal de la subunidad α . El dominio C-terminal se encuentra menos definido y se une al extremo C-terminal del dímero de subunidades b. Esta parte es requerida en lo que se denomina como un segundo eje de anclaje y unión entre las partes de F_1 y F_0 , actuando como estator. En este punto se cree que participan los residuos α C2, α C90, δ C140 y bC156, formando puentes disulfuro (Andrew *et al.*, 1998).

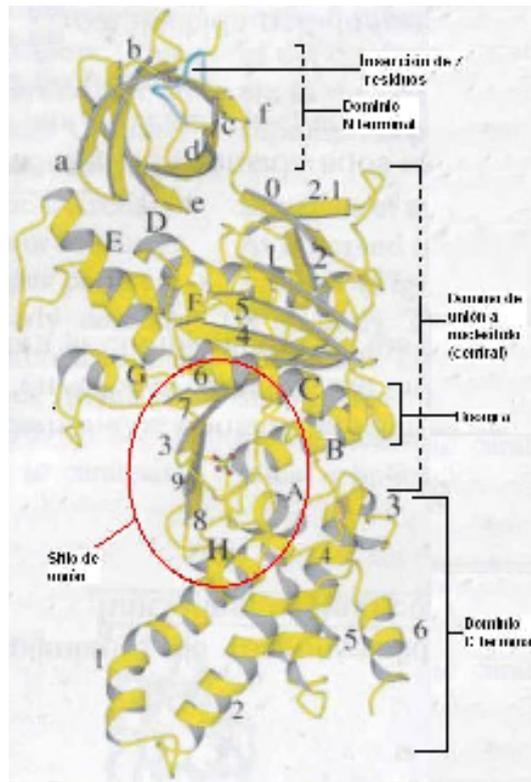


Figura 3. Subunidad β de la ATP-sintasa de *Bacillus PS3*

1.2.3 Acoplamiento y mecanismo

El acoplamiento entre las subunidades de F_0 y F_1 , que a partir de cambios conformacionales conectan la traslocación de protones con la formación de ATP, ha sido otro de los puntos de gran interés. Muchos estudios basados en modificaciones químicas, mutagénesis dirigida y reconocimiento de anticuerpos, han tenido la finalidad de descifrar este fenómeno. Además, la posición de las subunidades dentro del complejo ha sido clave para proponer un posible mecanismo que explique el acoplamiento, igual que la función de algunos desacoplantes como dinitrofenol y FCCP e inhibidores como DCCD, oligomicina y azida de sodio.

Se ha propuesto una secuencia de cambios conformacionales inducidos por el gradiente de protones. Esta es iniciada por la unión del protón al carboxilo de la subunidad c , que produce un cambio de conformación a su alrededor, transmitido a la región del asa polar de c . En esta asa se localizan los residuos R41, Q42, P43 y D44, identificados como posibles transmisores del acoplamiento entre el transporte de H^+ en F_0 y la síntesis de ATP en F_1 , al interactuar con ϵ y γ . Las mutaciones sobre esta región presentan un fenotipo desacoplado. De manera similar, la interacción de cD61 con DCCD provoca un cambio conformacional de cD44, inhibiendo el transporte de H^+ . También se ha observado la

participación de esta región en las interacciones con ε (E31) y γ (Y205).

Estas interacciones probablemente relocalicen las subunidades del eje (γ , ε) provocando cambios conformacionales en los sitios catalíticos y un cambio en la velocidad de disociación para el ATP, disminuyendo alrededor de 7 órdenes de magnitud la afinidad por este ($K_d \approx 0.1\text{mM}$ para Mg-ATP en presencia del gradiente) en la síntesis de ATP.

Las interacciones entre subunidades del sector F_1 que generan cambios conformacionales son múltiples e involucran a todas las subunidades. Una región muy importante que se forma entre la interacción de estas subunidades es la interfase catalítica, en donde la mayoría de los residuos catalíticos están presentes en β , con una contribución de $T\alpha\text{Thr338}$ y $T\alpha\text{Arg365}$, que actúan en el estado de transición pentacoordinado. Otras regiones que participan en el acoplamiento son las llamadas “zonas de anclaje” entre β y γ . La primera de estas zonas (puerta 1), forma puentes de hidrógeno entre los residuos βD316 , βT318 y βD319 del asa posterior de la séptima hebra en la conformación vacía (β_E), con γR254 y γQ255 en la hélice C-terminal, controlando la admisión de ATP. La segunda (observada sólo para $M\beta_{TP}$) se forma entre la región $\beta\text{DELSEED}$ (D394 y E395) con γR228 (puerta 2) dentro de la región $\gamma\text{221-228}$, que permite la liberación del fosfato. También existen interacciones de β con los residuos $\gamma\text{18-35}$, $\gamma\text{236-246}$ y $\gamma\text{268-269}$. Este último es el residuo final del dominio C-terminal. La interacción que se lleva a cabo entre ε y la secuencia DELSEED de β puede jugar un papel importante en la contribución que tiene esta secuencia al sitio de unión (Boyer, 1997).

Para las interacciones que involucran a las subunidades γ y ε se identificaron los residuos εSer10 , εHis38 y εThr43 del dominio N-terminal, con la región que comprende los residuos 203 a 230 de γ . Además, el dominio C-terminal de ε participa interactuando con las subunidades α , β y los contactos específicos del asa polar de la subunidad c (Nakamoto, *et al.*, 1999; Weber y Senior, 1997).

La rotación de γ fue observada por Noji, H. *et al.* (1997), quienes a partir del anclaje del sector F_1 a una placa de vidrio por medio de colas de histidina unidas a las subunidades β y la unión de un filamento de actina a la subunidad γ , observó la rotación del filamento cuando se hidrolizaba ATP, con pasos de 120° . Durante la hidrólisis, γ rota en tres pasos discretos de 120° , resueltos en subpasos de 90° y 30° .

La duración del tiempo de espera antes del subpaso de 90° (85°) es inversamente proporcional a la concentración de ATP, por lo que se piensa está relacionado a la unión de ATP. Durante este paso, el cerrado de la conformación β_E a β_{TP} origina la aparición de contactos entre los residuos $\beta\text{I390-}\beta\text{L391}$ y la porción $\gamma\text{20-25}$. Dentro del hexámero, otra

subunidad β con la conformación β_{TP} pasa a β_{DP} debido a la hidrólisis de ATP, ocasionando que la orientación de γ sea directa sobre la tercera subunidad con una estructura un poco más abierta que β_{DP} (β_{HO}). Esta orientación facilita la apertura de la tercera subunidad, en la que existe una mayor repulsión electrostática debido a las cargas de ADP y Pi formados, generando que esta tercera subunidad tome una conformación medio cerrada (β_{HC}).

Durante el segundo subpaso de 30° (35°), la forma β_{DP} pasa a β_{HO} , debido a la repulsión electrostática creada por las cargas de ADP y Pi generados. Esta transformación permite que la cavidad donde se encuentra γ se expanda y pueda rotar 35° , además de liberar los productos de la subunidad con la conformación β_{HC} , para pasar a la forma β_E . En la primera parte de este paso de torsión actúan las interacciones entre $\gamma_{232-238}$ y $\beta_{390-391}$, para la segunda parte y última participan el asa de anclaje en $M\beta_{316-319}$ y $\gamma_{252-258}$, además de γ_{75-79} (Pu y Karplus, 2008).

Tomando en consideración la hidrólisis del ATP, Boyer ha propuesto el mecanismo de cambio de unión alternante, el cual ha sido el mejor conocido. Este propone que la subunidad β procede de manera concertada a través de 3 estados conformacionales: fuerte (tight; T), débil (loose; L) y abierto (open; O) y que son análogos a los observados en el cristal de F_1 de mitocondria de bovino, β_{DP} , β_{TP} y β_E , respectivamente. Este movimiento concertado se propone que está ligado al movimiento de γ , y actúa durante el proceso que lleva a pasar del estado $T \rightarrow O$, de $L \rightarrow T$ y de $O \rightarrow L$. La liberación de los productos en un sitio catalítico depende de la unión de sustratos en otro sitio. De esta manera, la formación del sitio T lleva a la unión fuerte de ADP + P_i que se encuentra en equilibrio con el ATP; sin embargo, para tener síntesis este mecanismo no explica cómo este equilibrio favorece que el cambio de T a O pueda liberar ADP + P_i o ATP. Así se considera a la translocación de protones como la fuerza que dirige la liberación del ATP fuertemente unido, disminuyendo la afinidad por ATP en el sitio T y aumentando la afinidad por ADP en el sitio O (Boyer, 1993)

Otros grupos, con el objetivo de descifrar este mecanismo, han propuesto dos descargas de energía, en donde la energía de hidrólisis del fosfato- γ es usada para debilitar la unión fuerte que tiene el ATP con el sitio catalítico, liberando los productos. Cuando el ATP se une al sitio catalítico se forma rápidamente una red de puentes de hidrógeno. El cierre del sitio alrededor del nucleótido crea una torsión constante cerca de la región de bisagra, provocando una rotación de la región superior de β con respecto a la

porción inferior en 30° pasando de la conformación β_E a β_{TP} , ligado a la unión de ATP y torsión de γ . Al final de la primera descarga de energía, el ATP se encuentra unido fuertemente, por lo que se supone que la energía de ruptura del enlace del fosfato- γ (segunda descarga) sea utilizada para liberar los productos y romper puentes de hidrógeno formados entre el ATP y la subunidad β .

Sin embargo, el mecanismo preciso aun no está definido, pero se sabe que para poder tener una rotación es necesaria la participación de dos sitios o los tres de forma cooperativa coordinada (Boyer, 1997; Papa, *et al.*, 1999).

Capítulo II

Antecedentes del estudio y planteamiento del problema.

2.1 Características del magnesio, interacción con nucleótidos di y trifosfato.

La participación de los metales en el funcionamiento de las proteínas ha sido ampliamente reconocida. A las proteínas capaces de unir metales se les ha denominado metaloproteínas. Los metales en conjunción con las proteínas pueden ser partícipes tanto en la estructuración de la proteína o actuando durante el mecanismo catalítico dentro del sitio de unión, en la proteína. Se ha observado que la eliminación de los metales en sistemas que necesitan de ellos, es acompañada por la disminución de la actividad catalítica o pérdida de estabilidad.

El magnesio iónico es único entre los cationes divalentes utilizados por los seres vivos. Su concentración libre intracelular es aproximadamente 0.5mM en casi todas las células. En soluciones acuosas, se encuentra en una forma hexacoordinada ($Mg(H_2O)_6$), uniendo moléculas de agua en una geometría regular octaédrica, con los ángulos de unión cerca de los 90° , en su primer capa de solvatación; siendo capaz de formar una segunda capa con interacciones entre las moléculas de la primer capa de solvatación (Figura 4). Esta coordinación hace que presente un radio de hidratación grande en comparación con los cationes comunes, a pesar de que su radio iónico es el más pequeño entre los cationes divalentes comúnmente usados por los seres vivos. Como se observa en la Tabla 1, aunque el Mg^{2+} es un átomo más grande que el Na^+ , su radio iónico es más pequeño y semejante al del Li^+ (Kehres y Maguire, 2002).

| Grupo IA | Radio iónico (nm) | ASA iónico (\AA^2) | Radio vdW (nm) | ASA _{vdW} (\AA^2) | Grupo IIA | Radio iónico (nm) | ASA iónico (\AA^2) | Radio vdW (nm) | ASA _{vdW} (\AA^2) |
|----------|-------------------|-------------------------------|----------------|---------------------------------------|-----------|-------------------|-------------------------------|----------------|---------------------------------------|
| Litio | 0.06 | 54.9 | 0.155 | 109.4 | Berilio | 0.031 | 43 | 0.112 | 79.8 |
| Sodio | 0.095 | 76.3 | 0.196 | 141.9 | Magnesio | 0.065 | 56.5 | 0.160 | 113.1 |
| Potasio | 0.133 | 97.1 | 0.235 | 176.7 | Calcio | 0.099 | 72.4 | 0.197 | 142.7 |
| Rubidio | 0.148 | 105.0 | 0.248 | 189.2 | Estroncio | 0.113 | 80.4 | 0.215 | 158.4 |
| Cesio | 0.169 | 120.8 | 0.267 | 208.2 | Bario | 0.135 | 95.7 | 0.222 | 164.7 |
| | | | | | Radio | 0.140 | 100.6 | ---- | ---- |

Típicamente, el cofactor magnesio actúa como un ácido de Lewis (capaces de aceptar un par de electrones), a través del sustrato unido, funcionando como activador de un nucleófilo, promoviendo la ionización a una forma aniónica más reactiva o estabilizando un intermediario. Interactúa en la mayoría de los casos con átomos de oxígeno, aunque en clorofila interactúa con nitrógeno. Generalmente el uso de los cationes metálicos como ácidos de Lewis permite que un gran número de reacciones de hidrólisis o condensación se lleven bajo condiciones fisiológicas, que de otra forma requerirían de un pH extremo (Cowan, J. 2002).

Las enzimas dependientes de magnesio se encuentran distribuidas ampliamente en las vías metabólicas, incluyendo la bioquímica de los ácidos nucleicos. El magnesio puede participar mediando la interacción entre el sustrato y la enzima, o bien uniéndose a la proteína, originando cambios estructurales en ésta para adoptar la conformación activa. La interacción con el magnesio puede deberse a la coordinación directa de las cadenas laterales de la proteína (capa interna de unión) o a la interacción indirecta a través de moléculas de agua unidas al metal (esfera externa de unión).

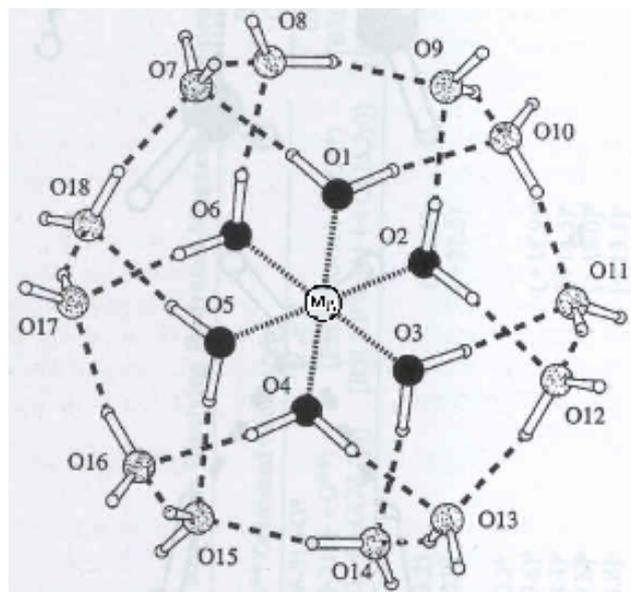


Figura 4. Capas de solvatación del Mg^{2+} . En negro se observan las moléculas de agua conforman la primera capa de solvatación $(H_2O)_6$; en puntos, las moléculas de agua que se encuentran en la segunda capa de solvatación.

Dentro del metabolismo, los nucleótidos de fosfato se requieren en un gran número de reacciones. El magnesio interactúa de manera no enzimática con los fosfatos de estos nucleótidos, existiendo una diferencia de 10 veces mayor afinidad por ATP en comparación a ADP. Dos propuestas se han desarrollado para explicar el papel del magnesio en estas moléculas tan importantes en el proceso de transferencia de energía.

La primera hace énfasis en la formación de un quelado (*i.e.*, la formación de un intermediario cíclico entre un ión metálico y el fosfato lábil). La segunda atribuye un efecto predominante a la neutralización de cargas (*i.e.*, reducción de carga iónica del anión fosfato), por la interacción con un metal de carga opuesta (O'Sullivan y Perrin, 1964; Oestreich y Jones, 1967; Tran-Dinh y Neumann, 1977; Wang, *et al.*, 1995).

Para la ATP-sintasa, se ha reconocido el papel del Mg^{2+} en la unión de los ligandos, al ser su verdadero ligando el nucleótido unido al metal, se observa que la constante de afinidad aumenta con la presencia de este ion. Además, se ha visto que la ausencia de Mg^{2+} inhibe el mecanismo cooperativo de unión entre los tres sitios catalíticos (β) de la enzima (Weber, J. *et al* 1998).

2.2 Magnesio y ATP-sintasa

El efecto que origina el Mg^{2+} en la ATP-sintasa es fundamental para conocer el funcionamiento preciso de esta enzima tan importante, promoviendo la unión de sustratos de forma cooperativa entre los tres sitios catalíticos (Weber, *et al.*, 1998). En la subunidad β de *Escherichia coli* ($E\beta$) se han identificado los residuos $E\beta$ Thr156, $E\beta$ Glu185 y $E\beta$ Asp242 en el reconocimiento del magnesio. La eliminación de cualquiera de éstos provoca la pérdida de la cooperatividad característica en presencia del metal. El residuo $E\beta$ Thr156 es el último residuo del asa-P y podría participar en suplir parcialmente la primera capa de solvatación del magnesio, ya que el oxígeno oxhidrilo se encuentra a 2.3 Å de distancia del metal. Los residuos $E\beta$ Asp242 y $E\beta$ Glu185 tienen respectivamente su oxígeno carboxilo a 4.0 y 4.1 Å de distancia del metal, interactuando mediante una molécula de agua. El residuo $E\beta$ Asp242 se encuentra conservado en varias proteínas que reconocen ATP y utilizan el magnesio, como la ATP/ADP translocasa, adenilato quinasa y fosfofructoquinasa (Walker, *et al.*, 1982).

Otros residuos que se han mutado y tienen efectos sobre el reconocimiento de Mg^{2+} son: $E\beta$ Glu181, que tiene un efecto estabilizador del estado de transición; $E\beta$ K155 y $E\beta$ E192, con efectos en la unión de ATP o ADP-Pi, el primero presente en el asa-P y el segundo actuando vía una molécula de agua. El efecto de las mutaciones parece ser menor para la unión de ADP, en comparación a ATP, apoyando la idea de la existencia de dos conformaciones distintas del sitio catalítico (Senior, *et al.*, 1992).

La dependencia de la constante de disociación (K_d) para la unión de nucleótido, a

la presencia o ausencia del ion en EF_1 se ha estudiado fluorométricamente, en donde es seguido el apagamiento de la fluorescencia del triptofano introducido mediante mutagénesis dirigida en la posición 331 de la β de *E. coli* ($E\beta Y331W$). Las constantes observadas para $Mg\cdot ATP$ son de 0.028, 2.1 y 39 μM para los sitios 1, 2 y 3, respectivamente, a diferencia de la constante de 71 μM observada para ATP en los tres sitios, en ausencia de Mg^{2+} . En la unión de $ADP\cdot Mg$, se observaron K_d de 0.14 μM para el sitio 1 y de 20 μM para los sitios 2 y 3, a diferencia de la K_d de 83 μM para los tres sitios en la unión de ADP libre (Weber, *et al.*, 1998).

Para tener un entendimiento total del proceso de síntesis de ATP es necesario comprender: a) el mecanismo de rotación del eje γ dependiente del flujo de protones; b) el mecanismo de acoplamiento entre los pasos de 120° en la rotación de γ con el cambio en la unión en el sitio de reconocimiento de la interfase α - β ; y c) el mecanismo químico de síntesis de ATP a partir de ADP, P_i y Mg^{2+} , llevado a cabo en cada par α - β . En este contexto, resulta crucial entender las bases energéticas y estructurales que dictan la afinidad por los nucleótidos de adenosina. Así, el estudio del reconocimiento de nucleótidos llevado a cabo por la subunidad β de manera aislada es clave en la comprensión del mecanismo químico (último paso del proceso), donde a pesar de existir mucha información sobre el posible evento conformacional y cinético del proceso, muy poco se sabe del mecanismo de estabilización que se lleva a cabo dentro de la subunidad β . El estudio de la presencia del ion Mg^{2+} mediante ESR (resonancia magnética del spin) muestra diferencias, en donde el ión induce un cambio conformacional dramático en la enzima (Burgard, S. *et al* 1994). Además, por resonancia magnética nuclear, monitoreando 12 residuos de tirosinas mutadas por triptófanos en la subunidad β aislada de *Bacillus PS3* ($T\beta$), se ha observado la diferencia entre las conformaciones que adquiere esta subunidad dependiendo de la unión de ATP o ADP con o sin Mg^{2+} (Yagi, H. *et al* 1999). Existiendo una similitud entre las conformaciones adoptadas por los complejos $T\beta$ -ATP y $T\beta$ -ADP $\cdot Mg$, con respecto a la conformación observada para $T\beta$ -ATP $\cdot Mg$. Por tanto, este estudio sugiere la importancia del Mg^{2+} en la adquisición de una conformación en particular de la subunidad β .

Sin embargo, aunque existen datos estructurales y cinéticos que apoyan la importancia del Mg^{2+} en el funcionamiento de F_1 y en el reconocimiento de β hacia los nucleótidos de adenosina (Tabla 2), actuando en la formación del estado de transición

(Young, *et al.*, 1999), su participación energética en el mecanismo aún no está bien definida.

Utilizando CTI como una herramienta para caracterizar el proceso energético desde un enfoque termodinámico y para observar la afinidad de unión espectrofotométricamente invisible, Odaka *et al.* (1994) determinaron la energética de unión de ATP•Mg²⁺ y ADP•Mg²⁺ a la subunidad Tβ aislada a 21 °C. En este estudio, se mostró que la mutación del residuo βY341 (por Leu, Cys y Ala) de *Bacillus PS3* (homólogo a Y331 en *E. coli*) afecta drásticamente los parámetros termodinámicos de unión con ATP•Mg²⁺. En otro estudio, llevado a cabo por Pérez-Hernández *et al.* (2002), se determinó la energética de formación del complejo Tβ-ADP•Mg a diferentes temperaturas, concluyendo que la reacción de formación se encuentra entálpicamente dirigida, con un componente entrópico desfavorable, y un pequeño cambio negativo de capacidad calorífica. Lo que sugiere un papel más importante de las interacciones polares en la afinidad del complejo en el sitio de unión de la subunidad β. Además, mediante el uso de modelos de área superficial (ver sección 2.3), a partir del ΔH y ΔC_p, se obtuvo un cambio de área total (ΔASA) de -770 Å², el cual es muy semejante al obtenido de analizar la estructura tridimensional de la subunidad Mβ uniendo ADP•Mg y en conformación abierta, que se observan en la estructura de MF₁ (ΔASA = -775 Å²). Este pequeño cambio de área observado para un cambio conformacional tan grande en Tβ se explica por un gran efecto compensatorio entre la exposición y ocultamiento simultáneo de área de superficie durante la transición de la conformación β_E a β_{DP} observadas en mitocondria y que involucra la parte de la bisagra observada por resonancia magnética nuclear (NMR), en la parte opuesta del sitio de unión.

Tabla 2. K_d en presencia o ausencia de Mg^{2+} en el complejo F_1

| Ligando | Silvestre (+) o mutante | K_1 | K_2 | K_3 | Tipo de catálisis (monositio, bisitio, multisitio) | Referencia |
|---------------|-------------------------------------|-------------|-------------|------------|--|------------------|
| Mg•ATP | | 0.2nM | 2 μ M | 25 μ M | multisitio | Yi Qin Gao, 2003 |
| | β Y331W | < 50nM | 0.5 μ M | 25 μ M | bisitio | Weber, 1994 |
| | + (<i>E.coli</i>) | 0.39nM | | | multisitio | Al-Shawi, 1988 |
| | E β D242N | 13 μ M | | | | |
| | E β D242V | 54 μ M | | | | |
| | + (<i>E.coli</i>) E β E181Q | 0.18nM | | | monositio | Señor, 1994 |
| β Y331W | < 0.05 μ M | 0.5 μ M | 25 μ M | multisitio | Löbau, 1997 | |
| ATP | β Y331W | 71 μ M | 71 μ M | 71 μ M | multisitio | Löbau, 1997 |
| Mg•ADP | | 0.5 μ M | 29 μ M | 29 μ M | multisitio | Yi Qin Gao, 2003 |
| | | 10 μ M | 100 μ M | --- | --- | Yoshida, 1985 |
| | | 2 μ M | | | monositio | Señor, 1994 |
| | + (<i>E.coli</i>) | 0.7nM | | | monositio | Al-shawi, 1988 |
| | E β D242N | 1.1nM | | | | |
| | E β D242V | 0.9nM | | | | |
| β Y331W | 0.1 μ M | 13 μ M | 13 μ M | multisitio | Löbau, 1997 | |
| ADP | β Y331W | 83 μ M | 83 μ M | 83 μ M | multisitio | |

En el presente proyecto de tesis se abordó el cambio energético que pudiera ocurrir dentro de la subunidad β aislada, en presencia y ausencia del Mg^{2+} para la unión del ligando ADP, mediante el método calorimétrico. Además, se hizo uso de la fluorescencia intrínseca como forma de evaluar si existen diferencias conformacionales de T β al unir al ADP con y sin Mg^{2+} . El propósito es entender las bases energéticas relacionadas a la presencia del ión en el proceso de reconocimiento y el posible cambio estructural derivado de su presencia, así como la relación con el acoplamiento en el funcionamiento de la enzima como una proteína polimérica; proveyendo datos sobre el funcionamiento de la subunidad catalítica. Asimismo, comprender el papel de este ión en la interacción que ocurre entre la proteína y sus ligandos, de una forma más sencilla a la presentada por el complejo en su totalidad.

2.3 Calorimetría e interacción proteína-ligando

El proceso de reconocimiento y unión que se lleva a cabo entre proteína-ligando, su relación con la función biológica y su posible aplicación en la ingeniería de proteínas, ha generado el interés de varios grupos de investigación. El entendimiento total de la interacción proteína-ligando requiere de la resolución de las propiedades biofísicas de

ambos, así como el conocimiento conformacional y estructural a nivel atómico de la proteína, el ligando y el complejo. Con la finalidad de resolver este proceso, que resulta complicado al presentarse una mezcla de varios microestados, diversas técnicas se han utilizado de forma complementaria. Algunas se han basado en la determinación directa de las especies presentes en el sistema como la ultracentrifugación y diálisis, obteniéndose valores de estequiometría y constantes de unión, otras han permitido medir la señal proporcional al avance de la reacción en donde por espectroscopía (dicroísmo circular, fluorescencia) se puede saber sobre el cambio conformacional. Dentro de este segundo grupo está la calorimetría, con la que se obtienen valores sobre cambios de entalpía y capacidad calorífica, con la finalidad de conocer la energía del proceso de interacción (Velázquez-Campoy y Freire, 2005; Hardin y Chowdhry, 2001).

A partir de las estructuras cristalográficas ha sido posible inferir la estructura de las proteínas aisladas, en complejos con sus ligandos o con un análogo, tratando de conocer el mecanismo que llevan a cabo durante su funcionamiento y dilucidando los posibles residuos involucrados en el reconocimiento. Sin embargo, con la simple estructura no se pueden conocer las variables que influyen en el reconocimiento del ligando y son necesarias otras herramientas como la dinámica molecular para poder entender el proceso a nivel microscópico. Como complemento, el estudio de cinética de reacciones y el efecto de las mutaciones sobre la velocidad de reacción han sido útiles para descifrar el posible mecanismo de unión y la catálisis dentro de las proteínas.

Durante el reconocimiento molecular, las fuerzas de interacción que se pueden dar entre átomos o moléculas son de origen electrostático, incluso las que se llevan a cabo entre moléculas no polares. El cálculo de estas interacciones electrostáticas en las proteínas ha sido difícil por la heterogeneidad local en su estructura y la presencia de una interfase proteína-agua. Dentro de las fuerzas intermoleculares que contribuyen a la estabilización de los complejos están:

Puentes de hidrógeno, ocurren cuando 2 átomos electronegativos compiten por el mismo átomo de hidrógeno que se encuentra unido covalentemente a uno de los átomos (donador). Su configuración óptima es lineal, teniendo pequeños cambios de energía por la inclinación. En general, la fuerza de los puentes de hidrógeno se encuentra dentro del rango de 2-10 kcal/mol (12-38kJ/mol) a temperatura ambiente.

Puentes salinos o enlace iónico, al formarse un ión existe el reacomodo de los orbitales en el átomo. Así, los que quedan con el orbital de valencia lleno quedarán con electrones en exceso (carga negativa) y los que queden con un orbital vacío tendrán una deficiencia

electrónica (carga positiva). Dos átomos con esta característica pueden unirse por la acción electrostática de sus cargas, formando un enlace iónico.

Interacciones de van der Waals, son débiles y de corto alcance, existiendo una distancia interatómica donde se alcanza la interacción más favorable. Pueden ser de 3 tipos: entre dipolos, entre un dipolo inducido y un dipolo permanente, y entre dipolos inducidos. Este tipo de interacciones a menudo son representadas por la energía potencial (E_p) en función de la distancia e incluyen las fuerzas atractivas ($1/r^6$) y repulsivas ($1/r^{12}$) en un campo cerrado (potencial de Lennard-Jones), donde r es la distancia entre los centros de los átomos.

Unión hidrofóbica o efecto hidrofóbico, es una forma de describir la tendencia de transferencia de componentes no polares de una solución acuosa a una fase orgánica. Estas no producen un gran cambio en la entalpía del sistema, pero si disminuyen la entropía. La energía de este tipo de interacciones es proporcional al área oculta de la superficie y depende de las fuerzas de dispersión. Es una de las fuerzas que estabiliza a las proteínas (Creighton, 1993; Fersht, 1999).

Es importante reconocer que la dependencia del proceso a las interacciones moleculares dentro de la proteína, entre proteína-solvente y proteína-ligando, hacen necesaria una caracterización energética, para poder entender las fuerzas moleculares que actúan en las diversas interacciones afectadas o creadas durante el reconocimiento. Un acercamiento para determinar la fuerza de interacción puede llevarse a cabo por medio de la ley de Coulomb: de esta forma se puede conocer la energía electrostática de interacción entre dos átomos en el vacío, por lo que, si dos cargas son de signo opuesto, la energía disminuye conforme se aproximan y la interacción es favorable, hasta llegar a la sobreposición de las nubes electrónicas, lo que ocasiona una repulsión. En ambientes homogéneos la constante dieléctrica actúa disminuyendo la fuerza de las interacciones, siendo más complejo en ambientes heterogéneos como los presentes dentro de la proteína. El análisis para descifrar las interacciones proteína-ligando desde un enfoque energético del proceso coloca a la calorimetría como método para entender las fuerzas moleculares que actúan en el reconocimiento de manera global, dividiendo la energía de asociación (ΔG) en sus componentes entálpico y entrópico.

La energía del equilibrio proteína-ligando puede ser caracterizada calorimétricamente por 4 parámetros termodinámicos: energía libre estándar ΔG° ,

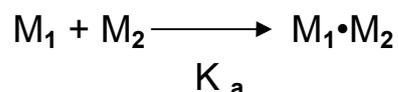
entalpía molar estándar ΔH° , entropía molar estándar ΔS° y la capacidad calorífica molar estándar ΔC_p° .

Calorimétricamente, estos parámetros pueden ser medidos directamente, donde la energía libre de asociación (ΔG_a) se calcula a partir de la constante de equilibrio K , mientras que el calor intercambiado a presión constante corresponde a ΔH_a :

$$\Delta G_a = -RT \ln K_a = \Delta H_a - T\Delta S_a \text{ (ec.1)}$$

donde R es la constante de los gases (1.9872 cal/K mol) y T es la temperatura absoluta (Kelvin)

La interacción intermolecular en una reacción de unión puede ser homodimérica (cuando las dos moléculas son idénticas) o heterodimérica (cuando las dos moléculas son distintas). De este modo, para determinar calorimétricamente alguna de estas interacciones se llevará a cabo una metodología diferente. Para una interacción heterodimérica la constante de asociación (K_a) sigue el esquema siguiente (Velazquez-Campoy, *et al.*, 2004).



en donde K_a es igual a:

$$K_a = \frac{[M_1 \cdot M_2]}{[M_1][M_2]} = \frac{1}{K_d} \text{ (ec. 2)}$$

En el calorímetro de titulación isotérmica (CTI), compuesto de dos celdas idénticas, rodeadas por una cubierta adiabática, un sensor detecta la diferencia de temperatura entre las celdas y entre las celdas y la chaqueta. Para realizar un experimento la muestra es colocada en la celda de muestra, y la celda de referencia es llenada con el amortiguador o agua. Antes de comenzar la titulación un poder constante es aplicado a la celda de referencia. Esta señal activa el circuito de alimentación localizado en la celda de muestra y representa la línea base (Pierce, *et al.*, 1999).

Experimentalmente, se observa directamente el poder aplicado para mantener la temperatura de las dos celdas igual (isotérmico), dependientes del tiempo. En el experimento de titulación, después de cada adición de una pequeña alícuota de ligando, el calor liberado o absorbido en la celda de muestra es medido con respecto a la celda de referencia. Así, durante la secuencia de inyecciones el cambio en el calor dentro de la celda de muestra dependerá del tipo de reacción, es decir, si es exotérmica o endotérmica

y en donde existirá un rearrreglo de las poblaciones de macromoléculas que conducen a la formación del complejo (Fisher y Singh, 1995; O'Brien, *et al.*, 2001; Velázquez-Campoy, 2004). Para una reacción exotérmica, la temperatura de la celda de muestra se incrementa y el poder de alimentación es desactivado para mantener la temperatura entre las dos celdas igual. En una reacción endotérmica la temperatura de la celda disminuye, incrementándose el poder de alimentación.

Para cada inyección, es posible obtener el calor asociado a la reacción integrando el área bajo cada pico de la señal medida, que es proporcional a la fracción de ligando unido y se puede representar con la ecuación 3. El análisis de este calor de reacción en función de la concentración, provee de una caracterización termodinámica completa, determinándose la constante de asociación K_a , la entalpía de unión ΔH y la estequiometría n en un solo experimento (Velázquez-Campoy y Freire, 2005).

$$Q=V_0 \Delta H_b [M]_t K_a [L] / (1 + K_a [L]) \quad (\text{ec. 3})$$

donde V_0 es el volumen de la celda, ΔH_b es la entalpía de unión por mol de ligando, $[M]_t$ es la concentración total de la molécula (incluyendo las fracciones libres y en el complejo), K_a es la constante de unión y $[L]$ es la concentración del ligando libre (Murphy, K. y Freire, E. 1992).

Durante el diseño experimental se debe considerar el alcanzar una saturación completa en las últimas inyecciones. En una interacción heterodimérica la K_a se puede determinar a partir del cambio de calor (q_i) de cada inyección, que es proporcional al incremento en la concentración del complejo en la celda después de la inyección i . De esta forma, basados en un esquema de asociación reversible al equilibrio, en donde las moléculas interactuantes son M_1 y M_2 , la fuerza de la interacción puede ser descrita por la constante de asociación (K_a) o de disociación (K_d). Estas constantes se encuentran relacionadas a la energía libre de asociación ΔG_a o de disociación ΔG_d , que también puede expresarse en términos de entalpía y entropía y que pueden ser determinadas a partir de esta constante (Velázquez-Campoy, *et al.*, 2004).

Los parámetros termodinámicos son dependientes de la magnitud de afinidad del sistema de estudio, por lo que cualquier técnica de unión al equilibrio como CTI requiere de una concentración apropiada de las moléculas que se van a poner a reaccionar. En el método calorimétrico es necesario tener en cuenta el fenómeno de afinidad, por lo que se

hace uso del parámetro $c = K_a \times [M_t]$, el cual debe cumplir la relación “ $0.1 < K_a [M_t] < 1000$ ”, en donde una afinidad moderada ($1 < c < 1000$) es la ideal. En el caso de una $c > 1000$ ($K_a > 10^8 M^{-1}$), sólo pueden ser calculados la entalpía y la estequiometría, sin poder determinar la afinidad de unión. Para una $c < 1$ ($K_a < 10^4 M^{-1}$) es preciso conocer la estequiometría para lograr un análisis confiable de la isoterma de unión (Figura 5).

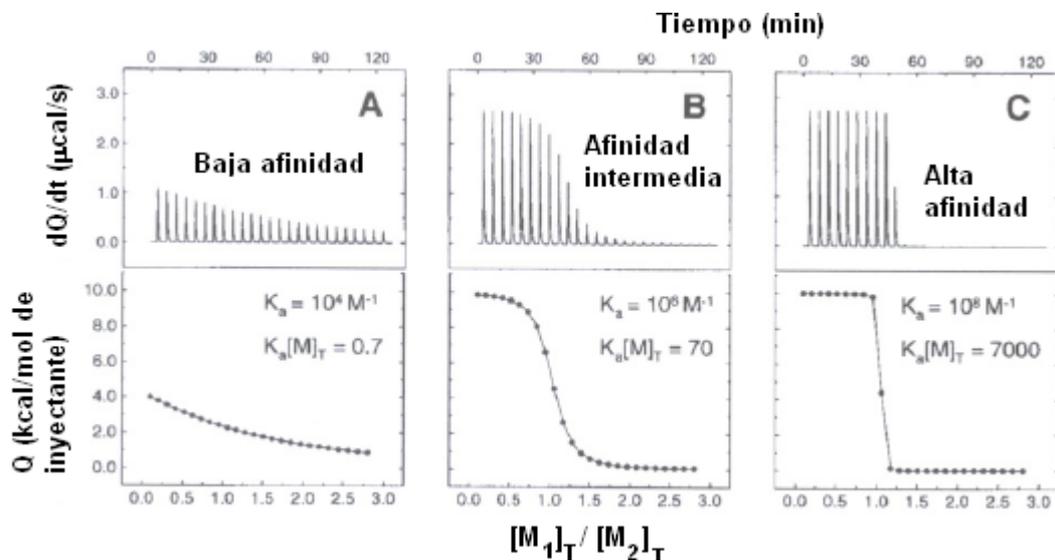


Figura 5. Efecto de la afinidad de unión en la forma de la curva de titulación, dependiente del parámetro c ; tomado de Velázquez Campoy y Freire 2005.

En las reacciones de reconocimiento molecular llevadas a cabo en un medio acuoso, el ΔH es aproximadamente igual al cambio en la energía interna de los solutos y el solvente. La entalpía favorable, resulta de cambios en la formación de interacciones electrostáticas (ΔH_{elec}) y contactos de van der Waals (ΔH_{vdw}) entre las moléculas interactuantes, que conforman el ΔH intrínseco de la proteína (ΔH_{int}); la entalpía desfavorable se relaciona a la desolvatación de grupos polares y no polares (ΔH_{hid}). La desolvatación de grupos no polares es un orden de magnitud más pequeño en comparación con grupos polares.

$$\Delta H_a = \Delta H_{int} + \Delta H_{hid} \quad (ec.4)$$

Los términos más importantes que contribuyen a la entropía de unión son el cambio en la entropía de solvatación, el cambio en la entropía conformacional y el cambio de entropía rotacional y traslacional. El primero de estos es favorable para la unión y se origina de la liberación de moléculas de agua al existir una desolvatación parcial o completa del sitio de unión y el ligando. Este efecto es la fuerza predominante en la

asociación de grupos hidrofóbicos. El cambio de entropía conformacional es casi siempre desfavorable ya que el proceso de unión involucra la pérdida de grados de libertad conformacional del ligando y la proteína. La entropía rotacional y traslacional está asociada a la reducción en el número de moléculas en un espacio conformacional que se lleva a cabo después de la unión. Es desfavorable porque existe una pérdida en los grados de libertad de rotación y traslación en las moléculas (Freire, 2004).

El cambio de entropía puede ser derivado de la ecuación 5 (Hinz, 1983):

$$\Delta S^\circ = \Delta S_{\text{sol}} + \Delta S_{\text{conf}} + \Delta S_{r,\text{tr}} \text{ (ec. 5)}$$

El ΔC_p en proteínas se encuentra relacionado a cuatro términos generales (ecuación 6). Un término intrínseco dividido en dos: el primer término contiene las contribuciones atómicas y de uniones covalentes, (frecuencias vibracionales de los modos de estrechamiento y curvatura de enlaces de valencia y rotaciones internas). Depende de la composición de aminoácidos; el segundo término contiene las contribuciones no covalentes que surgen de la estructura secundaria y terciaria, su contribución es pequeña. El tercer término se debe principalmente al fenómeno de hidratación y protonación de grupos ó contribuciones de solvatación (ΔC_p de hidratación). En promedio, 55% del total de la superficie accesible al solvente es no polar en un estado nativo, lo que cualitativamente explica la contribución positiva al $C_{p,\text{solv}}$. El cuarto y último contiene la contribución debida al estado de protonación de los grupos ionizables (en proteínas His, Asp, Glu, Arg, Lys), y depende de la estructura e interacción con solvente y ligando. Para la asociación en proteínas el ΔC_p involucra sólo los términos $C_{p,\text{no-cov}}$, $C_{p,\text{solv}}$ y $C_{p,\text{ionización}}$, ya que no existe un cambio en su estructura primaria (número de aminoácidos) (Gómez, *et al.*, 1995):

$$C_p = C_{p,\text{cov}} + C_{p,\text{no-cov}} + C_{p,\text{solv}} + C_{p,\text{ionización}} \text{ (ec. 6)}$$

Como complemento a las evaluaciones anteriores y para tener un mayor entendimiento del proceso de unión, se pueden interpretar los parámetros obtenidos calorimétricamente mediante el uso de observaciones estructurales, generadas a partir de las estructuras cristalográficas o de RMN. Ya que los valores calorimétricos expresan la suma de las interacciones que se llevan a cabo y no sólo un tipo de interacción en particular.

Una forma empírica útil basada en estas observaciones para la predicción de la energética de unión, es el uso de los modelos de área superficial (ASA). El ASA está

definida por el trazo de una superficie llevado a cabo por una molécula de solvente (1.4Å), rodada sobre la estructura tridimensional de una molécula. Calculándose la diferencia como el cambio de área del complejo menos la suma de las áreas de los ligantes (ΔASA). Así, la alternativa para relacionar los datos de diferente origen, es asumir que las funciones termodinámicas tienen una dependencia lineal a la cantidad de moléculas de agua en contacto con las macromoléculas (ASA). Este acercamiento es de gran importancia, ya que se ha observado experimentalmente una gran contribución energética y entrópica de la interacción soluto-solvente y solvente-solvente (Janin, 1995).

Con éste acercamiento, el ΔC_p , el ΔH y el ΔS pueden ser parametrizados en función de los cambios del área accesible al solvente polar y no polar.

El parámetro capacidad calorífica puede ser determinado en términos del ocultamiento de área de superficie molecular expuesta al solvente, por las contribuciones de la superficie de área polar (ASA_{pol}) y no polar (ASA_{np}). El cambio en la capacidad calorífica de hidratación dependiente de los ΔASA_{pol} y ΔASA_{np} se puede expresar como la ecuación 7 (Gómez, *et al.*, 1995; Baker y Murphy, 1998):

$$\Delta C_p = \Delta C_{p, np} \cdot \Delta ASA_{np} + \Delta C_{p, pol} \cdot \Delta ASA_{pol} \text{ (ec.7)}$$

donde $\Delta C_{p, np}$ y $\Delta C_{p, pol}$ son valores de proporcionalidad obtenidos del análisis de parámetros energéticos de los sistemas pertinentes.

La contribución entálpica durante la unión es debida a la pérdida o formación de puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals y puentes salinos generados: al formarse el complejo, del complejo con el solvente, de las macromoléculas solas con el solvente y entre las moléculas del solvente que se encuentran cerca del complejo. Se puede calcular a partir de los parámetros Δh_{pol} y Δh_{np} , como se muestra (ec. 8):

$$\Delta H^\circ = \Delta h_{pol} \Delta ASA_{pol} + \Delta h_{np} \Delta ASA_{np} \text{ (ec. 8)}$$

Los parámetros Δh_{pol} y Δh_{np} son obtenidos por una regresión lineal de la entalpía de unión en función de la superficie de área polar y no polar.

En el caso del ΔS debido a las contribuciones de la entropía de solvatación, conformacional y rotacional-traslacional, es necesario calcular de manera independiente

el ΔASA polar y no polar involucrado en cada uno de estos términos. Esto ha llevado a la definición de tres ecuaciones relacionadas a cada uno de los términos:

La entropía de solvatación refleja la reestructuración del agua alrededor de las superficies de las moléculas, la entropía polar y no polar alrededor de los 112°C (383K) es cero, por lo que se puede extrapolar a 25°C como se muestra en la ecuación 9:

$$\Delta S^{\circ}_{sol} = \Delta C_p \ln(298/383) \text{ (ec. 9)}$$

donde ΔC_p es igual a la ecuación 7.

Hay dos contribuciones a ΔS_{conf} , las restricciones alrededor de los ángulos de torsión de la cadena lateral y la inmovilización del enlace peptídico, en donde para una unión tipo cuerpo rígido, sólo el componente de las cadenas laterales aplica (ec. 10):

$$\Delta S^{\circ}_{conf, SC} = \sum_i \frac{ASA_{sc,i}}{ASA_{AXA,i}} \Delta S^{\circ}_{bu \rightarrow ex} \text{ (ec.10)}$$

donde $\Delta ASA_{sc,i}$ es el cambio en ASA de la cadena lateral i durante la unión, $\Delta ASA_{AXA,i}$ es el ASA de la cadena lateral en un triplete Ala-X-Ala y $\Delta S^{\circ}_{bu \rightarrow ex}$, es la ganancia de entropía de exposición-ocultamiento de la cadena lateral i .

La entropía de asociación involucra el número de moléculas del sistema y sus grados de libertad de rotación-translación ganados o perdidos. Para una reacción de unión bi-molecular utilizando un estado estándar de 1M (55.5 para el agua), es igual a la ecuación 11:

$$\Delta S^{\circ}_{asoc.} = R \ln(1/55.5) \text{ (ec.11)}$$

Capítulo III

Objetivos

3.1 General

Evaluar el papel energético-estructural del Mg^{2+} en el reconocimiento del ADP por la subunidad β de la ATP-sintasa de *Bacillus PS3*, con el fin de entender con más detalle los fenómenos moleculares asociados al funcionamiento de esta subunidad.

3.2 Particulares

Obtención de los parámetros termodinámicos para la formación de los complejos ADP•Mg, T β -ADP•Mg y T β -ADP, mediante CTI.

Inferir los parámetros termodinámicos para la incorporación del magnesio al complejo T β -ADP a través del análisis de los equilibrios anteriores.

Evaluar si existen diferencias estructurales significativas entre T β -ADP•Mg y T β -ADP a partir de espectrofluorometría.

Comparar la energética estructural de la asociación del ADP•Mg y de ADP con la subunidad T β de *Bacillus PS3*, relacionada al cambio de área superficial accesible al solvente (ΔASA).

Capítulo IV

Método

4.1 Purificación de T β

Cultivo de células de *E. Coli* DK8 (unc⁻) que contienen el plásmido C95-I con la subunidad β de *Bacillus PS3* (Ohta, S. et al. 1988), en placas de agar-LB con ampicilina:

Se inocularon precultivos de 50mL de medio LB con ampicilina durante toda una noche a 37°C y 250rpm. El preinóculo fue vertido en un litro del mismo medio incubándose durante 5 horas a 37°C y 250rpm. Se indujo el cultivo con 0.5mM/L de IPTG, dejando incubar en las mismas condiciones durante 4 horas.

Al terminar la inducción, las células fueron centrifugadas a 20,000g x 10min, la pastilla de células obtenida fue lavada con amortiguador de lisis (Apéndice A).

Las células fueron resuspendidas y homogenizadas en 50mL con amortiguador de lisis suplementado con una tableta de inhibidores de proteasas de Roche (Complete) disuelta en el mismo amortiguador. Las células se rompieron en baño de hielo por sonicación en 4 ciclos de 1-2 minutos con periodos entre ciclo de 1 a 2 minutos. Las células rotas se ultracentrifugaron a 100,000g x 1h a 4°C.

El sobrenadante fue aplicado a la columna DEAE (Diethyl-amino-etil) macroprep, acoplada a un equipo HPLC, equilibrada previamente con amortiguador A (Tris-SO₄ 20mM, pH 8.0 y EDTA 1mM). Se le pasó 1 litro de amortiguador A para retirar proteínas distintas a la T β . La T β fue eludía con un gradiente lineal de 0-550mM de NaCl. Se colectaron fracciones de 5mL.

Se midió la absorbancia de las fracciones utilizando una $\lambda = 280\text{nm}$. Las fracciones con la subunidad T β eluidas de 310 a 430mM de sal, fueron observadas en un gel desnaturante (Apéndice A) (King, Laemmli 1971) y teñido con azul de Commasie (Figura 6).

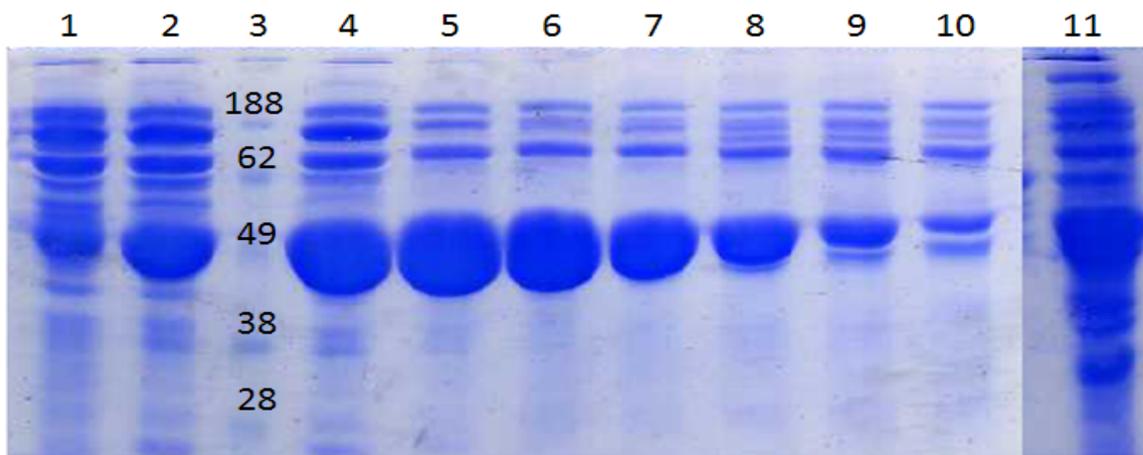


Figura 6. Gel de poliacrilamida SDS-Page, al 12% en condiciones desnaturalizantes, con fracciones colectadas en la columna DEAE. En el carril 1 se observa una fracción que contiene tanto a la subunidad T β , como a otras proteínas. Las fracciones con mayor proporción de T β se encuentran en los carriles 2-9; carril 3, marcador de peso molecular; carril 11, fracción soluble de la ultracentrifugación.

Las fracciones ricas en T β (figura 6, carriles 4-8) se dializaron contra Tris-HCl 20mM, 1mM EDTA, pH 7.3, durante toda la noche. Las fracciones dializadas (40-50mL) fueron cargadas en la columna Mono Q, previamente equilibrada con Tris-HCl 20mM, pH 7.3 y eludías con un flujo de 1mL/min de Tris-HCl 20mM, 1mM EDTA y 1M de NaCl. Se colectaron fracciones de 2mL y se midió su absorbancia a 280nm. El grado de pureza fue seguido por electroforesis, en geles de poliacrilamida al 12%, igual que con la columna DEAE (Figura 7).

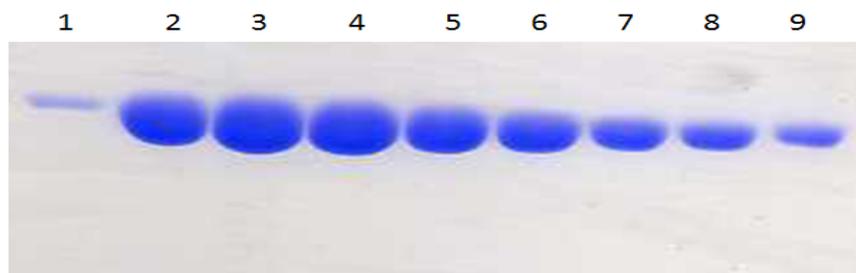


Figura 7. Gel de poliacrilamida SDS-Page, al 12%, en condiciones desnaturalizantes con fracciones colectadas en la columna Mono-Q. Las fracciones que contienen a T β se encuentran en los carriles 1-9.

Las muestras de T β detectadas fueron concentradas en un volumen de aproximadamente 2.5 a 3mL. Centrifugando las fracciones ricas en T β observadas por electroforesis a 20,000g x 15 minutos en un centrífugo Millipore YW-10,000. La concentración de la proteína fue determinada por el método del ácido bicinonínico (BCA) y espectrofotométricamente con un coeficiente de extinción molar de 0.295 mL/mg (Ohta, S. *et al.* 1988; Pérez-Hernández, G. *et al.* 2002).

4.2 Calorimetría de Titulación Isotérmica (CTI)

Los cambios de la entalpía (ΔH_a), la energía libre (ΔG_a), la entropía ($T\Delta S_a$), la constante de asociación (K_a) y la estequiometría (n), se determinaron calorimétricamente, con un microcalorímetro VP-ITC, Microcal. Las isotermas obtenidas se ajustaron al modelo de un solo tipo de sitio de unión (ecuación 12), donde el calor absorbido o cedido (Q) es proporcional a la concentración de ligando unido. Los experimentos se llevaron a cabo en amortiguador Tris-HCl 50mM, pH 8.0.

$$Q = \frac{nM_t \Delta H_b V_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_b M_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_b M_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right] \quad (\text{ec. 12})$$

donde Q , es el calor absorbido o cedido; ΔH_b , es la entalpía molar de unión; V_0 , es el volumen de la celda; n , es la estequiometría; X_t , es la concentración de ligando y M_t , es la concentración de macromolécula en la celda.

Los parámetros para la unión de $T\beta$ -ADP•Mg, $T\beta$ -ADP y ADP•Mg fueron determinados a 25°C en un amortiguador Tris-HCl 50mM, pH 8, con 100mM NaCl¹. Para la unión $T\beta$ -ADP en ausencia de magnesio, se agregó 3mM de EDTA que actúa secuestrando al ion Mg^{2+} al formar un quelado.

Además, para ADP•Mg también se determinó la unión a 20, 30 y 35°C. Con el propósito de eliminar el efecto calórico de dilución del ligando, se llevaron a cabo experimentos en donde se tituló solamente el amortiguador en la celda de referencia, en condiciones idénticas a las realizadas en presencia de la proteína.

4.3 Determinación de la constante de unión fluorométricamente

La fluorescencia se midió utilizando un espectrofluorómetro Ollis (DM45) a 25°C en una celda de cuarzo de 400 μ L. La longitud de onda de excitación fue de 275 nm, para excitar las tirosinas presentes en la subunidad $T\beta$, el espectro de emisión fue registrado en el intervalo de 280 a 370 nm. Con un volumen final de 372 μ L, a la proteína contenida

¹ El análisis de datos se llevó a cabo en el programa ORIGIN v.7.

en la celda se le adicionaron inyecciones de ligando ADP y ADP•Mg. El apagamiento en la fluorescencia total fue calculado de acuerdo a:

$$Y_i = \left(\frac{A}{2Mt_i} \right) \left[Mt_i + Lx_i + K_d - \sqrt{(Mt_i + Lx_i + K_d)^2 - 4Mt_i Lx_i} \right] \quad (\text{ec. 13})$$

donde A es la constante de apagamiento; Mt_i , es la concentración de la proteína en cada adición i ; K_d , es la constante de disociación; Lx_i , la concentración de ligando en cada adición i ; y Y_i es la señal de fluorescencia observada.

La determinación de la contribución energética del magnesio en la unión del nucleótido no es posible para el complejo $T\beta$ -ADP, debido a la presencia de un equilibrio dinámico complejo entre las diferentes especies ($T\beta$, Mg^{2+} , ADP), y en donde la unión del Mg^{2+} al complejo $T\beta$ •ADP no es el único proceso que se lleva a cabo ($T\beta$ - Mg^{2+} , ADP-Mg). Debido a este problema, es necesario el estudio de los diferentes equilibrios de manera independiente. A partir de estos datos, es posible utilizar un esquema de ecuaciones en el que se aplique la ley de Hess, para obtener mediante el rearrreglo de los diferentes equilibrios involucrados en la reacción, la contribución energética del magnesio a la formación del complejo $T\beta$ -ADP•Mg de forma indirecta (Figura 8).

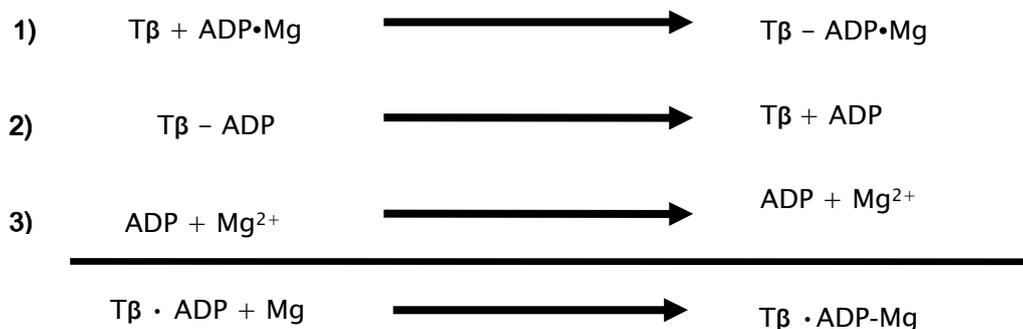


Figura 8. Ecuaciones de Hess para la unión $T\beta$ •ADP-Mg

Capítulo V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Calorimetría de formación del complejo ADP-Mg

Mediante el ajuste las gráficas (isotermas) obtenidas a partir de la integración del calor (Q) con respecto al tiempo (t) al modelo de un solo tipo de sitio de unión, se determinaron los parámetros ΔG , ΔH , ΔS , K_a y n , para la formación del complejo ADP-Mg a diferentes temperaturas (figura 9). Los resultados se observan en la Tabla 3. En todos los experimentos, se utilizó la concentración de 3mM de ADP y 80mM de $MgCl_2$, para asegurar la saturación de ADP con magnesio.

Para este proceso se observa un aumento en la negatividad del ΔG , conforme se aumenta la temperatura, existiendo una compensación entre la entalpía desfavorable (endotérmica) y la entropía favorable, en donde también de forma similar ambos aumentan con respecto a la temperatura, siendo la formación del complejo dirigida por el contribuyente entrópico (Tabla 3).

Con respecto a la literatura, existe mucha ambigüedad en las constantes obtenidas para la formación de este complejo, que se puede deber a la variedad de métodos y condiciones experimentales utilizadas, además de la determinación de forma indirecta mediante constantes intrínsecas espectroscópicas (Wang, *et al.*, 1995). Como ejemplo se muestra la parte A de la tabla 4, con algunos de los valores obtenidos mediante diferentes técnicas experimentales. Otros valores obtenidos por métodos calorimétricos se observan en la parte B. Los valores de K_a de Burton, Cowan y O'Sullivan son similares a los obtenidos en este estudio.

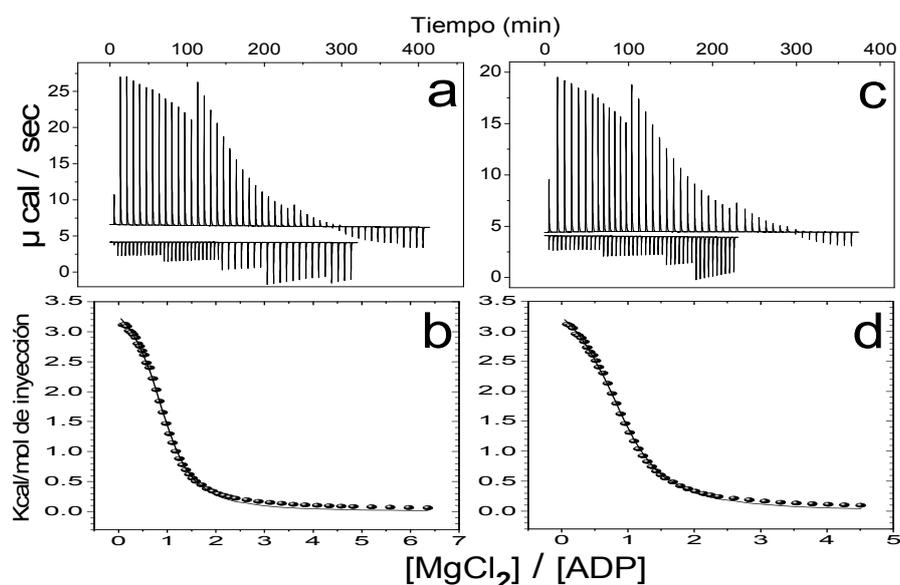


Figura 9. Resultados de cuantificaciones de CTI para la unión ADP-Mg a diferentes temperaturas, en la celda de muestra se colocó el ADP y fue titulado con $MgCl_2$. En **a y c**, se muestra el potenciograma diferencial con los datos crudos del ITC, en **b y d** la Isotherma de titulación. **a, b** experimento a 20° C (ADP 3.22, $MgCl_2$ 100mM). **c, d**: 25° C (ADP 2.62mM, $MgCl_2$ 100mM). El ADP y $MgCl_2$ fueron disueltos en Tris-HCl 50mM pH 8

Tabla 3. Parámetros termodinámicos para la unión ADP- $MgCl_2$ a pH 8.0

| Temperatura (°C) | 20 | 25 | 30 | 35 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| K_a (M^{-1}) | 2420 ± 110 | 2455 ± 108 | 2780 ± 150 | 2870 ± 170 |
| ΔG (kcal/ mol ⁻¹) | -4.54 | -4.62 | -4.77 | -4.87 |
| ΔH (kcal/ mol ⁻¹) | 3.66 ± 41 | 3.72 ± 40 | 3.90 ± 46 | 3.96 ± 49 |
| TΔS (kcal/ mol ⁻¹) | 8.203 | 8.342 | 8.679 | 8.838 |
| n | 0.947 ± 0.007 | 0.955 ± 0.007 | 0.986 ± 0.008 | 0.904 ± 0.008 |

En comparación a los valores observados para la unión del magnesio al nucleótido ATP, existe una mayor afinidad, en donde la $K_{a(ATP)}$ a 25°C es de $\approx 30,000 M^{-1}$, casi 10 veces mayor a la del ADP. Tal diferencia podría deberse a la presencia de una mayor cantidad de grupos polares negativos (oxígenos) en el fosfato- γ . Siendo las cargas adicionales susceptibles de formar un mayor número de interacciones, a las presentes en ADP, existiendo además la unión de un segundo Mg^{2+} , entre los fosfatos α y β del ATP. Valores obtenidos previamente para la unión de un solo magnesio al ATP se observan en la Tabla 5.

Tabla 4. Valores obtenidos para la formación del complejo ADP-Mg en estudios encontrados en la literatura

| (A) Constantes de formación (Ka) Mediante técnicas espectroscópicas | | | | | | |
|--|------|-------|-------|--------|-------|-------|
| T | 25 | | | 30 | | 35 |
| K | 5,30 | 2,200 | 2,200 | 12,882 | 2,400 | 3,000 |
| pH | 8.0 | 7-9 | 7.5 | 7 | 7.4 | 7-9 |
| Método | S | S | NMR | NMR | S | S |
| Ref. | 2 | 13 | 14 | 39 | 37 | 13 |

| (B) Parámetros termodinámicos previos, para la formación de ADP-Mg | | | | | | | | |
|---|-----|-----------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--|--------|--------|
| T (°C) | pH | Ka (M ⁻¹) | ΔH (kcal mol ⁻¹) | TΔS (kcal mol ⁻¹) | ΔG (kcal mol ⁻¹) | ΔCp (cal mol ⁻¹ K ⁻¹) | Método | Ref. |
| 30 | 8.5 | 4,950 | 3.15 | 8.271 | -5.12 | --- | C | 6 |
| 25 | | 1,479 | 3.61 | 7.93 | -4.32 | --- | P | 51, 49 |
| 75 | 8.5 | 77,624 | 8.34 ± 0.19 | 16.151 ± 0.71 | -7.81 | 92.29 ± 3.82 | C | 57 |
| 25 ** | | 18,620 | 3.70 | 9.514 | -5.83 | --- | | |

Referencias: **6**, Belaich, J. Sari, J. 1969; **57** Wang, P. *et al.*, 1995; **37**, O'Sullivan, W. Perrin, D. 1963; **49**, Smith, R. *et al.*, 1991; **2** Adolfsen, R. Moudrianakis, E. 1978; **13** Burton, K. 1959; **14** Cowan, J. 1991; **39** Pecoraro, V. *et al.*, 1984; **51** Taqui, M. y Martell, E. 1967. Métodos: **C**, Calorimétrico; **P**, Potenciométrico; **S**, Espectrofotométrico (apagamiento señal 8-hidroquinolina); **NMR**. Resonancia Magnética Nuclear. # K intrínseca. ** extrapolado Wang *et al.*, 1995

Tabla 5. Constantes de formación ATP-Mg²⁺ y n=1

| T (°C) | pH | Ka (M ⁻¹) | ΔH (kcal mol ⁻¹) | TΔS (kcal mol ⁻¹) | ΔG (kcal mol ⁻¹) | ΔCp (cal mol ⁻¹ K ⁻¹) | Método | Ref. |
|--------|-----|-----------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--|--------|---------------------------|
| 30 | | 49,300 | 4.47 | 10.97 | -6.51 | --- | C | 6 |
| 25** | | 673,752 | 6.42 | 8.4 | -1.98 | 49.91 | C | 57 |
| 30** | 8.5 | 770,371 | 6.70 | 8.8 | -2.1 | | | |
| 25 | | 173.78 | 3.4 ± 0.1 | 6.41 ± 0.5 | 3.10 ± 0.02 | --- | P | 50 |
| 25 | 8.0 | 30,800 ± 8600 | 4.0 ± 0.39 | 10.1 ± 0.3 | -6.2 | 40 ± 3 | C | Pulido et al (com. pers.) |
| 30 | 8.0 | 44,700 ± 5100 | 4.4 ± 0.4 | 9.8 ± 0.3 | -5.4 | | | |

Referencias: **6**, Belaich, J. Sari, J. 1969; **57** Wang, P. *et al.*, 1995; **50** Taqui, M. y Martell, E. 1966. Métodos: **C**, Calorimétrico; **P**, Potenciométrico; **S**, Espectrofotométrico (apagamiento señal 8-hidroquinolina); **NMR**. Resonancia Magnética Nuclear. ** extrapolado utilizando las formulas de Wang *et al.*

Para los complejos ADP-Mg y ATP-Mg⁺ existe una contribución entálpica desfavorable. Lo que indica una energía de interacción más desfavorable al formar el complejo, en comparación a la existente en las interacciones de las moléculas libres con el solvente. Sin embargo, se encuentran dirigidos entrópicamente, lo que podría sugerir una ganancia

en los grados de libertad de las moléculas de agua que estaban hidratando a las moléculas libres (ADP, ATP, Mg^{2+}).

A partir del cambio del ΔH con respecto a la temperatura, se calculó el valor de ΔC_p ($d(\Delta H)/dT$). Obteniendo un valor de $22 \pm 4.0 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (Figura 10). Este valor presenta una gran diferencia con el obtenido por Wang *et al.*, (1995) de $92.34 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. La disparidad de valores puede deberse al uso de calorimetría isotérmica de flujo por Wang *et al.* Además posibles fenómenos de agregación debido al apilamiento de los anillos de adenina y el amplio rango de temperatura del estudio de $25\text{-}125 \text{ }^\circ\text{C}$, donde posiblemente exista hidrólisis del nucleótido.

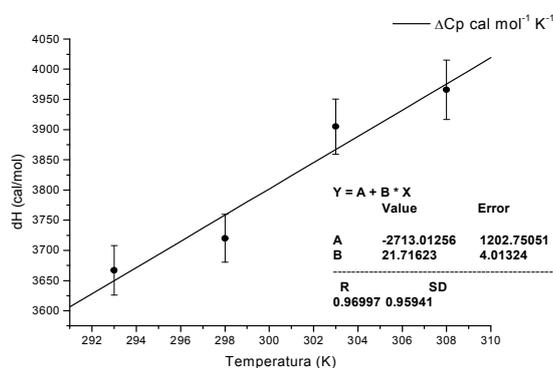


Figura 10. Gráfica entalpía contra temperatura, del proceso de unión ADP-Mg.

A partir de los valores obtenidos durante la formación de este complejo, es evidente que el quelado de cargas entre el magnesio y los fosfatos del ADP, es menos energético que la interacción de las especies libres con el solvente acuoso, debido a la pérdida de interacciones existentes entre catión-solvente y fosfatos-solvente, presentando la desolvatación del ADP y Mg^{2+} un valor absoluto de energía mayor (endotérmico), a la energía de interacción entre ambos (exotérmico).

Sin embargo, aunque el ΔH no es favorable, el proceso se encuentra promovido espontáneamente, por la liberación de moléculas de agua que se encuentran solvatando al catión y fosfatos (aumento en la entropía), generando así un ΔG favorable.

Además, considerando el ΔC_p del proceso, se refuerza la idea de la participación del fenómeno de deshidratación al observarse un valor positivo, que es indicativo de la liberación de aguas muy rigidificadas por la interacción con grupos polares.

5.2 Calorimetría subunidad T β (T β -ADP•Mg, T β -ADP)

De igual forma a los estudios anteriores para la unión de la subunidad T β con ADP•Mg (Pérez-Hernández *et al* 2002; Odaka *et al*, 1994), se observa un valor de entalpía (favorable), mayor a la magnitud de la entropía (desfavorable), por lo que la espontaneidad del proceso es dirigida entálpicamente (Tabla 6, Figura 11-A).

A diferencia de la unión de ADP•Mg, la unión de ADP a T β es menos afín (figura 11-B), con una K_a ($60,000 \text{ M}^{-1}$) menor a la existente en presencia del Mg^{2+} ($94,900 \text{ M}^{-1}$). Además, los cambios de entalpía y entropía son de igual forma menores a los observados para ADP•Mg, generando una entalpía menos favorable, para el proceso en ausencia del catión. Sin embargo, debido a la compensación entre entropía y entalpía, la espontaneidad de la reacción (ΔG) entre los procesos de unión T β -ADP y T β -ADP•Mg no varía mucho.

Comparando la unión de los nucleótidos ATP y ADP por T β , se observa que la diferencia en la entalpía de unión para el ADP en presencia y ausencia del metal es menor a la de ATP con y sin Mg^{2+} . El $\Delta[\Delta H]_{(\text{ADP-ADPMg})} = 1.49 \text{ kcal mol}^{-1}$, mientras que el $\Delta[\Delta H]_{(\text{ATP-ATPMg})} = 7.9 \text{ kcal mol}^{-1}$. Para la contribución entrópica, los valores también muestran diferencia, el $\Delta[T\Delta S]_{(\text{ADP-ADPMg})} = 1.22 \text{ kcal mol}^{-1}$, mientras el $\Delta[T\Delta S]_{(\text{ATP-ATPMg})} = 2.32 \text{ kcal mol}^{-1}$, aunque no es de la misma magnitud a la diferencia en entalpías.

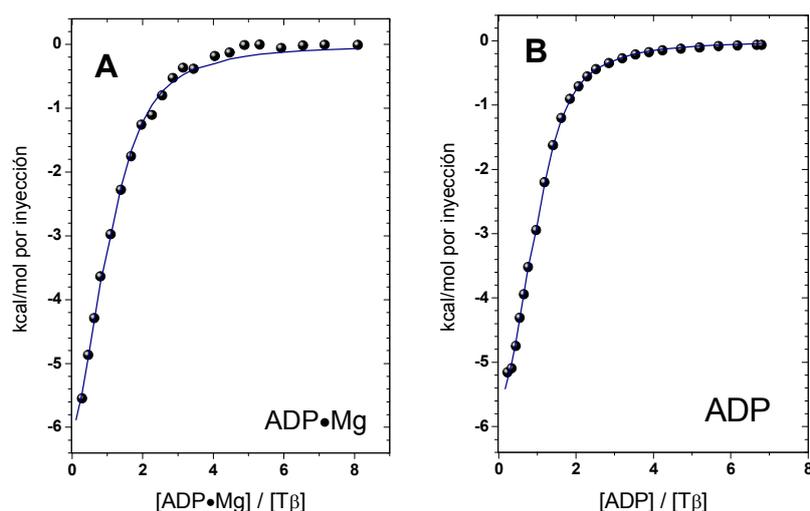


Figura 11. Isotermas de titulación para la unión de ADP•Mg y ADP a la subunidad β *Bacillus PS3*, a 25°C , en puntos se observan los valores de integración de cada pico de calor observado experimentalmente; la línea corresponde al mejor ajuste de la curva a un solo sitio de unión de acuerdo a la ecuación 12.

Tabla 6. Parámetros calorimétricos para la unión T β -nucleótidos en ausencia y presencia de Mg²⁺

| | T β - ADP | T β - ADPMg | T β - ADPMg _r | T β - ADPMg ^s | T β -ATPMg ^{2+P} | T β -ATP ^P |
|--|--|--|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| T (°C) | 25 | 25 | 25 | 21 | 25 | 25 |
| pH | 8 | 8 | 7.3 | 8 | 8 | 8 |
| K_a (M ⁻¹) | 6.01x10 ⁴ ±2.1x10 ³ | 9.49x10 ⁴ ±1x10 ⁴ | 9.17 x10 ⁴ ±80 | 6.8 x10 ⁴ | 6.1 x10 ⁴ | 1.3 x10 ⁴ |
| ΔH (kcal mol ⁻¹) | -7.09 | -8.59 | -9.47 ±0.05 | -9.8 ±0 | -11.30 | -2.7 |
| ΔS (kcal mol ⁻¹) | -0.58 | -1.78 | -2.70 | -3.52 | -4.80 | 2.6 |
| ΔG (kcal mol ⁻¹) | -6.52 | -6.79 | -6.77 ±0.04 | 6.27 | -6.5 | +5.85 |
| n | 0.943 ±0.01 | 0.967 ±0.04 | 0.98 ±0.03 | 1.09 ±0 | 0.99 ± 0.007 | 1.05 |

^r Pérez-Hernández *et al.*, 2002; ^s Odaoka *et al.*, 1994; ^P Pulido *et al.* por publicar.

5.3 Fluorescencia de la unión T β -ADP y T β -ADP•Mg

Los valores obtenidos a partir del apagamiento (Figura 12) de la señal de fluorescencia debida a la titulación de T β con ADP, en presencia y ausencia de Mg²⁺, se observan en la Tabla 7.

Tabla 7. Valores para la asociación fluorométrica de T β -ADP/ADP•Mg

| | ADP-Mg | ADP |
|------------------------|-------------------|--------------------|
| T (°C) | 25 | 25 |
| Apagamiento | 0.9770 ± 0.015 | 1.006 ± 0.011 |
| K_d | 0.00007 ± 4.91e-6 | 0.0001 ± 4.4115e-6 |
| (K_a) | (14,285) | (10,000) |
| R | 0.9768 | 0.9919 |

En general, las constantes de asociación determinadas fluorométricamente son más pequeñas a las observadas calorimétricamente. Aunque se aprecia una pequeña diferencia en la constante de apagamiento por la unión de ADP con y sin Mg²⁺, esta no es muy significativa ya que siendo el apagamiento máximo igual a 1, se observa la tendencia del apagamiento de la señal por la unión de ADP y ADP•Mg hacia este número, sin distintivo de la presencia o ausencia del metal. Esto puede deberse a un mayor fenómeno de dispersión al aumentar la concentración de ligando dentro de la celda; por lo que no se puede inferir sobre un posible cambio estructural asociado a la fluorescencia de las tirosinas presentes en T β , y en particular de la T β Y341, en la cual ocurre un apilamiento con el anillo de la adenina.

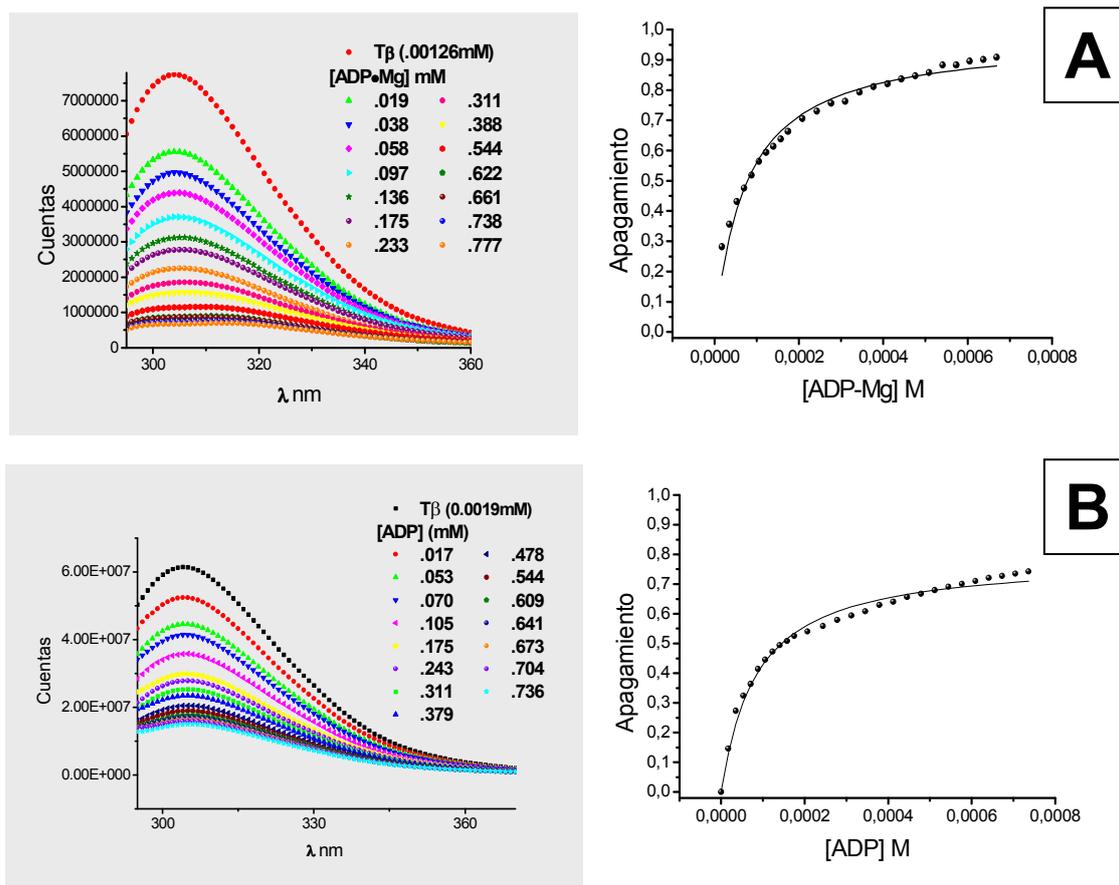


Figura 12. Apagamiento de la señal de fluorescencia, para la unión de (A) ADP·Mg y (B) ADP, a la subunidad β de termófilo. En ambos casos las graficas de apagamiento se ajustaron a la ecuación 13 (línea). Al inicio la concentración de T β fue de 1.2 μ M y se adicioneo ligando (ADP, ADP·Mg) en inyecciones hasta 700 μ M.

5.4 Parámetros termodinámicos para la unión T β -ADPMg, por modelos de área superficial

Mediante el programa NACCESS, se determinó el ASA para las cadenas β_{DP} y β_E obtenidas de la estructura de F₁ de bovino (1BMF), con la que existe un 78% de similitud. A partir de ésta cadenas, se calculó el Δ ASA para la unión de ADP·Mg a la subunidad β de F₁.

El Δ ASA_{total} fue de 740Å² de la cual el Δ ASA_{pol} = -368Å² y el Δ ASA_{np} = -372Å². Los valores debidos al cambio polar y no polar fueron sustituidos en las ecuaciones 7 y 8, para determinar el Δ Cp y el Δ H de unión asociados a un cambio estructural, en donde se observó una diferencia de 2.54 kcal mol⁻¹ en el valor de Δ H_{calculado} (= -11,129 cal mol⁻¹) y el Δ H_{experimental} (= -8,588 cal mol⁻¹). Sin embargo, para el Δ Cp se observa de igual forma diferencia entre el Δ Cp_{experimental} (= -36 cal mol⁻¹K⁻¹) determinado por Pérez-Hernández et

al. (2002) y el ΔC_p calculado (= $-65 \text{ cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$), que pudiera deberse a la parametrización de la contribución de cada grupo, que se utilizó para calcular el ASA.

5.5 Papel energético del Mg^{2+}

Con los parámetros termodinámicos para el equilibrio de cada uno de los procesos, se determinó a partir del rearrreglo de las ecuaciones de Hess el papel energético del magnesio (Figura 13). En este se observa una contribución entálpica desfavorable, que implica la necesidad de una cantidad de energía mayor para la desolvatación del catión, a la cantidad de energía ganada por la interacción dentro del sitio de unión de la proteína. Sin embargo aunque existe pérdida de energía debido a la interacción, la ganancia en entropía debido a la liberación de moléculas de agua que solvatan al catión, dirige la formación del complejo $\text{T}\beta\text{-ADP-Mg}$. De hecho se observa la dirección entrópica del proceso ($\Delta G = -4.89 \text{ kcal mol}^{-1}$), con un $T\Delta S = 7.12 \text{ kcal mol}^{-1}$. Este resultado contrasta con el obtenido de forma similar para el ATP (Figura 14), en donde el proceso se encuentra dirigido tanto entálpica como entrópicamente (Pulido et al., por ser publicado), mostrando un mayor peso del Mg^{2+} para el caso del ATP, con una posible relación directa al sitio de unión, donde existen residuos con cargas negativas, actuando en la disminución de la mayor repulsión de los tres fosfatos del ATP comparado con los dos fosfatos del ADP.

| | | ΔH (kcal mol^{-1}) | | $T\Delta S$ (kcal mol^{-1}) | | ΔG (kcal mol^{-1}) | |
|----|---|--|-------|---|-------|--|-------|
| | | Exp. | a | Exp. | a | Exp. | a |
| 1) | $\text{T}\beta + \text{ADP}\cdot\text{Mg} \longrightarrow \text{T}\beta\text{-ADP}\cdot\text{Mg}$ | -8.58 | -9.47 | -1.79 | -2.70 | -6.79 | -6.77 |
| 2) | $\text{T}\beta\cdot\text{ADP} \longrightarrow \text{T}\beta + \text{ADP}$ | 7.09 | | 0.57 | | 6.52 | |
| 3) | $\text{ADP} + \text{Mg}^{2+} \longrightarrow \text{ADP}\cdot\text{Mg}$ | 3.72 | | 8.34 | | -4.62 | |
| 4) | $\text{T}\beta\cdot\text{ADP} + \text{Mg}^{2+} \longrightarrow \text{T}\beta\text{-ADP} + \text{Mg}^{2+}$ | 2.23 | 1.34 | 7.12 | 5.07 | -4.89 | -4.37 |

Figura 13. Parámetros termodinámicos para la energética del magnesio obtenidos para las ecuaciones de Hess de la unión $\text{T}\beta\cdot\text{ADP} + \text{Mg}^{2+}$. (Exp.) Experimentales; (a) comparados con los observados por Pérez-Hernández *et al*, 2002 (solo valores para la ecuación 1).

| | ΔH (kcal mol ⁻¹) | | $T\Delta S$ (kcal mol ⁻¹) | | ΔG (kcal mol ⁻¹) | |
|--|---|------|--|-------|---|-------|
| | P | O | P | O | P | O |
| 1) $T\beta + ATP \cdot Mg \longrightarrow T\beta \cdot ATP \cdot Mg$ | -11.3 | 12.0 | -4.77 | -5.58 | -6.53 | -6.5 |
| 2) $T\beta \cdot ATP \longrightarrow T\beta + ATP$ | | 3.4 | | -2.45 | | 5.85 |
| 3) $ATP + Mg^{2+} \longrightarrow ATP \cdot Mg^{2+}$ | | 4.0 | | 10.1 | | -6.03 |
| 4) $T\beta \cdot ATP + Mg^{2+} \longrightarrow T\beta \cdot ATP + Mg^{2+}$ | -3.9 | -4.6 | 2.78 | 1.97 | -6.71 | -6.68 |

Figura 14. Parámetros termodinámicos para la energética del magnesio obtenidos para las ecuaciones de Hess de la unión $T\beta \cdot ATP + Mg^{2+}$. (P.) Pulido *et al*, por publicar; (O) Odaka *et al*, 1994 (solo ecuación 1).

Capítulo VI

CONCLUSIONES

El papel energético que juega el magnesio dentro del sitio de unión de la subunidad β , tiene contribuciones entálpicas y entrópicas, que dirigen el ΔG de forma diferente. La existencia de un ΔH positivo (desfavorable) en la integración del magnesio, para formar el complejo $T\beta\cdot ADP\text{-Mg}$, implica una interacción menos energética en el complejo, que la interacción de las especies libres con el solvente ($T\beta\cdot ADP + Mg^{2+}$). En contraste, datos obtenidos en nuestro laboratorio muestran que el ΔH de incorporación del Mg^{2+} al complejo $T\beta\cdot ATP$ es favorable. Esto indica la importancia de la presencia del fosfato- γ , lográndose por la presencia del Mg^{2+} una mayor complementariedad estereoquímica en el reconocimiento de ATP dentro de $T\beta$.

Por otro lado, la incorporación del Mg^{2+} al complejo $T\beta\cdot ADP$ resultó estar entrópicamente dirigida. El cambio de entropía en la formación de complejos involucra tanto cambios conformacionales, como de solvatación. Dado que existe un fenómeno de unión, es de esperarse que el término conformacional sea desfavorable, siendo por tanto la solvatación la que dirige el proceso.

En el caso del ATP el cambio de entropía también es favorable, pero de menor magnitud. La diferencia en el cambio de entropía entre $T\beta\cdot ADP$ y $T\beta\cdot ATP$ puede explicarse por un cambio en los términos de conformación y solvatación. Debido a que la existencia del fosfato- γ en el ATP implicaría una mayor desolvatación al unirse el magnesio. Por lo tanto, la diferencia en el ΔS se debe a una mayor disminución en los grados de libertad para la integración del magnesio al complejo $T\beta\cdot ATP$, siendo congruente con datos espectroscópicos anteriores.

El intentar asociar la parte energética con un cambio conformacional, mediante fluorescencia, no fue posible debido al cambio mínimo observado en la señal de fluorescencia de las tirosinas presentes en la subunidad, con respecto a la presencia del metal. Aunque si se observa un apagamiento mayor en la unión de ADP comparado con ATP, que podría explicarse por la menor distancia a la que se encuentra el nucleótido ADP de la $M\beta Y345$, en comparación al ATP.

Capítulo VII

PERSPECTIVAS

- Caracterización de los parámetros termodinámicos a diferentes temperaturas de la unión T β -ADP.
- Determinación del cambio estructural de la subunidad β al unir nucleótidos mediante resonancia magnética nuclear con y sin magnesio.
- Realizar análisis estructural detallado mediante cambio de áreas con los distintos cristales, de diferentes especies y que presentan varios ligandos y análogos.
- Obtención de la energética de unión de ADP con y sin Magnesio al sector F₁ de la ATP-sintasa a diferentes temperaturas.

Apéndice A

Soluciones

| Medio de cultivo LB (1L) | |
|---------------------------------|-----|
| Extracto de levadura | 5g |
| Triptona | 10g |
| NaCl | 5g |

| Amortiguador A (DEAE) | |
|------------------------------|---------------|
| Reactivo | Concentración |
| Tris-SO ₄ pH 8 | 20mM |
| EDTA | 1mM |
| Filtrar y degasificar | |

| Amortiguador A (Mono Q) | |
|--------------------------------|---------------|
| Reactivo | Concentración |
| Tris-HCl pH 7.3 | 20mM |
| EDTA | 1mM |
| Filtrar y degasificar | |

| Amortiguador B (DEAE) | |
|------------------------------|---------------|
| Reactivo | Concentración |
| Tris-SO ₄ pH 8 | 20mM |
| EDTA | 1mM |
| NaCl | 1M |
| Filtrar y degasificar | |

| Amortiguador B (Mono Q) | |
|--------------------------------|---------------|
| Reactivo | Concentración |
| Tris-HCl pH 7.3 | 20mM |
| EDTA | 1mM |
| NaCl | 1M |
| Filtrar y degasificar | |

| Amortiguador de Lisis | |
|------------------------------|---------------|
| Reactivo | Concentración |
| Tris-SO ₄ pH 8 | 20mM |
| EDTA | 1mM |
| p-aminobenzamida | 6mM |
| NaCl | 5mM |
| Glicerol | 10% v/v |

Geles de poliacrilamida (Laemli, 1970).

Amortiguador gel separador

| | |
|----------------------------|------|
| Tris base | 1.5M |
| SDS | 14mM |
| Se ajusto a pH 8.8 con HCl | |

Amortiguador gel concentrador

| | |
|----------------------------|------|
| Tris base | 0.5M |
| SDS | 14mM |
| Se ajusto a pH 6.8 con HCl | |

Acrilamida 30%

| | |
|---------------------|------|
| Acrilamida | 4.3M |
| Bis-acrilamida | 52mM |
| Filtrar (poro 11µm) | |

Gel separador 12%

| | |
|----------------------------|-------|
| Agua | 2.5mL |
| Acrilamida 30% | 3.0mL |
| Amortiguador gel separador | 1.9mL |
| Persulfato de amonio 10% | 50µL |
| TEMED | 5.0µL |

Gel concentrador 5%

| | |
|----------------------------|--------|
| Agua | 1.0mL |
| Acrilamida 30% | 0.44mL |
| Amortiguador gel separador | 0.3mL |
| Persulfato de amonio 10% | 30µL |
| TEMED | 5.0µL |

Amortiguadores corrida electroforesis.

Amortiguador del anodo (-)

| | |
|-----------|-------|
| Tris base | 200mM |
|-----------|-------|

Se ajusto a pH 8.4 con HCl

Amortiguador del catodo (+)

| | |
|-----------|--------|
| Tris base | 1. 5M |
| Tricina | 100mM |
| SDS 10% | 0.35mM |

Se ajusto a pH 8.25 con HCl

Mezcla de digestión

| | |
|-------------------------------|--------|
| Glicerol | 1. 1M |
| SDS | 69.5mM |
| Azul de Bromofenol | 0.3mM |
| Amortiguador gel concentrador | 1.25% |

Adicionar 1 μ L de β -mercptoetanol por 20 μ L de solución.

Azul de Coomassie para teñir geles

| | |
|-------------------------|--------|
| Azul de Coomassie G-250 | 1. 5M |
| Isopropanol | 100mM |
| Ácido acético | 0.35mM |

Posteriormente se filtró.

El gel concentrador se corrió a 80 Volts por 20 minutos. El gel separador se corrió entre 100-120 Volts.

Apéndice B

Fluorescencia

La fluorescencia es una categoría de luminiscencia, que ocurre típicamente en estados excitados por la absorción de energía y el regreso a un estado energético basal (emisión), por el cual el sistema pierde energía. Ocurre generalmente en moléculas aromáticas y experimentalmente se representa con los espectros de emisión. Este espectro de emisión es una gráfica de la intensidad de fluorescencia contra la longitud de onda.

El proceso que ocurre entre la absorción y emisión de la luz es usualmente representado con un diagrama de Jabłonski (Figura B-1). En el diagrama la transición entre estados es representado como líneas verticales, en donde la absorción en moléculas de un estado de energía basal (S_0) ocasiona un salto a energías vibracionales de estados más energéticos (S_2 , S_1). Posterior a la absorción de luz, las moléculas se relajan al nivel de energía vibracional mas bajo de S_1 , en un proceso denominado conversión interna. Debido a que la velocidad de este proceso es de 10^{-12} s, comparado con los 10^{-8} s del tiempo de vida del fluoróforo, la emisión ocurre generalmente del estado vibracional de menor energía de S_1 , en donde hay un equilibrio (vibracional), hacia el mismo nivel energético del estado S_0 .

En el espectro de emisión de fluorescencia se observa que la energía es menor a la de absorción (cambio de Stokes) y dependiente de la polaridad del solvente. La pérdida de energía entre la excitación y emisión se observa de forma universal en moléculas fluorescentes, lo cual es debido a la pérdida de energía del electrón que sufre mientras se encuentra en S_1 . Además del cambio de Stokes la pérdida de energía también puede deberse a efectos del solvente, reacciones del estado excitado, formación de complejos y transferencia de energía.

En fluorometría, los espectros de mayor interés son los de las regiones de la luz visible y ultravioleta, en donde los cuantos absorbidos causan la excitación de la mayoría de los electrones de las moléculas. Así, las moléculas excitadas pueden disipar su energía por descomposición, reacción o re-emisión, observándose un decaimiento en la fluorescencia (apagamiento). La colisión es otro fenómeno que causa un apagamiento, en

donde el contacto con moléculas en solución, denominadas apagadores, ocasiona el regreso del fluoróforo al estado energético basal de manera no radiativa.

A partir de este fenómeno de apagamiento se puede obtener información sobre procesos moleculares en solución, así como del ambiente químico promedio adyacente al fluoróforo.

En bioquímica, los fluorofóros se pueden dividir en 2 clases generales: intrínsecos y extrínsecos. Los intrínsecos son aquellos que se presentan naturalmente, como el grupo indol del triptofano, fenol de la tirosina y benceno de la fenilalanina. En el caso de los extrínsecos, son los que se agregan a la muestra que no muestra propiedades de fluoróforo, como son los colorantes de DNA (acridina y bromuro de etidio) ó, ANS (8-anilino-1-naftalensulfonato), TNS (2-*p*-toluidinil-6-naftaleno de ácido sulfónico) en proteínas.

INSTRUMENTACIÓN.

La fuente de luz que convierte energía eléctrica en radiación entre el rango 200nm a 900nm, es afectada a través del monocromador de excitación, el cual permite el paso selectivo de longitudes de onda centradas en el rango de excitación. Posteriormente, el haz pasa por una rendija (slit) que controla la magnitud y resolución de la luz transmitida. La luz filtrada pasa a través de la muestra, la cual fluoresce y la señal es detectada a través del monocromador de emisión colocado a 90° para evitar el ruido generado por la llegada del haz incidente. El monocromador de emisión (dinodo) selecciona longitudes de onda centradas en el rango de emisión, y posterior al paso de una rendija llega al fotomultiplicador (FTM). En el FTM los fotones que salen del monocromador golpean el cátodo fotoemisivo generando electrones secundarios acelerados a través de electrodos (dinodos), produciendo una cascada de amplificación que genera un voltaje como señal que es enviada al sistema computacional (Figura B-2).

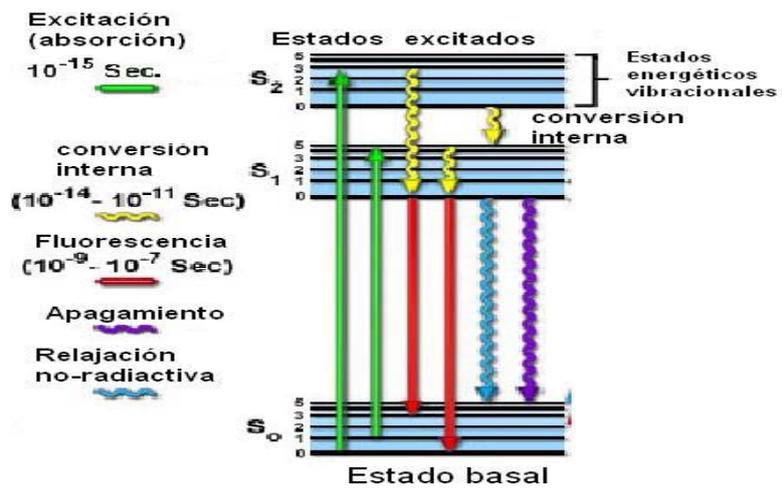


Figura B-1. Diagrama Jablonsky

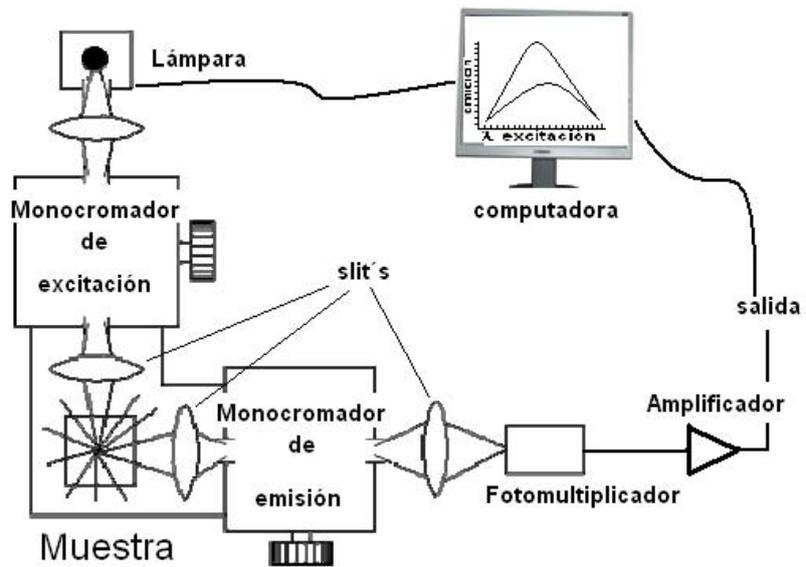


Figura B-2. Fluorómetro

Apéndice C

Bacillus termofilico PS3.

Es una bacteria perteneciente al dominio Bacteria; phylum, Firmicutes (gram-positivo), clase: Bacilli, orden: Bacillales; familia: Bacillaceae; genero: Bacillus; especie: PS3.

Los organismos termófilos habitan en un rango temperatura de 41°C a 70°C, con un óptimo entre 55 y 58 °C, esto se debe a que presenta proteínas que tienen un mejor funcionamiento en el rango de temperatura óptima y son más estables a la temperatura con respecto a proteínas mesofílicas. También presentan membranas con una mayor proporción de lípidos y saturadas de ácidos grasos. La forma que presentan es de bastón con una longitud entre 0.5µm y 20µm; y son capaces de formar endosporas que pueden sobrevivir a temperaturas mayores a 100°C.

Usualmente son encontrados en el suelo, fuentes termales y materia en descomposición (Prescott, L. 1999; Pomerville, J. 2004).

Abreviaciones

ATP: Adenosín Trifosfato.

ADP: Adenosín Difosfato.

ASA: Superficie de Área Accesible al Solvente.

Δ ASA: Cambio de Superficie de Área Accesible al Solvente.

E β : Subunidad β de la ATP-sintasa de *Escherichia coli*.

EF₁: Sector F1 de la ATP-sintasa de *Escherichia coli*.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

AMP-PNP: Análogo de ATP (5'-adenil-ilimido-diphosphate).

M β : Subunidad β de la ATP-sintasa de corazón de bovino.

T β : Subunidad β de la ATP-sintasa de *Bacillus PS3*.

Pi: Fosfato inorgánico.

kDa: kiloDaltons.

$\Delta\psi$: Potencial electroquímico.

CTI: Calorimetría de Titulación Isotérmica.

FCCP: Carbonil cianuro de paratriluoro etoxifenilhidrazona.

DCCD: Diciclohexilcarbodiimida.

Bibliografía

1. Abrahams, J. Leslie, A. Lutter, R. Walker, J. 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*. 370: 594-595.
2. Adolfsen, R. Moudrianakis, E. 1978. Control of Complex Metal Ion Equilibria in Biochemical Reaction Systems. *J. Biol. Chem.* Vol. 253, pp. 4378-4379.
3. Altendorf, K. Stalz, W. Greie, J. Deckers-Hebestreit, G. 2000. Structure and function of the F₀ Complex of the ATP synthase from *Escherichia coli*. *Journal of Experimental Biology*. Vol. 203, pp 19-28.
4. Andrew, J. Rodgers, W. Capaldi, R. 1998. The second stalk composed of the b- and δ-subunits connects F₀ to F₁ via an α-subunit in the *Escherichia coli* ATP synthase. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 273: 45, pp 29406-29410.
5. Baker, B. Murphy, K. 1998. Prediction of binding energetics from structure using empirical parameterization. *Methods in enzymology*. Vol. 295, pp 294-315.
6. Belaich, J. Sari, J. 1969. Microcalorimetric Studies on the Formation of Magnesium Complexes of Adenine Nucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 64, No 2, pp. 763-770.
7. Bianchet, M. Hüllihen, J. Pedersen, P. Amzel, M. 1998. The 2.8-Å structure of rat liver F₁-ATPase: configuration of a critical intermediate in ATP synthesis/hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 95, pp. 11065-11070.
8. Boyer, P. 1993. The binding change mechanism for ATP synthase some probabilities and possibilities. *Biochimica et biophysica acta*. Vol. 1140: 3, pp. 215-250.
9. Boyer, P. 1997. The ATP synthase- a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* Vol 66, pp. 717-749.
10. Boyer, P. 2000. Catalytic site forms and controls in ATP synthase catalysis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1458: 252-262.
11. Boyer P. 2002. Catalytic site occupancy during ATP synthase catalysis. *FEBS Lett.* 512, pp. 29-32.
12. Bugard, S. Jürguen, H. Sauer, H. Kagawa, Y. Schäfer, H. Wise, J. Vogel, P. Trommer, W. 1994. Effects of magnesium ions on the relative conformation of nucleotide binding sites of F₁ ATPases as studied by electron spin resonance spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 269: 27, pp 17815-17819.
13. Burton, K. 1959. Formation constants for the complexes of adenosine di- or tri-phosphate with magnesium or calcium ions. *Biochem Journal*. Vol. 71: 2, pp 388-395.
14. Cowan, J. 1991. Metallobiochemistry of magnesium. Coordination complexes with biological substrate: site specificity, kinetics and thermodynamics of binding, and implications for activity. *Inorg. Chem.* Vol. 30, pp 2740-2747.
15. Cowan, J. 2002. Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. *Biometals*. Vol. 3, pp. 225-35.
16. Creighton, T. 1993. *Proteins, structure and molecular properties*. W. H. Freeman. New York. pp. 139-165.
17. Fersht, A. 1999. *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*. W. H. Freeman.
18. Fisher, H. Singh, N. 1995. Calorimetric methods for interpreting protein-ligand interaction. *Methods in Enzymology*, Vol. 259: 194-222.

19. Freire, E. 2004. Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. *Drug Discovery Today: Technologies*. Vol. 1, No 3, pp. 295-299.
20. Gomez, J. Hilser, V. Xie, D. Freire, E. 1995. The Heat Capacity of Proteins. *Proteins: Struct. Func. Genet.* Vol. 22, pp. 404-412.
21. Groth, G. Pohl, E. 2001. The structure of chloroplast F1-ATPase at 3.2 Å resolution. *Journal of biological Chemistry*. Vol. 276, 2, pp. 1345-1352.
22. Hans-Jürgen, H. 1983. Thermodynamic of protein-ligand interactions: Calorimetric Approaches. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 12: 285-317.
23. Hardin, S. Chowdhry, B. 2001. Protein ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry. Oxford University Press.
24. Janin, J. 1995. Principles of protein-protein recognition from structure to thermodynamics. *Biochimie*. Vol. 77, No 7-8, pp. 497-505.
25. Kehres, D. Maguire, M. 2002. Structure, properties and regulation of magnesium transport proteins. *Biometals*. Vol. 15, pp. 261-270.
26. Lehninger, A. 2001. Principios de Bioquímica 3ª edición. Omega.
27. Lakowicz, J. 1999. Principles of fluorescence spectroscopy. Kluwer Academic /Plenum Publishers.
28. Murphy, K. Freire, E. 1992. *Adv. Protein Chem.* 43:313-361.
29. Nájera, H. Vázquez-Contreras, E. Tuena de GómezPuyou, M. Perez-Hernandez, G. 1999. Nucleotide binding drives conformational changes in the isolated α and β subunits of the F1-ATPase from *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 266, pp. 58-61.
30. Nakamoto, R. Ketchum, C. Al-Shawi, M. 1999. Rotational coupling in the F0F1 ATP synthase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* Vol. 28, pp. 205-234.
31. Noji, H. Yasuda, R. Yoshida, M. Moyoijima, F. Kinosita, K. 1997. Direct observation of the rotation F₁-ATPase. *Nature*. 386: 299-302.
32. O'Brien, R. Ladbury, J. Chowdhry, B. 2001. Isothermal titration calorimetry. In "A Practical Approach to Protein-Ligand Interactions". Editor S. E. Harding & B. Z. Chowdhry. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK. pp. 263-286.
33. Odaka, M. Kaibara, C. Amano, T. Matsui, T. Muneyuki, E. Ogasahara, K. Yutani, K. Yoshida, M. 1994. Tyr-341 of the β Subunit Is a Major Km Determining Residue of TF₁-ATPase: Parallel Effect of Its Mutations on K_{d(ATP)} of the β Subunit and on K_{m(ATP)} of the $\alpha_3\beta_3\gamma$ Complex. *J. Biochem.* 115: 789-796.
34. Ohta, S. Yohda, M. Ishizuka, M. Hirata, H. Hamamoto, T. Otawara, Y. Matsuda, K. Kagawa, Y. 1988. Sequence and over-expression of subunits of adenosine triphosphate synthase in thermophilic bacterium PS3. *Biochim. et Biophys. Acta* 933; 141-155.
35. Oestreich, C. Jones, M. 1967. The effect of metal ions on labile phosphates, the role of the metal ion. *Biochemistry*. Vol. 6, No 5, pp. 1515-9.
36. Oster, G. Wang, H. 2000. Reverse engineering a protein: the mechanochemistry of ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1458, pp. 482-510.
37. O'sullivan, W. Perrin, D. 1964. The stability constants of metal-adenine nucleotide complexes. *Biochemistry*. Vol. 3, pp.18-26.
38. Papa, S. Guerrieri, F. Tager, J. Frontiers of cellular bioenergetics molecular biology, biochemistry, and physiopatology. Klumer Academic/Plenum Publishers. New York. 1999. Pp. 367-451.

39. Pecoraro, V. Hermes, J. Cleland, W. 1984. Stability constants of Mg^{2+} and Cd^{2+} complexes of adenine nucleotides and thionucleotides and rate constants for formation and dissociation of MgATP and MgADP. *Biochemistry*. Vol. 23, pp 5262-5271.
40. Penefsky, H. 1979. Mitochondrial ATPase. *Adv. Enz.* Vol. 49, pp. 223-280
41. Pérez-Hernández, G. García-Hernández, E. Zubillaga, R. Tuena de Gómez-Puyou, M. 2002. Structural energetics of MgADP binding to the isolated β subunit of F_1 -ATPase from thermophilic Bacillus PS3. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 408: 177-183.
42. Pierce, M. Raman, C. Nall, T. 1999. Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions. *Methods*: 19; 213-221.
43. Prescott, L. Haley, J. Klein, D. 1999. *Microbiology*. 4ta edición, McGraw Hill. USA.
44. Pommerville, J. 2004. *Alcamos: Fundamentals of microbiology*. 7ma Edición. Jones and Bartlett Publishers. Londres UK.
45. Pu, J. Karplus, M. 2008. How subunit coupling produces the γ -subunit rotary motion in F_1 -ATPase. *PNAS*. Vol. 105: 4, pp 1192-1197.
46. Senior, A. Nadanaciva, S. Weber, J. 2002. The molecular mechanism of ATP synthesis by F_1F_0 -ATP synthase. *Biochim Biophys Acta*. 1553: 188-211.
47. Shigeyuki, K. Yoshida, M. Kato-Yamada, Y. 2007. Role of the ϵ Subunit of Thermophilic F_1 -ATPase as a Sensor for ATP. *J. Biol. Chem.* Vol. 282: 52, pp 37618-37623.
48. Shirakihara, Y. Leslie, A. Abrahams, J. Walker, J. Ueda, T. Sekimoto, Y. Kambara, M. Saika, K. Kagawa, Y. Yoshida, M. 1997. The crystal structure of the nucleotide-free $\alpha_3\beta_3$ subcomplex of F_1 -ATPase from the thermophilic Bacillus PS3 is a symmetric trimer. *Structure*. Vol. 5, No 6, pp. 825-36.
49. Smith, R. Martell, A. Chen, Y. 1991. Critical Evaluation of stability constants for nucleotide complexes with protons and metal ions and the Accompanying Enthalpy Changes. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 63, No. 7, pp. 1015-1080.
50. Taqui, M. Marthell, A. 1966. Thermodynamic Quantities associated with the interaction of adenosine triphosphate with metal ions. *Journal of the American Chemical Society*. Vol 88: 4, pp 668-671.
51. Taqui, M. Marthell, A. 1967. Thermodynamic Quantities associated with the interaction of adenosinediphosphoric and adenosinemonophosphoric acids with metal ions. *Journal of the American Chemical Society*. Vol 89: 22, pp 5585-5590.
52. Tran-Dinh, S. Neumann, J. 1977. ^{31}P -NMR study of the interaction of Mg^{2+} ions with nucleoside diphosphates. *Nucleic Acids Res.* Vol. 4, No 2, pp. 397-403.
53. Velázquez-Campoy, A. Leavitt, S. Freire, E. (2004). Characterization of protein-protein interactions by Isothermal Titration Calorimetry. *Methods in Molecular Biology: Protein-protein interactions, Methods and applications*. Emory University School of Medicine, Atlanta, USA. Pp. 35-54.
54. Velázquez-Campoy, A. Freire, E. 2005. ITC in the post-genomic era...? *Priceless Biophysical Chemistry*. Vol. 115, No 2, pp. 115-124.
55. Voet, D. Voet, J. 1995. *Biochemistry*. John Wiley y Sons. New York.
56. Walker, S. Saraste, M. Runswick, M. Gay, M. 1982. Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal*. Vol. 1, No 8, pp. 945-951.
57. Wang, P. Oscarson J. Izatt, R. Watt, G. Larsen, C. 1995. Thermodynamic parameters for the interaction of adenosine 5'-diphosphate, and adenosine 5'-triphosphate with Mg^{2+} from 323.15 to 398.15 K. *Journal of solution chemistry*. Vol. 24, No 10, pp. 989-1012.

58. Weber, J. Senior, A. 1997. Review: Catalytic mechanism of F₁-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*: 1319; 19-58.
59. Weber, J. Hammond, S. Wilke-Mounts, S. Senior, A. 1998. Mg²⁺ Coordination in Catalytic Sites of F₁-ATPase. *Biochemistry*. Vol. 37, No 2, pp. 608 –614.
60. Yagi, H. Tozawa, K. Sekino, N. Iwabuchi, T. Yoshida, M. Akutsu, H. 1999. Functional Conformation Changes in the F₁-ATPase β Subunit Probed by 12 Tyrosine Residues. *Biophysical J.* 77: 2175-2183.
61. Yoshida, M. Muneyuki, E. Hisobari, T. 2001. ATP synthase – A marvellous rotatory engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*2, 669-677.
62. Young, K. Hong, S. Pedersen, L. 1999. Chemical Mechanism of ATP Synthase: Magnesium plays a pivotal role in formation of the transition state where ATP is synthesized from ADP and inorganic phosphate. *J. Biol. Chem.* Vol. 274, No 41, pp. 28853-28856.