



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**UN/M  
POSGRADO** 

*Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias  
Bioquímicas*

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Caracterización energética de la asociación de  
nucleótidos de Adenosina con la  
Subunidad  $\beta$  de la ATP sintasa de *Bacillus PS3***

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**  
**(BIOQUÍMICAS)**  
P R E S E N T A:  
**NANCY OLIVIA PULIDO MAYORAL**

**Asesor: Dr. Enrique García Hernández**



México, DF, Noviembre 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Enrique García Hernández. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto PAPIIT IN205712 y IN204609, así como del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología proyecto 129239 y beca para realizar los estudios de doctorado 158817.

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Enrique García Hernández en el laboratorio de Bioquímica del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou	Instituto de Fisiología, UNAM
Dr. Enrique García Hernández	Instituto de Química, UNAM
Dr. Miguel A. Costas Basin	Facultad de Química, UNAM

A quienes con su participación ayudaron al comienzo, desarrollo y conclusión de éste proyecto: Dr. Enrique García Hernández, Dr. Gerardo Pérez-Hernández.

A la Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou y al Dr. Armando Gómez Puyou por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio realizando experimentos y por su calidez.

A la QFB Beatriz Aguirre López del Instituto de Fisiología Celular por su asistencia Técnica.

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

Se reconoce la asesoría de la C. Leticia García por su incansable apoyo en los trámites administrativos de la presente tesis.

Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto PAPIIT IN205712 y IN204609, así como del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología proyecto 129239 y beca para realizar los estudios de doctorado 158817.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Miguel Costas Basin	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Rafael Zubillaga Luna	U. A. Metropolitana-Iztapalapa
Secretario	Dr. Abel Moreno Cárcamo	Instituto de Química, UNAM
Suplente	Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dr. José de Jesús García Trejo	Facultad de Química, UNAM

## ÍNDICE

INDICE	I
INDICE DE FIGURAS	II
INDICE DE TABLAS	IV
RESUMEN	V
ABREVIATURAS	VI
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Planteamiento del problema</b>	<b>8</b>
<b>Objetivos</b>	<b>10</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>12</b>
<i>Expresión heteróloga de la subunidad <math>\beta</math> de Bacillus PS3 (<math>T\beta</math>)</i>	12
<i>Purificación de la subunidad recombinante</i>	12
<i>Preparación de las muestras para el análisis calorimétrico.</i>	15
<i>Calorimetría de titulación isotérmica (CTI)</i>	15
<i>Fluorescencia</i>	21
<i>Cálculo de cambios de área accesible al solvente (<math>\Delta</math>ASA)</i>	21
<b>Resultados</b>	<b>23</b>
<i>Termodinámica de la unión de ATP y <math>Mg \cdot ATP</math> a la subunidad <math>T\beta</math> aislada</i>	24
<i>Fluorescencia</i>	27
<b>Discusión</b>	<b>29</b>
<i>Diferencias energéticas y estructurales entre los complejos <math>T\beta</math>-<math>Mg \cdot ATP</math> y <math>T\beta</math>-<math>Mg \cdot ADP</math></i>	29
<i>Energética del reconocimiento de unión de nucleótidos de <math>Mg(II)</math> por la subunidad <math>T\beta</math> aislada.</i>	34
<i>Papel energético del <math>Mg</math> en el reconocimiento de ATP por el sitio catalítico en <math>F_1</math></i>	39
<b>Conclusiones</b>	<b>44</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>45</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>46</b>
<b>Apéndice (Figuras)</b>	<b>50</b>
<b>Artículo</b>	<b>55</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

---

<b>Figura 1.</b> Modelo estructural de la ATP sintasa ( $F_1F_0$ ) de <i>E. coli</i> tomada de Senior <i>et al.</i> 2002	2
<b>Figura 2.</b> A) Unión de ATP a sitio catalítico de la mutante $\beta Y331W$ de $F_1$ (Tomada de Senior <i>et al.</i> , 1998). B) Efecto del sulfato en la unión del ATP al sitio catalítico de $\beta Y331W$ -EcF1. Tomada de Bulygin y Milgrom (2007).	6
<b>Figura 3.</b> Ecuaciones de Hess para la unión $T\beta$ -ATP $\cdot$ Mg.	10
<b>Figura 4.</b> Perfiles cromatográficos para la purificación de $T\beta$ . <b>a)</b> Columna DEAE Macroprep; <b>b)</b> Columna Mono Q.	13
<b>Figura 5.</b> Geles de poliacrilamida al 12%. a) Muestras del gradiente de la columna DEAE. b) Muestras del gradiente de la columna Mono Q.	14
<b>Figura 6.</b> Isotermas calorimétricas para la formación de los complejos de $T\beta$ -ATP, $T\beta$ -Mg $\cdot$ ATP, Mg-ATP y $Mg_2$ -ATP a 25 °C.	24
<b>Figura 7.</b> Entalpías de unión como función de la temperatura para los complejos $T\beta$ -ATP, $T\beta$ -Mg $\cdot$ ATP, Mg-ATP y $Mg_2$ -ATP.	25
<b>Figura 8.</b> Isotermas de unión $T\beta$ -ATP a) y $T\beta$ -Mg $\cdot$ ATP b) construidas de mediciones fluorométricas.	28
<b>Figure 9.</b> Firmas termodinámicas para los complejos $T\beta$ -Mg $\cdot$ ATP y $T\beta$ -Mg $\cdot$ ADP determinadas a 25°C utilizando calorimetría de titulación isotérmica.	31
<b>Figura 10.</b> a) Potenciograma diferencial mostrando los datos crudos de la unión $T\beta$ -ATP, experimento realizado a 15°C. b) Isotherma de titulación, el mejor ajuste a los datos experimentales se observó al utilizar un modelo un solo tipo de sitio.	50
<b>Figura 11.</b> a) Potenciograma diferencial mostrando los datos crudos de la unión $T\beta$ -ATP, experimento realizado a 20°C. b) Isotherma de titulación.	51
<b>Figura 12.</b> a) Potenciograma diferencial mostrando los datos crudos de la unión $T\beta$ -ATP, experimento realizado a 30°C. b) Isotherma de titulación.	51

<b>Figura 13.</b> a) Potenciograma diferencial mostrando los datos crudos de la unión $T\beta$ -Mg $\cdot$ ATP, experimento realizado a 15°C. b) Isoterma de titulación, el mejor ajuste a los datos experimentales se observó al utilizar un modelo un solo tipo de sitio.	<b>52</b>
<b>Figura 14 .</b> a) Potenciograma diferencial mostrando los datos crudos de la unión $T\beta$ -Mg $\cdot$ ATP, experimento realizado a 20°C. b) Isoterma de titulación.	<b>52</b>
<b>Figura 15.</b> a) Potenciograma diferencial mostrando los datos crudos de la unión $T\beta$ -Mg $\cdot$ ATP, experimento realizado a 30°C. b) Isoterma de titulación.	<b>53</b>
<b>Figura 16.</b> a) Potenciograma diferencial mostrando los datos crudos de la unión ATP-Mg, experimento realizado a 30°C. b) Isoterma de titulación, el mejor ajuste a los datos experimentales se observó al utilizar un modelo de sitios secuenciales.	<b>53</b>
<b>Figura 17.</b> a) Potenciograma diferencial mostrando los datos crudos de la unión ATP-Mg, experimento realizado a 35°C. b) Isoterma de titulación.	<b>54</b>
<b>Figura 18.</b> a) Potenciograma diferencial mostrando los datos crudos de la unión ATP-Mg, experimento realizado a 40°C. b) Isoterma de titulación.	<b>54</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

---

---

<b>Tabla 1.</b> Parámetros termodinámicos para la unión de Mg(II) al ATP a diferentes temperaturas mediante CTI	<b>23</b>
<b>Tabla 2.</b> Parámetros termodinámicos para la unión de Mg ·ATP o ATP a T $\beta$ obtenidos a diferentes temperaturas mediante CTI.	<b>26</b>
<b>Tabla 3.</b> Comparación de los parámetros termodinámicos para la unión de Mg ·ATP a T $\beta$ utilizando diferentes modelos de ajuste.	<b>27</b>
<b>Tabla 4.</b> Parámetros de cooperatividad termodinámica para la interacción heterotrópica en la unión de Mg(II) y nucleótidos a T $\beta$ a 25°C	<b>27</b>
<b>Tabla 5.</b> Resultados obtenidos de la titulación por fluorescencia de T $\beta$ con ATP y Mg·ATP.	<b>29</b>
<b>Tabla 6.</b> Cambios de área superficial y estimación del $\Delta C_{p_b}$ basados en cambios estructurales para la formación de los complejos T $\beta$ -Mg ·ADP y T $\beta$ -Mg ·ATP.	<b>33</b>
<b>Tabla 7.</b> Parámetros termodinámicos para la unión de Mg(II ). A) T $\beta$ ·ATP; B) T $\beta$ ·ADP.	<b>36</b>
<b>Tabla 8.</b> Energética de unión para los sitios catalíticos de F <sub>1</sub> .	<b>41</b>



## ABREVIATURAS

---

---

Mg (II)	Ión Magnesio libre
AMPPNP	5'-adenil-imido-diphosphate
Pi	Fosfato inorgánico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
TF <sub>1</sub>	Sector F <sub>1</sub> de la ATP sintasa de <i>Bacillus PS3</i>
EF <sub>1</sub>	Sector F <sub>1</sub> de la ATP sintasa de <i>E. coli</i>
CTI	Calorimetría de Titulación Isotérmica
Kb	Constante de unión proteína-ligando
ΔHb	Entalpía de unión proteína-ligando
ΔGb	Energía libre de Gibbs de la unión proteína-ligando
ΔSb	Entropía de unión proteína-ligando
ΔCpb	Capacidad calorífica de la unión proteína-ligando
ΔHint	Entalpía intrínseca
ΔHdsol	Entalpía de desolvatación
ΔSconf	Entropía conformacional
ΔSsolv	Entropía de solvatación
ΔSr-t	Entropía roto-traslacional
β <sub>DP</sub>	Subunidad β uniendo Mg·ADP
β <sub>TP</sub>	Subunidad β uniendo Mg·AMPPNP
β <sub>E</sub>	Subunidad β sin nucleótido
K <sub>b1</sub> y K <sub>b2</sub>	Constantes de asociación para la interacción de ATP con Mg(II)
K <sub>p1</sub> y K <sub>p2</sub>	Constantes de asociación para ATP y ATP·Mg respectivamente
α	Constante de asociación heterotrópica
ΔA	Cambios de área superficial
Δc <sub>pi</sub>	Capacidad calorífica específica para el área superficial de tipo <i>i</i>
Δh	Entalpía cooperativa
Δs	Entropía cooperativa

## RESUMEN

---

---

Los cambios conformacionales inducidos por la unión de nucleótidos a la subunidad catalítica  $\beta$  juegan un papel crucial en el mecanismo de rotación del sector  $F_1$  de la ATP sintasa. Con la finalidad de ganar conocimiento sobre las bases energéticas que gobiernan el reconocimiento de nucleótidos por la subunidad  $\beta$  aislada a partir de la bacteria termofílica *Bacillus PS3*, se realizó una caracterización de la unión de este monómero a nucleótidos de adenosina unidos a Mg(II) y sin Mg(II) utilizando calorimetría de titulación isotérmica de alta precisión. Las interacciones de Mg(II) con ATP y ADP fueron medidas también calorimétricamente. Se desarrolló un modelo que considera simultáneamente las interacciones de la subunidad  $T\beta$  con  $Mg \cdot ATP$  o con ATP, y que el ATP es capaz de unir dos Mg(II) de forma secuencial para determinar los parámetros de la formación del complejo  $T\beta-Mg \cdot ATP$  utilizando datos calorimétricos. Este análisis mostró diferencias significativas en los valores de  $\Delta H_b$  y  $\Delta S_b$  con relación a los obtenidos utilizando un modelo de unión de un solo tipo de sitio, mientras que el valor de  $\Delta G_b$  fue muy similar en ambos casos.

Utilizando este nuevo modelo ternario se reanalizaron los datos calorimétricos para la formación del complejo  $T\beta-Mg \cdot ADP$  (Pérez-Hernández *et al.*, (2002) *Arch. Biochem. Biophys.* 408, 177-183) obteniendo nuevos parámetros de unión. Las interacciones de  $T\beta$  con  $Mg \cdot ATP$ , ATP,  $Mg \cdot ADP$  y ADP fueron entálpicamente conducidas. Se observaron diferencias considerables en los parámetros termodinámicos entre los complejos  $T\beta-Mg \cdot ATP / T\beta-ATP$  a diferencia de las observadas entre los complejos  $T\beta-Mg \cdot ADP / T\beta-ADP$  o entre  $T\beta-Mg \cdot ATP / T\beta-Mg \cdot ADP$ . Los datos de unión obtenidos para los complejos estudiados, en conjunto con los obtenidos para la asociación del Mg (II) libre con los nucleótidos, permitió realizar una determinación energética de los efectos del ión metálico en el reconocimiento de los nucleótidos de adenosina por  $T\beta$  ( $T\beta \cdot AT(D)P + Mg(II) \rightleftharpoons T\beta \cdot AT(D)P-Mg$ ).

La contribución entálpica favorable observada para la unión, mostró que el Mg (II) es reconocido por el complejo  $T\beta \cdot ATP$  con mayor avidez que por el complejo  $T\beta \cdot ADP$ , indicando una mejor complementariedad estereoquímica. El análisis energético-estructural sugiere que  $T\beta$  adopta una conformación más cerrada cuando une  $Mg \cdot ATP$  que con ATP o  $Mg \cdot ADP$ , lo cual coincide con lo reportado recientemente en estudios realizados con RMN (Yagi *et al.* (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 2374-2382). Utilizando datos publicados, se realizó un análisis similar considerando los efectos energéticos del Mg(II) sobre el cambio de energía libre en los sitios catalíticos de  $F_1$ .

**ABSTRACT.** Nucleotide-induced conformational changes of the catalytic  $\beta$  subunits play a crucial role in the rotary mechanism of  $F_1$ -ATPase. To gain insights into the energetic bases that govern the recognition of nucleotides by the isolated  $\beta$  subunit from thermophilic *Bacillus PS3* ( $T\beta$ ), the binding of this monomer to Mg(II)-free and Mg(II)-bound adenosine nucleotides was characterized using high-precision isothermal titration calorimetry. The interactions of Mg(II) with free ATP or ADP were also measured calorimetrically. A model that considers simultaneously the interactions of  $T\beta$  with Mg·ATP or with ATP, and that ATP is able to bind two Mg(II) sequentially, was used to determine the formation parameters of the  $T\beta$ -Mg·ATP complex from calorimetric data. This analysis yielded significantly different  $\Delta H_b$  and  $\Delta S_b$  values in relation to those obtained using a single binding site model, while  $\Delta G_b$  was almost unchanged. Published calorimetric data for the titration of  $T\beta$  with Mg·ADP (Pérez-Hernández *et al.*, (2002) *Arch. Biochem. Biophys.* 408, 177-183) were re-analyzed with the ternary model to obtain the corresponding true binding parameters. Interactions of  $T\beta$  with Mg·ATP, ATP, Mg·ADP or ADP were enthalpically driven. Larger differences in thermodynamic properties were observed between  $T\beta$ -Mg·ATP /  $T\beta$ -ATP complexes than between  $T\beta$ -Mg·ADP /  $T\beta$ -ADP or between  $T\beta$ -Mg·ATP /  $T\beta$ -Mg·ADP complexes. These binding data, in conjunction with those for the association of Mg(II) with free nucleotides, allowed for a determination of the energetic effects of the metal ion on the recognition of adenosine nucleotides by  $T\beta$  (i.e.,  $T\beta \cdot AT(D)P + Mg(II) \rightleftharpoons T\beta \cdot AT(D)P-Mg$ ). Due to a more favorable binding enthalpy, Mg(II) is recognized more avidly by the  $T\beta$ ·ATP complex, indicating better stereochemical complementarity than in the  $T\beta$ ·ADP complex. Furthermore, a structural-energetic analysis suggests that  $T\beta$  adopts a more closed conformation when it is bound to Mg·ATP than to ATP or Mg·ADP, in agreement with recent NMR data (Yagi *et al.* (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 2374-2382). Using published binding data, a similar analysis of Mg(II) energetic effects was performed for the free energy change of  $F_1$  catalytic sites, in the framework of bi-site or tri-site binding models.

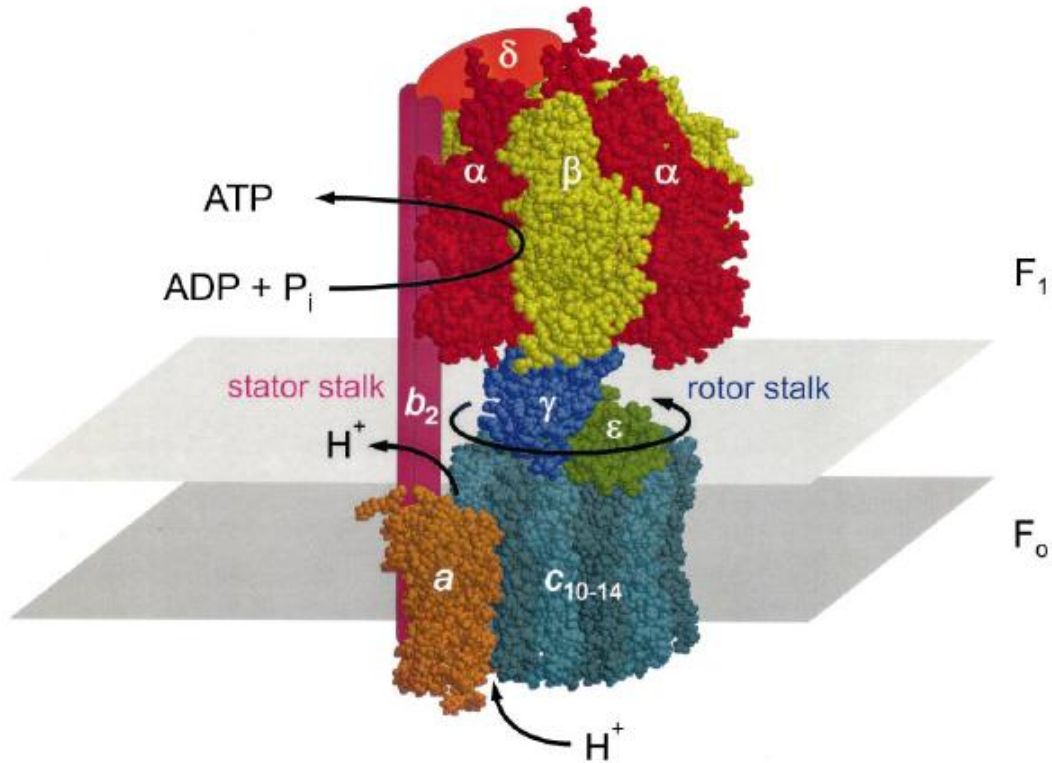
## INTRODUCCIÓN

---

Históricamente, el proceso catalítico de la síntesis de ATP tomó relevancia al descubrirse que la energía de hidrólisis de esta molécula sirve como combustible básico en la mayoría de procesos moleculares endergónicos que ocurren dentro de los organismos vivos. Dado el papel crucial del ATP como combustible químico vital, es claro que su producción requiere ser eficiente y bien controlada. En este sentido, la fosforilación oxidativa es reconocida como una ruta metabólica altamente optimizada para la producción de ATP. La implicación biológica de esta vía de síntesis de ATP puede ser apreciada, por ejemplo, en el éxito evolutivo de los organismos aerobios con respecto a los anaerobios.

A lo largo de la ruta de fosforilación oxidativa, las actividades de diversos complejos proteicos se concatenan para generar un gradiente transmembranal de protones. En concordancia con la teoría quimio-osmótica, este gradiente electroquímico es aprovechado para la generación de ATP a partir de ADP y Pi. La enzima responsable del acoplamiento entre el gradiente transmembranal y la síntesis de ATP es conocida como ATP-sintasa.

Las ATP-sintasas de diferentes especies son similares entre sí. La enzima es un complejo proteico multimérico, compuesta por un sector inmerso en la membrana, denominado  $F_0$ , y un sector soluble catalítico o  $F_1$  (*Figura 1*). Aunque con variantes especie-específicas; la forma más simple de la ATP sintasa en procariotas esta formada por ocho diferentes subunidades con estequiometría  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon -ab_2c_{10-14}$ , que se mantiene a lo largo de la escala filogenética. Su peso molecular es de aproximadamente 530 kDa (Senior *et al.* 2002; Yoshida *et al.*, 2001).



**Figura 1.** Modelo estructural de la ATP sintasa ( $F_1F_0$ ) de *E. coli* tomada de Senior *et al.* 2002

La ATP sintasa es un complejo tripartita, formado por 1) un rotor transmembranal que convierte la energía del gradiente electroquímico en movimiento, 2) un dispositivo de rotación, el cual transmite la energía mecánica de torque a los sitios catalíticos a una distancia mayor a los 100 Å, y 3) los tres sitios catalíticos, donde la energía mecánica de la rotación se convierte en la unión química entre el ADP-O y el fósforo inorgánico (Pi). El centro catalítico de la enzima es  $\alpha_3\beta_3\gamma$ , que consiste en un hexágono donde se alternan las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  con hélices de la subunidad  $\gamma$  en el centro inmersas en el centro del hexágono. Cada sitio catalítico se encuentra en la interfase entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la enzima, aunque con una fuerte preponderancia de residuos provenientes de la subunidad  $\beta$  (Senior *et al.* 2002).

Para explicar el funcionamiento catalítico de  $F_1$ , Boyer (1993) propuso el *mecanismo de unión alternante*, el cual involucra el cambio conformacional cooperativo de las tres subunidades  $\beta$ , presentando cada una de éstas diferente afinidad por los nucleótidos. Boyer encontró que las subunidades  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  giran como un cilindro asimétrico, resultando en una interacción alternante con los tres pares de subunidades  $\alpha$ - $\beta$ . Esta rotación induce cambios estructurales

en la subunidad  $\beta$ , lo cual conduce a las diferencias en la capacidad de unión durante el curso cíclico. Esto fue corroborado utilizando la primera estructura cristalográfica de  $F_1$  (Abrahams *et al.*, 1994), la cual muestra los tres sitios catalíticos en diferentes conformaciones. Recientemente, este mecanismo recibió una sólida comprobación experimental. A través de un ingenioso diseño experimental, Noji *et al.* (1997) unieron covalentemente una sonda fluorescente a la subunidad  $\gamma$  del complejo  $\alpha_3\beta_3\gamma$  de la ATP-sintasa de *Bacillus PS3*. Al agregarse ATP a la solución, fue posible observar directamente la rotación de la sonda, evidenciando que el *mecanismo de cambio de unión de ligando* involucra la rotación de la subunidad  $\gamma$  en el centro de  $\alpha_3\beta_3$  (Hasler *et al.*, 1998).

Hasta la fecha, han sido resueltas las estructuras cristalográficas por rayos X de  $F_1$  de diferentes especies. En particular, la estructura de  $F_1$  de mitocondria de corazón de res ( $MF_1$ ) resultó muy valiosa en la postulación del posible mecanismo estructural que subyace al mecanismo rotatorio de la enzima (Abrahams *et al.*, 1994). En  $MF_1$ , cada subunidad  $\beta$  aparece con una conformación diferente: una con conformación abierta y libre de nucleótido ( $\beta_E$ ), otra con conformación semiabierta uniendo ADP-Mg ( $\beta_{DP}$ ), y la tercera en conformación cerrada uniendo AMP-PNP-Mg ( $\beta_{TP}$ ), un análogo no hidrolizable del ATP-Mg. Estas estructuras han sido correlacionadas con los estados conformacionales alternantes por los cuales podría transitar cada una de las subunidades  $\beta$  a lo largo de la rotación de la subunidad  $\gamma$  (Masaike *et al.*, 2000). En el inicio del ciclo catalítico en el sentido de la hidrólisis, una subunidad  $\beta$  une ATP, adquiriendo la conformación ( $\beta_{TP}$ ), y produciéndose con ello un giro de  $120^\circ$  en la subunidad  $\gamma$ . En un segundo paso, la subunidad  $\beta$  genera la ruptura del ATP, adoptando la conformación  $\beta_{DP}$ , y provocando un segundo giro de  $120^\circ$  de la subunidad  $\gamma$ . Finalmente, se completa una revolución de la subunidad  $\gamma$  al ser liberado el nucleótido hidrolizado, regresando la subunidad  $\beta$  a su forma abierta ( $\beta_E$ ). Esta secuencia se repite de manera alternada en cada una de las tres subunidades  $\beta$  de  $F_1$ , de manera que durante el funcionamiento de la enzima las tres subunidades  $\beta$  presentan conformaciones diferentes.

Shirakihara *et al.* (1997) reportaron la estructura cristalográfica del subcomplejo  $\alpha_3\beta_3$  de  $F_1$ -ATPasa de *Bacillus PS3* termofilo ( $TF_1$ ) en ausencia de nucleótidos. En esta estructura se observa a las tres subunidades  $\beta$  adoptando la conformación abierta ( $\beta_E$ ) de  $MF_1$ , apareciendo

por tanto como un cilindro simétrico. Si bien este estudio demostró que este cilindro es estable en ausencia de la subunidad  $\gamma$ , estudios de unión en solución indican que el hexámero se disocia en pares  $\alpha$ - $\beta$  al unir al nucleótido.

Existen reportes en donde se muestra que el cofactor Mg(II) de la  $F_1F_0$ -ATP sintasa es requerido para la asimetría de los sitios catalíticos que conducen a las diferencias observadas en la afinidad por nucleótidos. La asimetría de los sitios catalíticos que es necesaria para el mecanismo de cambio de unión depende de la subunidad  $\gamma$  y del Mg (II). En ausencia del Mg (II) y de  $\gamma$ , la estructura cristalografica del complejo  $\alpha_3\beta_3$  de *Bacillus* PS3 presenta la misma simetría (como se observa en la estructura  $TF_1$ ). En la estructura de hígado de rata ( $F_1$ ), que fue cristalizada en ausencia de Mg (II) las tres subunidades  $\beta$  unen nucleótido y adoptan conformaciones similares, independientemente de la presencia de la subunidad  $\gamma$ . Estas evidencias parecen demostrar que para que se presente el mecanismo de cambio de unión de ligando, es necesario la presencia de la subunidad  $\gamma$  y del ión Mg (II).

Bowler *et al.* (2007) determinaron la estructura de la  $MF_1$ -ATPasa cristalizada en presencia de AMP-PNP y ADP, pero en ausencia de azida de sodio. Esta estructura ha sido determinada a 1.9 Å de resolución y fue comparada con la descrita previamente –también de bovino– pero con una resolución de 2.8 Å utilizando los mismos parámetros de cristalización, pero en presencia de azida. Las dos estructuras presentan muchas similitudes, pero difieren en la unión de los nucleótidos. En la estructura no inhibida por azida, las subunidades  $\beta_{TP}$  y  $\beta_{DP}$  son ocupadas por AMP-PNP, mientras que en la primera estructura el sitio  $\beta_{DP}$  era ocupado por ADP, ya que esta última unión es favorecida por la azida. La conformación de la cadena lateral del residuo  $\alpha$ -Arg 373 difiere tanto en la subunidad  $\beta_{DP}$  como en la  $\beta_{TP}$ . Esta nueva estructura representa el estado intermedio en el ciclo catalítico de la hidrólisis del ATP, y se le ha denominado como estructura de “estado basal”.

Algunas de las características que se han observado en esta enzima son la cooperatividad positiva para la catálisis, en donde la ocupación de 2 ó 3 sitios presenta un aumento en relación a la actividad unisito de 100 ó 1000 veces más en la velocidad de hidrólisis de estado estacionario, en *E. coli* y el complejo de mitocondria, respectivamente. De manera contraria, la

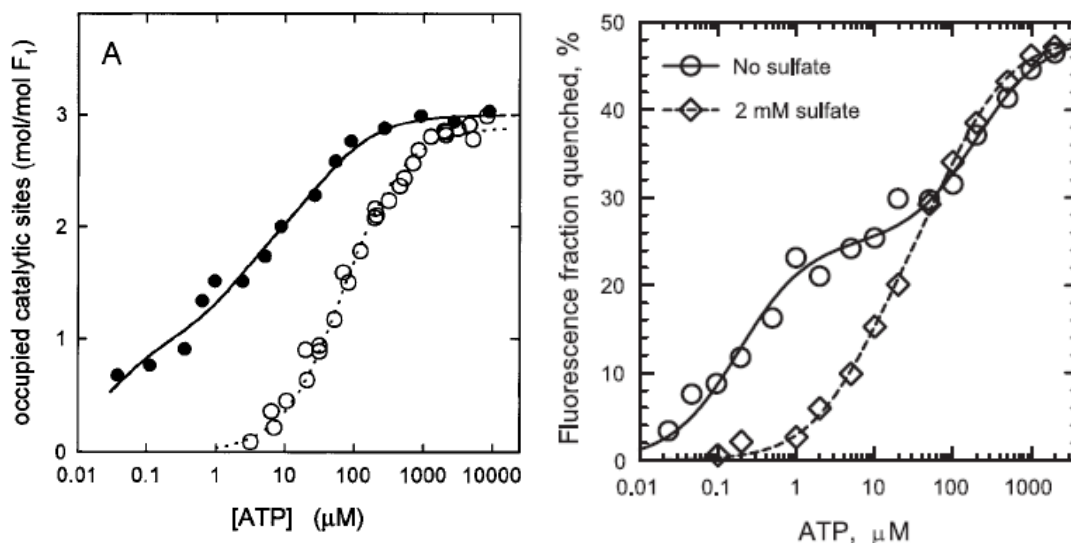
unión de los nucleótidos en los diferentes sitios presenta una cooperatividad negativa, con decrementos de alrededor de un orden de magnitud en las constantes de asociación de los sitios catalíticos subsecuentes. En los sitios no catalíticos se observa una constante de disociación ( $K_d$ ) de muy alta afinidad para la unión de MgATP, y poco se sabe sobre la unión de MgADP (Weber et al. 1998).

Para la ATP-sintasa, la presencia de magnesio también es un factor importante en el reconocimiento. Además de ser indispensable para que se realice la actividad catalítica, el ión metálico aumenta la afinidad por los nucleótidos dentro de los sitios. El efecto de la presencia o ausencia del ion Mg (II) sobre la  $K_d$  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  $\beta$  de *E. coli* (E $\beta$ Y331W). Las constantes observadas para Mg•ATP son de 0.028, 2.1 y 39 $\mu$ M para los sitios 1, 2 y 3, respectivamente. Por tanto, la afinidad de los complejos Mg•ATP difiere en más de 3 órdenes de magnitud entre los sitios con alta y baja afinidad. En la unión de ADP•Mg, se observaron  $K_d$  de 0.14 $\mu$ M para el sitio 1 y de 20 $\mu$ M para los sitios 2 y 3 (Weber et al., 1998)

Se ha considerado que el ión Mg (II) juega un papel crucial en la inducción de asimetría entre los sitios catalíticos. De acuerdo a Senior y sus colaboradores, en ausencia de Mg (II) la afinidad de los tres sitios catalíticos es baja e idéntica,  $K_d$  [ATP,ADP]  $\sim$  80  $\mu$ M (Figura 2A). Estos estudios inicialmente sugirieron fuertemente que los cambios en la coordinación del metal dentro del sitio catalítico juegan un papel crítico en los cambios conformacionales que experimenta la proteína y que promueven la unión o la liberación del ATP a partir de la enzima (Frasch, 2000; Antes et al., 2003). Sin embargo, en las estructuras cristalográficas reportadas por Shirakihara et al. (1997) y Menz et al. (2001) se observa la presencia de un ión sulfato unido a los sitios catalíticos ( $\beta_{DP}$  y  $\beta_{TP}$ ) en el caso de la primera (complejo  $\alpha_3\beta_3$  de  $TF_1$ ) y en los sitios en los que no une nucleótido ( $\beta_E$ ) para la segunda ( $MF_1$ ), lo cual podría haber afectado los resultados observados con la mutante  $\beta$  Y331W-EcF1, en los cuales el sulfato fue ocupado como cosoluto. Realizando mediciones fluorimétricas obtenidas con la mutante  $\beta$ Y331W de  $F_1$  de *E. coli* (EcF1) en ausencia de sulfato, Bulygin y Milgrom (2007) muestran que la unión de ADP, ATP y Mg•ADP a los sitios catalíticos es claramente bifásica (Figura 2B). El sulfato reduce la afinidad de la unión de los nucleótidos a los sitios catalíticos, lo cual



se refleja en un incremento de la  $K_d$  aparente y en el enmascaramiento de las diferencias en las afinidades de los diferentes sitios. Los resultados de Bulygin y Milgrom muestran inequívocamente que el Mg(II) no es requerido para la asimetría de los tres sitios catalíticos.



**Figura 2.** A) Unión de ATP a sitio catalítico de la mutante  $\beta\text{Y331W}$  de  $F_1$ ; • unión en presencia de 2.5 mM de  $\text{Mg}^{2+}$ ; ° unión en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$  (Tomada de Weber *et al.*, 1998). B) Efecto del sulfato en la unión del ATP al sitio catalítico de  $\beta\text{Y331W-EcF1}$ . Tomada de Bulygin y Milgrom (2007).

Las diferencias en las afinidades de los tres sitios catalíticos se observan en presencia o ausencia del metal, indicando que esta asimetría no es dictada por el magnesio, si no por diferencias estructurales *per se* en la enzima, relacionadas con la forma asimétrica de la subunidad  $\gamma$ . En presencia de magnesio se observan dos sitios de unión al ADP, el primer tipo de sitio une ADP con una  $K_d$  10  $\mu\text{M}$  y se intercambia rápidamente con los nucleótidos del medio, mientras que el segundo tipo de sitio une el ADP con una  $K_d$  100  $\mu\text{M}$  y se intercambia lentamente. En ausencia de magnesio, desaparece el sitio de alta afinidad y sólo el sitio no intercambiable puede unir ADP con una afinidad mayor a la presentada en presencia de magnesio (Bulygin y Milgrom, 2007; Kabaleeswaran *et al.* 2009; Weber *et al.* 1998).

En el caso particular de la ATP sintasa, el papel que juega el Mg(II) es fundamental para conocer el funcionamiento preciso de esta enzima. En *E.coli* se han identificado los residuos

$\beta$ Thr156,  $\beta$ Glu185 y  $\beta$ Asp242 en el reconocimiento del magnesio. El residuo  $\beta$ Thr156 es el último residuo en el loop P (responsable del reconocimiento de los fosfatos) y podría participar en suplir parcialmente la primera capa de solvatación del magnesio, ya que el oxígeno del grupo oxidrilo se encuentra a 2.3 Å de distancia del metal (Weber *et al.*, 1998). Otro de los residuos ubicados dentro del sitio de unión es la  $\beta$ -Lys-155, cuya principal interacción es con el fosfato  $\gamma$  del ATP y es de suma importancia en el sitio 1 (el sitio de alta afinidad) y en el sitio 2. El residuo  $\beta$ Asp242 presenta una interacción importante con el  $Mg^{+2}$  en el sitio 1, no así con el sitio 2 y 3. El  $\beta$ Glu181 contribuye poco a la unión del nucleótido: su principal efecto en la catalisis deriva en la reacción química *per se* (Löbau, S., *et al.* 1997). Algunos otros residuos que se han mutado y tienen efectos sobre el reconocimiento de Mg(II) incluyen a  $\beta$ Glu181, que tiene un efecto estabilizador del estado de transición;  $\beta$ K155 y  $\beta$ E192, con efectos en la unión de ATP o ADP - Pi, el primero presente en el loop-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 existencia de 2 conformaciones distintas del sitio catalítico (Senior 1992).

Por otro lado, datos estructurales obtenidos mediante ESR (resonancia paramagnética del espin), muestran diferencias con la presencia del ión Mg(II), el cual induce un cambio conformacional significativo en la enzima (Burgard, S. *et al* 1994). Yagi *et al.* (1999) realizaron estudios monitoreando los 12 residuos de tirosina de la subunidad aislada  $\beta$  de *Basillus PS3* (T $\beta$ ), utilizando resonancia magnética nuclear (RMN). Se estudió las conformaciones que adquiere esta subunidad dependiendo de la unión de ATP o ADP con o sin Mg(II). Los autores observaron una similitud entre las conformaciones adoptadas por los complejos T $\beta$ -ATP y T $\beta$ -ADP•Mg, la cual es diferente con respecto a la conformación observada para T $\beta$ -ATP•Mg(II). Más recientemente, Yaggi *et al.* (2009) corroboraron que la unión del Mg-ATP induce un cambio conformacional alrededor del residuo de Tyr-307 (311 para MF<sub>1</sub>), mientras el Mg-ADP no produce este cambio. Por tanto, este estudio sugiere la importancia del Mg(II) en la adquisición de una conformación en particular de la subunidad  $\beta$ .

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

Si bien en términos estructurales y dinámicos han existido progresos importantes en nuestra comprensión sobre el funcionamiento de la ATP sintasa, el papel que juegan las diversas fuerzas de cohesión en la estabilidad y conducción dinámica del sistema sigue aún por ser elucidado. Esta situación es debida básicamente a las considerables dificultades experimentales para realizar caracterizaciones energéticas de un sistema estructuralmente tan complejo. Esta situación a su vez ha impedido la caracterización del sistema más allá de los cambios de energía libre de unión a nucleótidos. Al desconocerse las correspondientes contribuciones entálpicas y entrópicas a la estabilidad, es sumamente difícil poder discernir sobre qué tipos de fuerzas son las dominantes en el proceso.

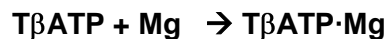
Una estrategia adecuada para el estudio de sistemas de gran complejidad es su disección en subsistemas de menor tamaño, siempre y cuando éstos conserven propiedades relevantes a la actividad original. Afortunadamente, éste es el caso para la ATP sintasa. Por un lado, ha sido demostrado que los sectores  $F_0$  y  $F_1$  son fácilmente desacoplables. En su forma disociada,  $F_0$  sigue siendo capaz de translocar protones, en tanto que  $F_1$  conserva intacta la capacidad de hidrolizar ATP. Por otro lado, ha sido encontrado que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  en forma aislada adoptan un estado monomérico bajo el cual conservan la capacidad de unir nucleótidos con alta especificidad (Mills y Richter, 1991). Estudios de unión por resonancia magnética nuclear mostraron que la subunidad  $\beta$  aislada sufre un cambio conformacional sustancial en la unión a nucleótidos, en el cual presumiblemente está involucrado el movimiento tipo bisagra observado en  $F_1$  (Yaggi *et al.*, 1999). Evidencias fluorométricas sugieren que este tipo de cambio conformacional puede estar también presente en la unión de nucleótidos por parte de la subunidad  $\alpha$  (Nájera-Peña *et al.*, 1999).

Recientemente, en nuestro grupo de trabajo fue realizado un estudio de la asociación de  $T\beta$  con ADP·Mg mediante calorimetría de titulación isotérmica de alta precisión (Pérez-Hernández *et al.*, 2002). El proceso resultó ser entálpicamente conducido, sugiriendo que las interacciones polares juegan un papel preponderante en la afinidad de  $T\beta$  por el nucleótido. Por otro lado, el  $\Delta C_p$  asociado a la unión fue pequeño ( $-36 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ). Haciendo uso de

modelos de área superficial, fue posible mostrar que esta energética de unión es consistente con las diferencias conformacionales de la subunidad  $\beta$  entre su conformación abierta y unida a ADP-Mg. Así, el estudio constituyó una evidencia energético-estructural de que la subunidad  $\beta$  en su forma aislada sufre el mismo tipo de cambio conformacional intrínseco que el observado en la estructura cristalográfica de  $F_1$ . Por otro lado, el análisis de las diferencias de áreas superficiales permitió proponer por vez primera una posible explicación molecular sobre la mayor afinidad por el nucleótido por parte de la subunidad  $\beta$  al estar ésta inmersa en el ambiente oligomérico de  $F_1$ .

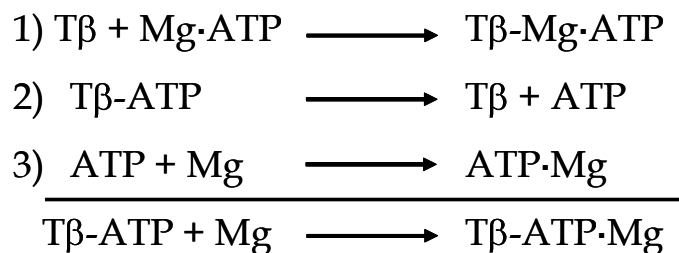
El presente proyecto representa una nueva etapa en el estudio de las bases energéticas de la unión de nucleótidos con la subunidad  $T\beta$  aislada de la ATP sintasa de la bacteria termofílica *Bacillus PS3*. En un primer paso, se realizó la caracterización calorimétrica de la asociación de  $T\beta$  con ATP-Mg y ATP, así como la unión de ATP con Mg(II). Además de ganar comprensión sobre las bases energéticas del reconocimiento para esta unión, el estudio permitió elucidar el papel energético del Mg(II) en la unión de los nucleótidos ATP y ADP a la subunidad  $T\beta$ .

En particular, el propósito ha sido determinar el papel energético que juega el ión Mg(II) en el reconocimiento del ATP por parte de  $T\beta$ , lo cual significa caracterizar la reacción:



Sin embargo, la complejidad de este sistema ternario nos dificulta llevar a cabo la medición directa del proceso. Se requiere, por una parte, que todo el ATP y la  $T\beta$  (o gran parte de ellos) estuvieran formando el complejo  $T\beta$ -ATP; sin embargo, esto no sucede en la celda dada la modesta afinidad entre las dos especies químicas; otra complicación radica en asegurar que el Mg(II) se unirá única y exclusivamente al complejo  $T\beta$ ATP, lo cual resulta prácticamente imposible dada la presencia de ATP libre en todo momento. Así, en la celda de reacción, además de llevarse a cabo la reacción deseada entre  $T\beta$ ATP y Mg(II), se da un equilibrio químico complejo en el que se incluye la unión del ATP al Mg(II).

Para resolver esta problemática, utilizamos una aproximación indirecta que consiste en la determinación de la energética de los tres complejos binarios involucrados. Como se muestra en la *figura 3*, el arreglo y suma apropiada de estos equilibrios químicos a través de un esquema de ecuaciones de Hess permite obtener los parámetros de la reacción de interés:



**Figura 3.** Ecuaciones de Hess para la unión  $\text{T}\beta\text{-ATP}\cdot\text{Mg}$ . La ecuación número dos fue invertida para obtener la reacción deseada.

Sin embargo para la interacción de  $\text{T}\beta$  con  $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$  o con  $\text{ATP}$  y en el cual  $\text{ATP}$  puede unir dos átomos de magnesio ( $\text{Mg(II)}$ ) secuencialmente, dada la complejidad del sistema, se utilizó un modelo que considerara simultáneamente todas estas interacciones, el cual permitió, a partir de los resultados obtenidos con los experimentos calorimétricos (ecuaciones 1,2 y 3, *figura 3*) ajustar los valores finales para la formación del complejo  $\text{T}\beta\text{-Mg}\cdot\text{ATP}$ .

Finalmente, se realizó un estudio comparativo de las energías libres de unión que fueron obtenidas en el presente estudio para  $\text{T}\beta$ , con aquellas reportadas en la literatura para  $F_1$ , para los dos mecanismos de unión mencionados previamente en la introducción, bisitio y trisitio. El propósito de este análisis será entender en términos energéticos el papel que juegan los contactos intercatenarios en el funcionamiento de  $F_1$ .

## OBJETIVOS

---

---

### Objetivo General

Evaluar el papel energético-estructural del Mg (II) en el reconocimiento del ATP por la subunidad  $\beta$  aislada de la ATP sintasa de *Bacillus PS3*.

### Objetivos Específicos:

Obtención de los parámetros termodinámicos para la formación de los complejos ATP-Mg, T $\beta$ -ATP·Mg y T $\beta$ -ATP mediante calorimetría de titulación isotérmica.

Comparar las energías libres de unión obtenidas con la subunidad  $\beta$  aislada con las reportadas en la literatura para F<sub>1</sub>.

Evaluar si existen diferencias energético-estructurales significativas entre los complejos T $\beta$ -ATP·Mg y T $\beta$ -ATP.

Elucidar el papel energético del Mg(II) en la unión de los nucleótidos ATP y ADP a la subunidad T $\beta$ .

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

---

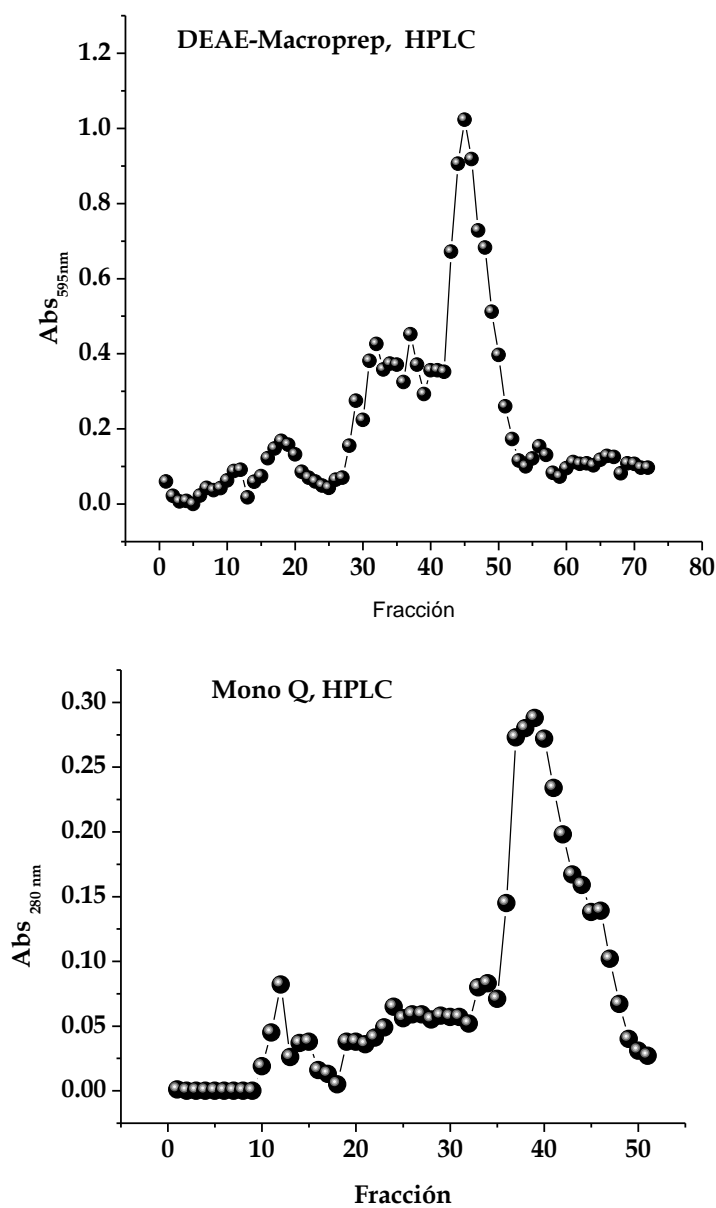
### *Expresión heteróloga de la subunidad $\beta$ de Bacillus PS3 (T $\beta$ )*

Las células de *E. coli* (cepa DK8 carente del operón de la ATPasa) que contienen el plásmido C95-1 (el cual tiene el gen de la subunidad  $\beta$ ) fueron crecidas en placas de agar-LB (LB: extracto de levadura 5 g/L, triptona 10 g/L, NaCl 5 g/L). El precultivo (50 mL de medio LB adicionado con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina) fue inoculado e incubado a 37°C y 250 rpm durante 12 horas. El matraz de producción (1 L) se inoculó utilizando el precultivo, en presencia de 100  $\mu$ g/mL ampicilina, después de 6 horas las células se indujeron con IPTG (isopropil-tio  $\beta$ -D-galactosido) 0.5 mM y se incubaron 4 horas más. Una vez terminado el cultivo, las células fueron centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos, y lavadas con el amortiguador de lisis (Tris-SO<sub>4</sub> 20 mM pH 8, EDTA 1 mM, p-aminobenzamidina 6 mM, NaCl 5 mM y glicerol 10%). Se obtuvieron aproximadamente 2 g de células por litro de cultivo.

### *Purificación de la subunidad recombinante*

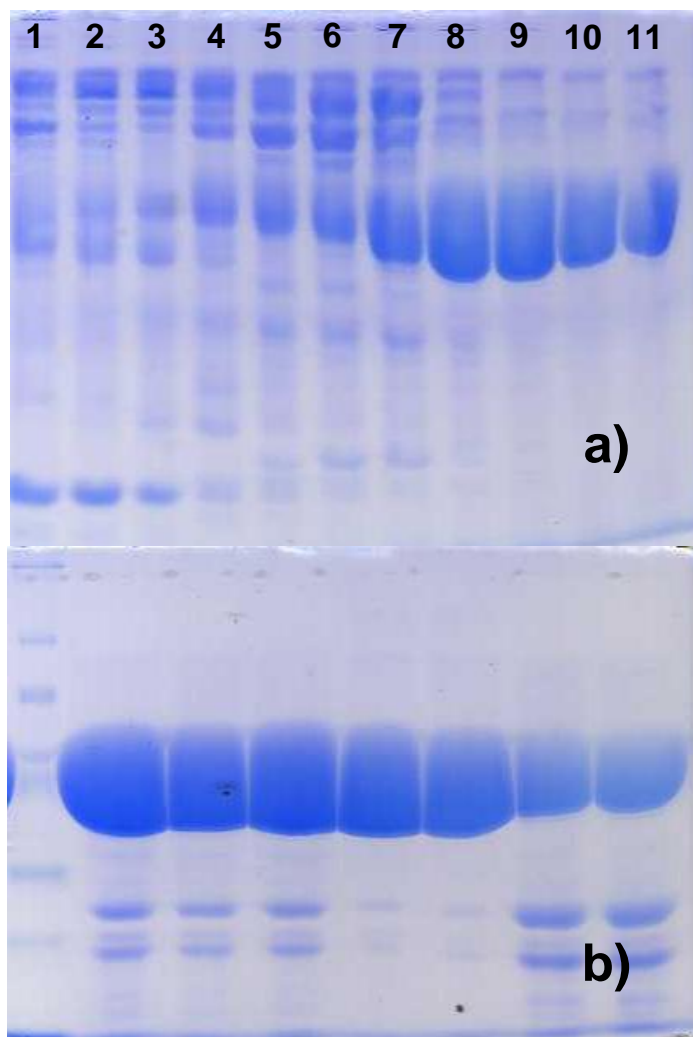
Las células se resuspendieron en 50 mL de buffer de lisis y se homogenizaron. Para la fragmentación celular se utilizó un sonicador. Los desechos celulares fueron separados por ultracentrifugación a 100,000 g (45,000 rpm) por 1 hora a 4 °C. El sobrenadante se aplicó a una columna DEAE-Macroprep (previamente equilibrada con 600 a 800 mL de amortiguador A: Tris-SO<sub>4</sub> 20 mM pH 8, EDTA 1 mM), con un flujo lento para garantizar que la mayor parte de la proteína se pegue a la resina. Las proteínas que no fueron retenidas, eluyeron de la columna lavando la columna con 1L de amortiguador A. Para evitar la protéolisis, el amortiguador de elución fue adicionado con un inhibidor de proteasas (tableta Complete/Roche). T $\beta$  se eluyó con un gradiente lineal de 0 - 550 mM de NaCl en amortiguador A. Se colectaron fracciones de 5 ml (flujo de 1 ml/min). Las fracciones se monitorearon con reactivo de Bradford. Los máximos obtenidos en absorbancia (*figura 4a*),

se corrieron en un gel de poliacrilamida (Laemli, 1970) al 12 % en condiciones desnaturizantes, utilizando tinción con azul de Coomassie (*figura 5a*). Las fracciones ricas en T $\beta$  se dializaron en amortiguador B (Tris-HCl pH 7.3, EDTA 1 mM) y se inyectaron en la columna Mono-Q (intercambio aniónico) equilibrada previamente con el amortiguador B. Las subunidades se eluyeron con un gradiente lineal de 0 - 280 mM de NaCl, aproximadamente entre 230-250 mM (ver *figura 4b*). Las fracciones ricas en T $\beta$  (ver *figura 5b*) se concentraron utilizando tubos centricron.



**Figura 4.** Perfiles cromatográficos para la purificación de T $\beta$ . a) Columna DEAE Macroprep (fracciones 30-42); b) Columna Mono Q (fracciones 20-30).





**Figura 5.** Geles de poliacrilamida al 12%. **a)** Muestras del gradiente de la columna DEAE. Los carriles 8-11 muestran enriquecimiento de la subunidad T $\beta$ . **b)** Muestras del gradiente de la columna Mono Q. Los carriles 7 y 8 fueron utilizadas para los experimentos de CTI.

### ***Preparación de las muestras para el análisis calorimétrico.***

Las fracciones ricas en T $\beta$  fueron dializadas en amortiguador 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl (Amortiguador C). Después de la diálisis, fueron concentradas y filtradas utilizando filtros de 0.45  $\mu$ . La concentración de la proteína fue determinada espectrofotométricamente, utilizando el coeficiente de extinción molar para T $\beta$  (15,360 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 280 nm) y usando el método del ácido bicinonínico (BCA) (Ohta, S. *et al.* 1988; Pérez-Hernández, *et al.* 2002). Para todas las determinaciones calorimétricas la concentración final de proteína fue entre 0.05 y 0.07 mM. Las soluciones de Mg·ATP fueron preparadas utilizando el amortiguador C, adicionando 5 mM de MgCl<sub>2</sub> para garantizar que el equilibrio químico esté orientado hacia la formación de este complejo (Mg·ATP). En el caso de las soluciones de ATP, se adicionó 3 mM EDTA, con el fin de eliminar cualquier contaminación de Mg (II) en la muestras. Las soluciones de nucleótidos fueron preparadas disolviendo las sales en el amortiguador C. La concentración fue determinada utilizando el coeficiente de extinción molar para AT(D)P de 15,600 a 259 nm.

### ***Calorimetría de titulación isotérmica (CTI)***

Las mediciones calorimétricas fueron realizadas en un microcalorímetro de titulación isotérmica VP-ITC (MicroCal, Inc.). Para disminuir en lo posible los efectos calóricos ajenos a la reacción de unión, las muestras proteicas fueron dializadas extensivamente, y el ligando fue preparado utilizando la solución amortiguadora del último recambio en el proceso de dializado. Con el fin de restar los calores de dilución del ligando en la isoterma de titulación, se realizaron experimentos de dilución que consisten en la adición de ligando a una solución amortiguadora sin proteína, bajo el mismo esquema de inyección que el ocupado con la solución proteica. En el caso de T $\beta$ , las titulaciones calorimétricas se realizaron en el intervalo de temperatura de 288 a 303 K. La constante de unión ( $K_u$ ), el cambio de entalpía ( $\Delta H$ ) y la estequiometría de reacción ( $n$ ) fueron estimados de la isoterma de titulación mediante el ajuste por regresión no lineal de la ecuación (Wiseman *et al.*, 1989) de un modelo de sitios idénticos e independientes:

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

en donde Q es el calor total intercambiado hasta la adición  $i$ ,  $X_t$  y  $M_t$  son las concentraciones de ligando y proteína totales, y  $V_o$  es el volumen de la celda de reacción.

El cambio de entropía fue calculado de las ecuaciones termodinámicas generales:

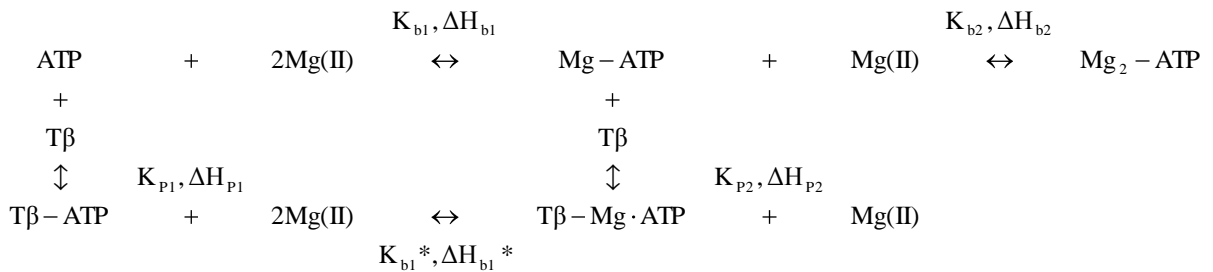
$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S \quad (2)$$

Para los estudios calorimétricos del complejo ATP-Mg, los experimentos se realizaron en un intervalo de 298 a 318 K. El mejor ajuste de los datos resultó ser utilizando un modelo de dos sitios de unión secuenciales:

$$Q = [ATP]_T V_o \frac{K_1 [Mg(II)] \Delta H_1 + K_1 K_2 [Mg(II)]^2 (\Delta H_1 + \Delta H_2)}{1 + K_1 [Mg(II)] + K_1 K_2 [Mg(II)]^2} \quad (3)$$

Donde  $K_1$  y  $K_2$  son las constantes de unión para cada uno de los sitios, Q es el calor total intercambiado,  $[Mg(II)]$  es la concentración del ión magnesio libre y  $[ATP]_T$  es la concentración total de ATP.

Las isothermas obtenidas a partir de los ajustes anteriores fueron re-analizadas utilizando un modelo ternario, en el cual la subunidad  $T\beta$  puede unir ATP o  $Mg \cdot ATP$ , mientras que el ATP puede unir uno o dos magnesios  $Mg_2 \cdot ATP$ .



La concentración de los diferentes complejos puede ser expresados como una función de las concentraciones de las especies libres. Para la formación del complejo  $Mg \cdot ATP$  tenemos:

$$[Mg \cdot ATP] = K_{b1} [ATP][Mg(II)]$$

Donde  $K_{b1}$  corresponde a la constante de unión para la formación del complejo  $Mg \cdot ATP$ . Para la formación del complejo  $Mg_2 \cdot ATP$  tenemos:

$$[Mg_2 \cdot ATP] = K_{b1} K_{b2} [ATP][Mg(II)]^2$$

Donde  $K_{b2}$  corresponde a la constante de unión para la formación del complejo  $Mg_2 \cdot ATP$ . Se incluye también el valor de la constante obtenida en el complejo anterior  $K_{b1}$ . Para la unión de la proteína ( $T\beta$ ) con ATP tenemos:

$$[T\beta \cdot ATP] = K_{p1} [T\beta][ATP]$$

Donde  $K_{p1}$  corresponde a la constante de unión para el complejo  $T\beta \cdot ATP$ . Para la formación del complejo  $T\beta \cdot Mg \cdot ATP$  tenemos:

$$[T\beta \cdot Mg \cdot ATP] = K_{p2} K_{b1} [T\beta][ATP][Mg(II)] = K_{p1} K_{b1}^* [T\beta][ATP][Mg(II)]$$

Donde  $K_{p2}$  corresponde a la constante de unión para el complejo  $T\beta \cdot Mg \cdot ATP$ .  $K_{b1}^*$  es la constante de asociación para la unión de  $Mg(II)$  a  $T\beta \cdot ATP$ .

Considerando el principio de conservación de masas para cada componente ( $T\beta$ , ATP y  $Mg(II)$ ), la concentración total de cada componente es igual a la suma de los componentes participando en los distintos complejos:

$$[ATP]_T = [ATP] + [Mg \cdot ATP] + [Mg_2 \cdot ATP] + [T\beta \cdot ATP] + [T\beta \cdot Mg \cdot ATP]$$

$$[Mg]_T = [Mg(II)] + [Mg \cdot ATP] + 2[Mg_2 \cdot ATP] + [T\beta \cdot Mg \cdot ATP]$$

$$[T\beta]_T = [T\beta] + [T\beta \cdot ATP] + [T\beta \cdot Mg \cdot ATP]$$

A continuación se introducen las constantes de equilibrio para cada complejo en el siguiente conjunto de ecuaciones no lineales:

$$\begin{aligned}
[\text{ATP}]_T &= [\text{ATP}] + K_{b1}[\text{ATP}][\text{Mg}(\text{I})] + K_{b1}K_{b2}[\text{ATP}][\text{Mg}(\text{I})]^2 + K_{p1}[\beta\text{-ATP}] + K_{p2}K_{b1}[\beta\text{-ATP}][\text{Mg}(\text{II})] \\
[\text{Mg}]_T &= [\text{Mg}(\text{II})] + K_{b1}[\text{ATP}][\text{Mg}(\text{I})] + 2K_{b1}K_{b2}[\text{ATP}][\text{Mg}(\text{I})]^2 + K_{p2}K_{b1}[\beta\text{-ATP}][\text{Mg}(\text{II})] \\
[\beta] &= [\beta] + K_{p1}[\beta\text{-ATP}] + K_{p2}K_{b1}[\beta\text{-ATP}][\text{Mg}(\text{II})]
\end{aligned}$$

donde  $K_{b1}$  y  $K_{b2}$  son las constantes de asociación para los sitios secuenciales de  $\text{Mg}(\text{II})$  al ATP,  $K_{p1}$  y  $K_{p2}$  son las constantes de asociación para la unión de ATP y  $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$  a  $\text{T}\beta$ , respectivamente, y  $K_{b1}^*$  es la constante de asociación para la unión de  $\text{Mg}(\text{II})$  a  $\text{T}\beta\text{-ATP}$ .

La concentración total de ATP, magnesio y  $\text{T}\beta$  después de cada inyección calorimétrica (i) está dada por:

$$\begin{aligned}
[\text{ATP}]_{T,i} &= [\text{ATP}]_0 \left( 1 - \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right)^i \right) \\
[\text{Mg}]_{T,i} &= [\text{Mg}]_0 \\
[\beta]_{T,i} &= [\beta]_0 \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right)^i
\end{aligned}$$

donde  $[\text{ATP}]_0$  es la concentración de ATP en la jeringa,  $[\text{Mg}]_0$  es la concentración de magnesio en la jeringa y en la celda,  $[\text{T}\beta]_0$  es la concentración inicial de  $\text{T}\beta$  en la celda,  $v$  es el volumen de inyección, y  $V_0$  es el volumen de la celda.

El método de Newton-Raphson puede ser utilizado para resolver numéricamente el conjunto de ecuaciones no lineales para cada punto de la titulación, de igual forma permite la determinación de la concentración de ATP, magnesio y  $\text{T}\beta$  después de cada inyección. Utilizando las constantes de asociación y la concentración de cada complejo después de cada inyección, puede ser calculado:

$$\begin{aligned}
[\beta \cdot \text{ATP}]_i &= K_{p1} [\beta]_i [\text{ATP}]_i \\
[\text{T}\beta \cdot \text{Mg} \cdot \text{ATP}]_i &= K_{p2} K_{b1} [\beta]_i [\text{ATP}]_i [\text{Mg}]_i \\
[\text{Mg} \cdot \text{ATP}]_i &= K_{b1} [\text{ATP}]_i [\text{Mg}]_i \\
[\text{Mg}_2 \cdot \text{ATP}]_i &= K_{b1} K_{b2} [\text{ATP}]_i [\text{Mg}]_i^2
\end{aligned}$$

El calor asociado a cada inyección,  $q_i$ , puede ser calculado a partir del cambio en la concentración para cada complejo después de cada una de las inyecciones, y el cambio de entalpía asociado con cada complejo formado:

$$\begin{aligned}
q_i = V_0 & \left( \left( [T\beta \cdot ATP]_i - [T\beta \cdot ATP]_{i-1} \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right) \right) \Delta H_{P1} \right. \\
& + \left( [T\beta \cdot Mg \cdot ATP]_i - [T\beta \cdot Mg \cdot ATP]_{i-1} \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right) \right) (\Delta H_{P2} + \Delta H_{b1}) \\
& + \left( [Mg \cdot ATP]_i - [Mg \cdot ATP]_{i-1} \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right) - F_{Mg-ATP} [ATP]_0 \frac{v}{V_0} \right) \Delta H_{b1} \\
& \left. + \left( [Mg_2 \cdot ATP]_i - [Mg_2 \cdot ATP]_{i-1} \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right) - F_{Mg_2-ATP} [ATP]_0 \frac{v}{V_0} \right) (\Delta H_{b1} + \Delta H_{b2}) \right)
\end{aligned}$$

donde  $\Delta H_{P1}$  y  $\Delta H_{P2}$  son los cambios de entalpía asociados a la unión de ATP y Mg·ATP a T $\beta$ , respectivamente, y  $\Delta H_{b1}$  y  $\Delta H_{b2}$  son los cambios de entalpía asociados a la unión del primero y segundo Mg(II) al ATP, respectivamente. Los términos de corrección  $F_{Mg-ATP}$  y  $F_{Mg_2-ATP}$ , incluyen las fracciones de ATP en la jeringa con uno o dos átomos de magnesio unidos, respectivamente y reflejan la cantidad de los complejos de Mg·ATP y Mg<sub>2</sub>·ATP introducidos en la celda en cada inyección y no debido al equilibrio en el interior de la celda calorimétrica.

Finalmente, el efecto de dilución es normalizado considerando la cantidad de ligando inyectado:

$$Q_i = \frac{q_i}{v [ATP]_0}$$

En los experimentos,  $K_{b1}$ ,  $\Delta H_{b1}$ ,  $K_{b2}$ ,  $\Delta H_{b2}$ ,  $K_{P1}$ , y  $\Delta H_{P1}$  son determinados directamente a partir de titulaciones directas binarias (las realizadas con las ecuaciones 1 y 3).  $K_{P2}$  y  $\Delta H_{P2}$  son determinados a partir de análisis de los complejos ternarios, una vez que los otros parámetros han sido determinados previamente.

La cooperatividad de unión de ATP y Mg(II) a T $\beta$  está contenido en los valores de  $K_{P2}$  y  $\Delta H_{P2}$ . Si  $K_{P1}$  y  $K_{P2}$  son iguales, la unión de Mg·ATP a T $\beta$  es la misma que al ATP, y el magnesio no tiene ningún efecto sobre la unión del ATP. Si  $K_{P1}$  y  $K_{P2}$  no son iguales, y/o  $\Delta H_{P1}$  y  $\Delta H_{P2}$  no son iguales, la unión de Mg·ATP a T $\beta$  es diferente a la del ATP, y el magnesio tienen algún

efecto sobre la unión de ATP. En este caso, la cooperatividad heterotrópica y la constante de asociación para la unión del magnesio y el ATP a  $T\beta$  estará dado por la ecuación:

$$\alpha = \frac{K_{P2}}{K_{P1}}$$

donde  $\alpha > 1$  indica cooperatividad positiva,  $\alpha < 1$  indica cooperatividad negativa y  $\alpha = 1$  indica que no hay cooperatividad. De forma similar, el cambio de entalpía cooperativo para la unión del magnesio y el ATP a  $T\beta$  estará dado por:

$$\Delta h = \Delta H_{P2} - \Delta H_{P1}$$

La entropía cooperativa puede ser calculada utilizando:

$$T\Delta s = \Delta h - \Delta g = \Delta h + RT \ln \alpha$$

Finalmente, se puede concluir que el efecto cooperativo entre el Mg(II) y ATP es recíproco. A partir del principio de conservación de energía (Ley de Hess) aplicado a la formación del complejo ternario  $T\beta \cdot \text{Mg(II)} \cdot \text{ATP}$ , se obtiene:

$$K_{b1} K_{P2} = K_{P1} K_{b1}^*$$

$$\Delta H_{b1} + \Delta H_{P2} = \Delta H_{P1} + \Delta H_{b1}^*$$

entonces:

$$\alpha = \frac{K_{P2}}{K_{P1}} = \frac{K_{b1}^*}{K_{b1}}$$

$$\Delta h = \Delta H_{P2} - \Delta H_{P1} = \Delta H_{b1}^* - \Delta H_{b1}$$

El cambio en la capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ ) es obtenido realizando titulaciones a diferentes temperaturas, y resolviendo la ecuación de Kirchoff:

$$\frac{\delta \langle \Delta H \rangle}{\delta T} = \Delta C_p \quad (4)$$

## *Fluorescencia*

Con el fin de evaluar la integridad de las proteínas purificadas, así como estudiar los cambios en la intensidad de fluorescencia al adicionar los ligandos estudiados (ATP o Mg·ATP), se monitorearon los espectros de emisión de fluorescencia. La fluorescencia posee la ventaja de ser un método no destructivo. Requiere de una concentración baja de proteína con respecto a otros métodos. Las subunidad  $\beta$  posee 12 tirosinas (fluoróforos intrínsecos) en toda su estructura (ningún triptofano).

Los cambios en la intensidad de fluorescencia fueron monitoreados utilizando un espectrofluorómetro OLIS Photon Counting. La temperatura del compartimento de la celda fue controlado a 25 °C para todos los experimentos de titulación. La longitud de onda utilizada para la excitación fue de 275 nm (máximo de absorción de tirosinas). Los espectros de emisión fueron colectados de 295 a 410 nm. La concentración final de T $\beta$  fue de 1  $\mu$ M en la celda, la cual fue previamente equilibrada por 10 minutos con amortiguador 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl. Se realizaron adiciones de 0.5-1  $\mu$ L de ATP o de Mg·ATP a una concentración de 14 mM. El apagamiento en la fluorescencia total fue calculado de acuerdo a:

$$Y_i = \left( \frac{a}{2Mt_i} \right) \left[ Mt_i + Lx_i + K_d - \sqrt{(Mt_i + Lx_i + K_d)^2 - 4Mt_i Lx_i} \right]$$

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  $i$ ;  $Y_i$  es la señal de fluorescencia observada.

## *Cálculo de cambios de área accesible al solvente ( $\Delta ASA$ )*

Los valores de  $\Delta H$  y  $\Delta C_p$  para las subunidades en conformación aislada fueron estimados utilizando los modelos de área superficial (Baker y Murphy, 1998), mediante la forma general:

$$\Delta F = \Delta f_p \Delta ASA_p + \Delta f_{ap} \Delta ASA_{ap}, \quad (5)$$



en donde  $\Delta ASA_p$  y  $\Delta ASA_{np}$  son los cambios de accesibilidad debido a la unión de áreas

superficiales de tipo polar y apolar, respectivamente,  $\Delta f_p$  y  $\Delta f_{ap}$  son las contribuciones energéticas específicas por unidad de área superficial polar y apolar, respectivamente, y  $\Delta F$  puede ser  $\Delta H$  o  $\Delta C_p$ . Los cambios de accesibilidad fueron calculados mediante el programa NACCESS (Hubbard y Thornton, 1993), utilizando el pdb 1BMF para realizar el análisis.

## RESULTADOS

A pH 8, el ATP se encuentra completamente desprotonado (ATP<sup>4-</sup>), por lo cual es capaz de unir dos iones Mg (II) de forma secuencial:



Consistente con la ecuación anterior, las isotermas de unión obtenidas para la titulación de ATP con MgCl<sub>2</sub> presentaron un mejor ajuste al utilizar un modelo de sitios de unión secuenciales y no un modelo de un solo tipo de sitio de unión (*Figura 6*). Un resumen de los resultados a partir de las mediciones calorimétricas realizados a diferentes temperaturas es presentado en la *Tabla 1*.

**Tabla 1.** Parámetros termodinámicos para la unión de Mg(II) al ATP a diferentes temperaturas mediante CTI <sup>a,b</sup>.

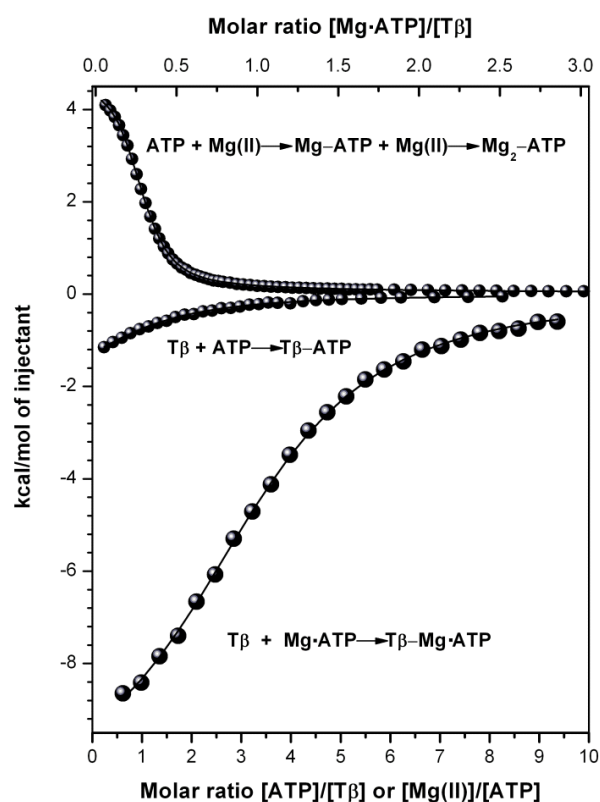
Temperature (°C)	Mg-ATP				Mg <sub>2</sub> -ATP			
	K <sub>b1</sub> × 10 <sup>-4</sup> (M <sup>-1</sup> )	ΔG <sub>b1</sub> (kcal mol <sup>-1</sup> )	ΔH <sub>b1</sub> (kcal mol <sup>-1</sup> )	TΔS <sub>b1</sub> (kcal mol <sup>-1</sup> )	K <sub>b2</sub> (M <sup>-1</sup> )	ΔG <sub>b2</sub> (kcal mol <sup>-1</sup> )	ΔH <sub>b2</sub> (kcal mol <sup>-1</sup> )	TΔS <sub>b2</sub> (kcal mol <sup>-1</sup> )
15	2.2 ± 0.2	-5.7	3.9 ± 0.1	9.6	49 ± 21	-2.2	1.5 ± 0.2	3.7
20	3.0 ± 0.0	-6.0	4.2 ± 0.1	10.2	63 ± 7	-2.4	1.5 ± 0.1	3.9
25	3.6 ± 0.1	-6.2	4.4 ± 0.2	10.6	98 ± 15	-2.7	1.7 ± 0.2	4.4
30	4.0 ± 0.1	-6.4	4.6 ± 0.1	11.0	101 ± 17	-2.8	1.8 ± 0.1	4.6

<sup>a</sup> Las constantes de equilibrio corresponden a las constantes de asociación secuenciales.

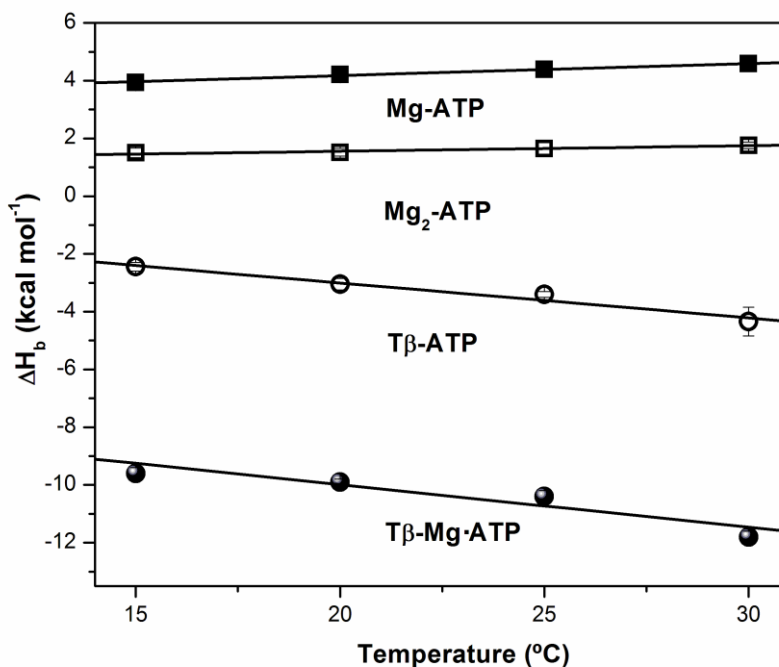
<sup>b</sup> Los valores son el promedio de tres experimentos independientes a cada una de las temperaturas.

El ATP une el primer Mg (II) con una afinidad 400 veces mayor en relación con el segundo sitio. Ambos sistemas son entrópicamente conducidos, con el componente entálpico más desfavorable para la formación de las especies con un solo Mg (II). Considerando al ΔC<sub>p</sub> como independiente de la temperatura, el análisis de la regresión lineal de los datos de ΔH<sub>b</sub> contra temperatura en la *Tabla 1* dan un valor de 37 ± 10 y 20 ± 10 cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> para los complejos Mg-ATP y Mg<sub>2</sub>-ATP, respectivamente (*Figura 7*). Los valores para el ΔH<sub>b1</sub> y K<sub>b1</sub> obtenidos en el presente trabajo son similares a los reportados por Smith *et al.* (1991) (T = 25 °C, ΔH<sub>b</sub> = 4.49 kcal mol<sup>-1</sup>, K<sub>b</sub> = 35,500 M<sup>-1</sup>), quienes compilaron y analizaron un grupo extenso de datos de unión para el complejo Mg-ATP. En lo que respecta a otras referencias, sólo se conoce un estudio publicado de CTI de la interacción de la unión del Mg (II) con ATP

(Wilson y Chin, 1991). Los datos de este estudio ( $T = 28^\circ\text{C}$ ) fueron analizados usando el modelo de un solo tipo de sitio, obteniendo un valor de cambio de entalpía similar ( $\Delta H_b = 4.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) pero con un valor de la constante de unión menor ( $K_b = 9,600 \text{ M}^{-1}$ ) al valor presentado en la *Tabla 1* del presente trabajo. En contraste con la gran cantidad de valores para el  $\Delta H_b$  y  $K_b$  disponibles en la literatura, los valores para el  $\Delta C_p_b$  son escasos. Alberty (1969) reportó un valor de  $30 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  para  $\text{Mg-ATP}$ , el cual es similar al obtenido en el presente estudio. Wang *et al.* (1995), usando un calorímetro de flujo, y utilizando un intervalo de temperaturas de  $50\text{-}125^\circ \text{C}$ , obtuvo valores significativamente mayores para los dos complejos de  $\text{Mg(II)}$  unidos al ATP ( $121$  y  $50 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  para  $\text{Mg-ATP}$  y  $\text{Mg}_2\text{-ATP}$ , respectivamente).



**Figura 6.** Isothermas calorimétricas para la formación de los complejos de  $\text{T}\beta\text{-ATP}$ ,  $\text{T}\beta\text{-Mg}\cdot\text{ATP}$ ,  $\text{Mg-ATP}$  y  $\text{Mg}_2\text{-ATP}$  a  $25^\circ \text{C}$ , en amortiguador  $0.05 \text{ M}$  Tris HCl adicionada con  $0.1 \text{ M}$  NaCl, pH 8.0. Las líneas sólidas corresponden al mejor ajuste para cada una de las curvas. En la titulación de ATP con  $\text{Mg(II)}$ , los datos experimentales fueron ajustados a un modelo de sitios de unión secuenciales. Para el complejo  $\text{T}\beta\text{-ATP}$ , fue utilizado un modelo de sitios de unión independientes e idénticos. En el caso del complejo  $\text{T}\beta\text{-Mg}\cdot\text{ATP}$ , se utilizó un modelo de equilibrios acoplados, el cual considera la unión de  $\text{T}\beta$  al ATP o al  $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$  y la unión de ATP a uno o dos magnesios.



**Figura 7.** Entalpías de unión como función de la temperatura para los complejos Tβ-ATP, Tβ-Mg·ATP, Mg-ATP y Mg<sub>2</sub>-ATP, en un amortiguador 0.05 M Tris HCl adicionada con 0.1 M NaCl, pH 8.0. Las líneas sólidas corresponden a la regresión lineal de la ecuación de Kirchoff ( $\partial\Delta H_b/\partial T = \Delta C_p$ ) de datos calorimétricos, asumiendo que el  $\Delta C_p$  es independiente de la temperatura.

### *Termodinámica de la unión de ATP y Mg·ATP a la subunidad Tβ aislada*

La Figura 6 muestra un ejemplo de las isotermas de unión obtenidas para los complejos Tβ-ATP y Tβ-Mg·ATP a 25°C. Las isotermas de unión para los complejos de Tβ-ATP fueron ajustados a un modelo de un solo tipo de sitio de unión. Para la titulación de Tβ con Mg(II)-unido al ATP, los datos calorimétricos fueron ajustados utilizando un modelo en el cual el ATP y el Mg·ATP compiten por el sitio de unión de Tβ y el equilibrio entre el ATP, ATP·Mg y el Mg<sub>2</sub>·ATP son incluidos en este ajuste. La Tabla 2 resume los resultados calorimétricos obtenidos para los complejos Tβ-ATP y Tβ-Mg·ATP a diferentes temperaturas. Para ambos conjuntos de mediciones, los datos calorimétricos tienen una estequiometría ~1:1. Los dos complejos difieren significativamente en sus propiedades termodinámicas. La constante de unión resulta 7 veces mayor para el complejo de Tβ-Mg·ATP, y es resultado de un efecto compensatorio entre los valores de la entalpía y entropía. A todas las temperaturas

muestradas, la unión de T $\beta$  a Mg·ATP fue aproximadamente dos veces más exotérmica que para la unión con ATP. En contraste, la entropía de unión fue favorable para el complejo T $\beta$ -ATP.

**Tabla 2.** Parámetros termodinámicos para la unión de Mg·ATP o ATP a T $\beta$  obtenidos a diferentes temperaturas mediante CTI.

Temperatura (°C)	K <sub>b</sub> x 10 <sup>-5</sup> (M <sup>-1</sup> )	$\Delta G_b$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_b$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	T $\Delta S_b$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	n
<b>T<math>\beta</math>-Mg·ATP</b>					
15	1.8 ± 0.1	-6.9	-9.6 ± 0.2	-2.7	1.02 ± 0.01
20	1.3 ± 0.1	-6.9	-9.9 ± 0.1	-3.0	0.98 ± 0.01
25	1.0 ± 0.1	-6.8	-10.4 ± 0.2	-3.6	0.99 ± 0.01
30	0.73 ± 0.1	-6.7	-11.8 ± 0.2	-5.1	0.95 ± 0.02
<b>T<math>\beta</math>-ATP</b>					
15	0.25 ± 0.01	-5.8	-2.4 ± 0.2	3.4	0.98 ± 0.09
20	0.19 ± 0.00	-5.7	-3.1 ± 0.2	2.7	1.01 ± 0.05
25	0.13 ± 0.01	-5.6	-3.4 ± 0.1	2.2	1.05 ± 0.05
30	0.12 ± 0.01	-5.6	-4.3 ± 0.5	1.3	1.02 ± 0.10

Odaka *et al.* (1994) reportan mediciones calorimétricas del complejo T $\beta$ -Mg·ATP a una sola temperatura (T = 21 °C). Los datos obtenidos en ese estudio ( $\Delta H_b$  = -12 kcal mol<sup>-1</sup>, T $\Delta S_b$  = -5.5 kcal mol<sup>-1</sup>, K<sub>b</sub> = 66,000 M<sup>-1</sup>) resultan un tanto diferentes a los reportados en el presente trabajo (Tabla 3). Estas diferencias son en parte debido al uso de diferentes modelos de unión. De hecho, si nuestras isotermas de unión son analizadas utilizando un modelo simple de unión 1:1, los valores resultan cercanos a los reportados por Odaka *et al.* (1994) (ver tabla 3). Estos resultados contrastantes ilustran la importancia de considerar el equilibrio acoplado que ocurre durante la titulación de T $\beta$  con Mg(II)-unido al ATP (considerar que T $\beta$  es capaz de unir Mg·ATP o ATP, y que el ATP es capaz de unir uno o dos iones magnesio) para la determinación real de la formación del complejo T $\beta$ -Mg·ATP. El análisis de la dependencia con la temperatura de  $\Delta H_b$  arroja un valor del  $\Delta C_p$  de -150 ± 20 y -96 ± 17 kcal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> para los complejos T $\beta$ -Mg·ATP y T $\beta$ -ATP respectivamente (figura 6).

**Tabla 3.** Comparación de los parámetros termodinámicos para la unión de Mg·ATP a Tβ utilizando diferentes modelos de ajuste.

	<b>Modelo equilibrio acoplado</b>	<b>Modelo sitio simple</b>	<b>Odaka et al. (1994)</b>
$\Delta H$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	-9.9	-10.71	-10.7
$T\Delta S$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	-3.0	-4.09	-4.1
$K_b$ (M <sup>-1</sup> )	76923	86100	66000

\* Valores ajustados a 20°C

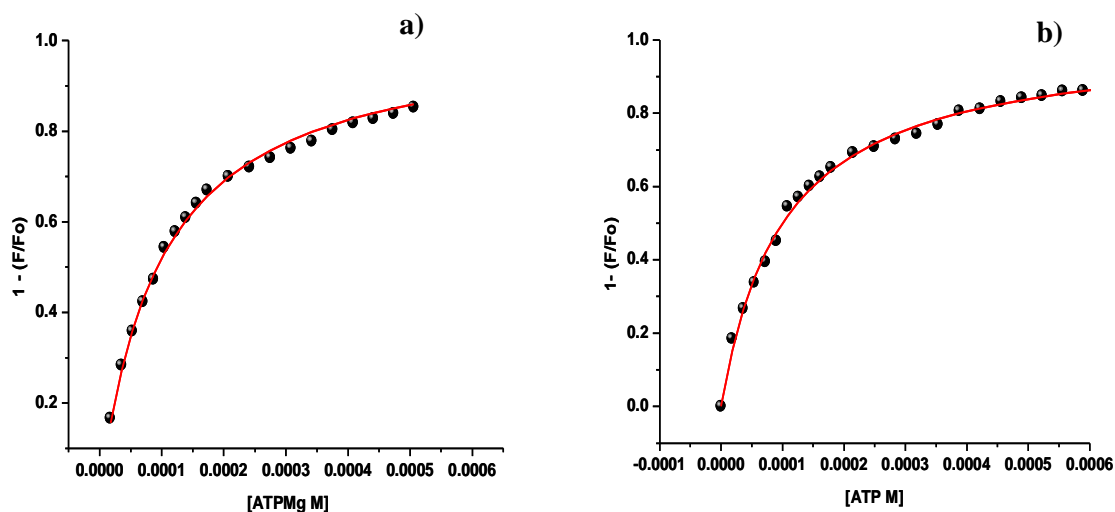
La *Tabla 4* muestra los parámetros de cooperatividad para la interacción heterotrópica entre el magnesio y el nucleótido. Estos parámetros, la constante de asociación cooperativa,  $\alpha$ , y la entalpía cooperativa,  $\Delta h$ , pueden ser calculados a partir de los parámetros termodinámicos para la unión del nucleótido y el nucleótido-Mg a Tβ y ellos reflejan el efecto recíproco de cada ligando en la unión de Tβ ( $\alpha = K_{P2}/K_{P1} = K_{b1}^*/K_{b1}$ ,  $\Delta h = \Delta H_{P2} - \Delta H_{P1} = \Delta H_{b1}^* - \Delta H_{b1}$ ; ver *Materiales y Métodos*).

**Tabla 4.** Parámetros de cooperatividad termodinámica para la interacción heterotrópica en la unión de Mg(II) y nucleótidos a Tβ a 25°C

<b>Complejo</b>	$\alpha$	$\Delta g$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta h$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$T\Delta s$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
<b>Tβ–Mg·ATP</b>	7.7	-1.2	-7.0	-5.8
<b>Tβ–Mg·ADP</b>	1.1	-0.1	-3.4	-3.3

## Fluorescencia

Tratando de responder el cuestionamiento de si el cambio conformacional de la proteína podría variar al unir ATP o Mg·ATP, y de esta forma discutir de manera acoplada tanto el papel energético como estructural del ión Mg(II), se realizaron experimentos de titulación fluorimétrica. Durante la titulación de T $\beta$  con ATP y Mg·ATP se observó un apagamiento de la señal al adicionar el ligando, el cual fue observable desde la primera adición (Figura 8). T $\beta$  no posee residuos triptofano, por lo que son sólo los residuos de tirosina los que disminuyen su rendimiento cuántico al unir el nucleótido. Las Figuras 8a y 8b muestran el ajuste de un modelo de unión simple de estequiometría 1:1 a los datos experimentales mediante regresión no lineal. Un resumen de los resultados obtenidos de la unión de T $\beta$  con ATP y Mg·ATP se presenta en la Tabla 5. El valor de  $a$  corresponde a la constante de apagamiento y  $K_a$  es la constante de asociación observada.



**Figura 8.** Isothermas de unión T $\beta$ -ATP (a) y T $\beta$ -Mg·ATP (b) construidas de mediciones fluorométricas. Las líneas continuas representan el mejor ajuste a los datos de un modelo de unión simple. Experimentos realizados a pH 8 y 25 °C.  $\lambda_{\text{excitación}}$  de 275 nm.

**Tabla 5.** Resultados obtenidos de la titulación por fluorescencia de T $\beta$  con ATP y Mg-ATP.

Complex	a	K <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> )
T $\beta$ -Mg-ATP	0.99 $\pm$ 0.01	11111 $\pm$ 268
T $\beta$ -ATP	1.01 $\pm$ 0.01	6250 $\pm$ 130

Con relación a la constante de asociación ( $K_a$ ), los valores obtenidos con esta técnica son más pequeños al ser comparados con las  $K_a$  observadas en los experimentos de CTI. La razón de dicha discrepancia aún no es clara, pero probablemente se pueda deber a un efecto de filtro interno, dada la alta concentración de nucleótido (hasta 0.6 mM) que fue necesario ocupar para lograr la saturación de la subunidad. Como puede observarse en la *Tabla 5*, los valores de la constante de apagamiento podrían indicar un cambio similar en el ambiente de las tirosinas ubicadas en el sitio de unión de T $\beta$ , al unir ATP o Mg-ATP, sugiriendo así un cambio conformacional similar al unir estos ligandos. Sin embargo, en la literatura ha sido reportado a partir de experimentos de resonancia magnética nuclear que el cambio conformacional de T $\beta$  al unir ATP se compara más a la unión T $\beta$ -Mg-ADP que a la de T $\beta$ -Mg-ATP (Yaggi et al., 1999). Lo anterior sugiere la posibilidad de que el cambio conformacional de T $\beta$  sea diferente al unir ATP o Mg-ATP, por lo que es necesario ampliar la información correspondiente al análisis estructural. Sumado a estos reportes, resultados fluorométricos obtenidos por nuestro grupo de investigación de la unión de T $\beta$  con ADP y Mg-ADP han mostrado constantes de apagamiento similar a las obtenidas con ATP y Mg-ATP. Esto podría indicar que, si hay cambios estos deben ser pequeños o bien que los fluoróforos utilizados son poco sensibles a las posibles diferencias de reacomodos conformacionales.



## DISCUSIÓN

---

La elucidación de las bases moleculares que gobiernan la formación de interacciones no covalentes en las proteínas requiere del conocimiento de las fuerzas que conducen el reconocimiento mismo de estas biomoléculas. A continuación se presenta un análisis energético-estructural para la formación de los complejos de T $\beta$  estudiados en el presente trabajo de investigación, considerando en conjunto las funciones termodinámicas obtenidas.

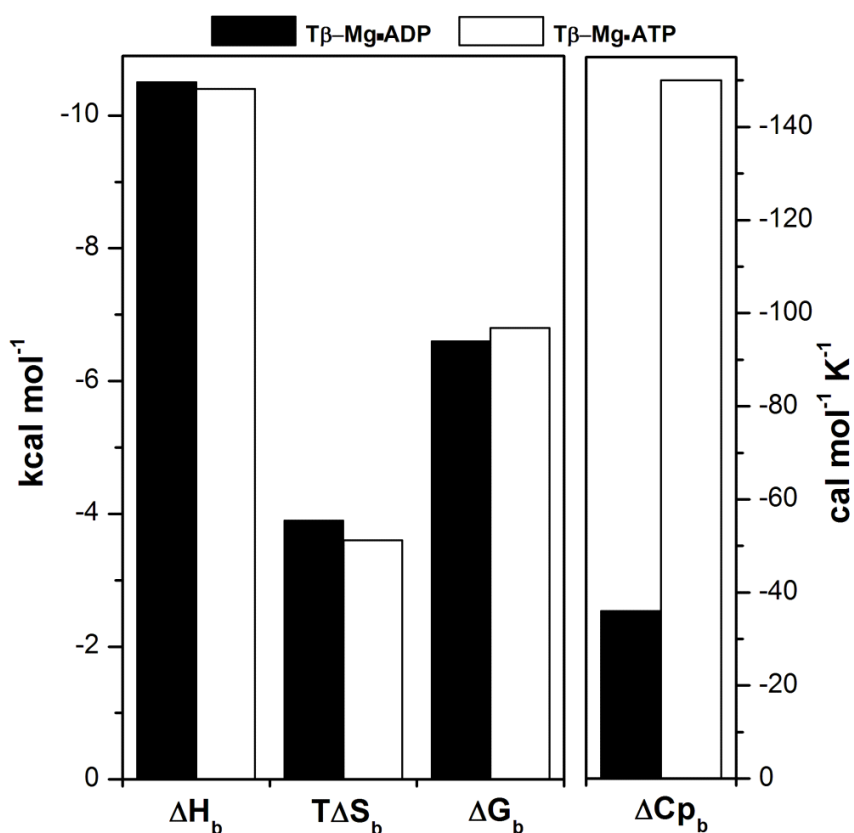
### *Diferencias energéticas y estructurales entre los complejos T $\beta$ -Mg·ATP y T $\beta$ -Mg·ADP*

La *Figura 9* compara los parámetros termodinámicos obtenidos en este trabajo con los reportados previamente para el complejo T $\beta$ -Mg·ADP (Pérez-Hernández *et al.*, 2002). Los datos calorimétricos para el complejo T $\beta$ -Mg·ATP, así como para T $\beta$ -Mg·ADP, fueron ajustados utilizando el modelo ternario descrito previamente en materiales y métodos.

Aunque la presencia del fosfato  $\gamma$  mejora ligeramente la afinidad de Mg·ATP comparada con Mg·ADP, la entalpía de unión es similar en ambos ligandos ( $\Delta\Delta H_b = -0.1$  kcal mol<sup>-1</sup>), mientras que la entropía de unión es ligeramente menos desfavorable ( $\Delta\Delta(T\Delta S_b) = -0.3$  kcal/mol) para la formación del complejo T $\beta$ -Mg·ATP. En contraste, se ha reportado que los sitios catalíticos de TF<sub>1</sub> muestran una ligera preferencia por Mg·ADP sobre Mg·ATP, indicando la importancia del ambiente oligomérico en el reconocimiento del sustrato (Dou, C. *et al.* 1998). Esta preferencia resulta más dramática en la misma F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintasa, donde la presencia del gradiente transmembranal de protones disminuye la afinidad por Mg·ATP en seis ordenes de magnitud (Weber, J. and Senior, A. E. 2000).

En la *Figura 9* puede observarse también la comparación de los valores del  $\Delta C_{p_b}$  para los complejos de T $\beta$ -Mg·ADP y T $\beta$ -Mg·ATP. La unión de Mg·ATP a T $\beta$  provoca una disminución en la capacidad calorífica con relación al Mg·ADP. La diferencia más obvia entre los complejos T $\beta$ -Mg·ADP y T $\beta$ -Mg·ATP es la ausencia o presencia de una molécula de

fosfato ( $\gamma$ ). Sin embargo, aunque algunas excepciones han sido encontradas (Chavelas, E. A. and García-Hernández, E. , 2009), la desolvatación de superficies polares incrementa la capacidad calorífica, debido a la liberación de moléculas de agua que sufren una ganancia neta vibracional al regresar al agua bulto (Prabhu, N. V. and Sharp, K. A., 2005). Con relación específica a los grupos fosfato, datos de transferencia agua-gas indican que su desolvatación origina un cambio de signo positivo en la capacidad calorífica (Marcus, Y., 1994), lo cual es consistente con los resultados calorimétricos para los complejos Mg-ATP y Mg<sub>2</sub>-ATP obtenidos en el presente estudio. Así, el valor de  $\Delta C_{p_b}$  más negativo observado para el complejo T $\beta$ -Mg·ATP no puede ser explicado sobre las bases de la desolvatación del fosfato  $\gamma$ , sugiriendo la ocurrencia de eventos moleculares adicionales.



**Figure 9.** Firmas termodinámicas para los complejos T $\beta$ -Mg·ATP y T $\beta$ -Mg·ADP determinadas a 25°C utilizando calorimetría de titulación isotérmica.

Paralelos a los efectos de desolvatación, diversos factores pueden contribuir significativamente a la capacidad calorífica de formación de complejos biomoleculares, entre los que se encuentran: 1) efectos de protonación-desprotonación, 2) intercambio de

contraiones, 3) liberación o secuestro de moléculas de agua estructural y 4) cambios conformacionales (Prabhu and Sharp, 2005; Ladbury, J.E., y Williams, M.A. 2004; Bello, M., *et al.* 2008). Para el complejo T $\beta$ -Mg·ADP, fueron obtenidos valores muy similares de los parámetros de unión utilizando los amortiguadores Tris o cacodilato (Pérez-Hernández, G., 2002). Estos amortiguadores difieren considerablemente en sus entalpías de ionización ( $\Delta\Delta H_{\text{ion}} = 12 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), y en la carga eléctrica de sus bases desprotonadas (neutro para el Tris y negativo para el cacodilato). Por lo tanto, puede considerarse que los factores 1 y 2 no son los principales contribuyentes a la diferencia de  $\Delta C_{p_b}$  de formación de los complejos de T $\beta$ -nucleótido. Por otro lado, al realizar una revisión minuciosa de la estructura de MF<sub>1</sub> inhibida (pdb 1 bmf), se observa que los dos sitios catalíticos en conformación cerrada comparten una hidratación residual muy similar. Tomando una distancia de corte de 3.5 Å, seis y cinco moléculas de agua son observadas en los sitios  $\beta_{\text{DP}}$  y  $\beta_{\text{TP}}$  respectivamente, las cuales se encuentran puenteando el contacto entre la proteína y el nucleótido-magnesio. En conjunto, todas estas observaciones sugieren que los efectos de hidratación residual (factor 3) tampoco son significativos para la determinación de las diferencias en  $\Delta C_{p_b}$  entre los complejos T $\beta$ -Mg·ADP y T $\beta$ -Mg·ATP.

Por otro lado, un análisis energético-estructural realizado previamente mostró que el  $\Delta C_{p_b}$  para el complejo T $\beta$ -Mg·ADP puede ser explicado satisfactoriamente a partir de la desolvatación de las superficies del sitio de unión de la proteína y el ligando (Pérez-Hernández, G., 2002). Para realizar este análisis, se utilizaron las coordenadas de las subunidades con Mg·ADP ( $\beta_{\text{DP}}$ ) y vacía ( $\beta_{\text{E}}$ ) extraídas de la estructura de rayos X MF<sub>1</sub> (Abrahams, J., *et al.* 1994). Usando estas coordenadas, se calcularon los cambios de área superficial accesible al solvente ( $\Delta A$ ) que acompañan a la formación del complejo. El enorme rearrreglo estructural involucrado en la transición a partir de  $\beta_{\text{E}}$  a  $\beta_{\text{DP}}$  provoca simultáneamente una exposición y un ocultamiento considerables de áreas superficiales en zonas opuestas de la proteína. Este fuerte efecto compensatorio resulta en cambios de área superficiales totales marginales en la proteína, explicando el porque del valor pequeño de  $\Delta C_{p_b}$  observado experimentalmente, el cual está básicamente dictado por el contacto entre la proteína y su ligando.

Siguiendo la misma aproximación, los cambios de área superficial fueron calculados para la unión de Mg·ATP a la subunidad  $\beta$  aislada, utilizando las estructuras  $\beta_E$  y  $\beta_{TP}$  de MF<sub>1</sub>. La *Tabla 6* muestra los valores de  $\Delta A$  para este complejo, y los compara con los obtenidos para el complejo con Mg·ADP. En este análisis, para las superficies de la ribosa de los nucleótidos se utilizaron parámetros específicos para azúcares, recientemente publicados (Chavelas y García-Hernández, 2009). Además, los parámetros para la capacidad calorífica específica para las superficies del Mg (II) y fosfato, se obtuvieron utilizando datos de hidratación disponibles en la literatura (Marcus, 1994).

**Tabla 6.** Cambios de área superficial y estimación del  $\Delta C_{p_b}$  basados en cambios estructurales para la formación de los complejos T $\beta$ -Mg·ADP y T $\beta$ -Mg·ATP.<sup>a</sup>

Superficie	$\Delta A$ (Å <sup>2</sup> )		$\Delta c_{p_i}$ (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> Å <sup>-2</sup> )
	T $\beta$ -Mg·ADP	T $\beta$ -Mg·ATP	
<b>Proteína</b>			
Polar	-9	-61	-0.27 <sup>b</sup>
Apolar	-240	-384	0.45 <sup>b</sup>
<b>Nucleótido</b>			
Magnesio	-72	-59	-0.36 <sup>c</sup>
Fosfato	-143	-203	-0.43 <sup>c</sup>
Hidroxilo (ribosa)	-34	-39	0.10 <sup>d</sup>
No-ring carbon (ribosa)	-19	-15	0.36 <sup>d</sup>
Ring carbon (ribosa)	-32	-29	0.09 <sup>d</sup>
Nitrógeno (adenina)	-107	-106	-0.27 <sup>b</sup>
Carbono (adenina)	-84	-80	0.45 <sup>b</sup>
<b>Cálculos basados en</b>			
$\Delta A$			
$\Delta C_{p_{calc}}$ (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	-40	-67	
$\Delta C_{p_{exp}}$ (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	-36	-150	

<sup>a</sup> Las coordenadas atómicas de las tres subunidades fueron extraídas de la estructura de rayos X de MF<sub>1</sub> (pdb 1bmf) y utilizadas para calcular los valores de  $\Delta A$  para la unión de la subunidad  $\beta$  libre ( $\beta_E$ ) al Mg·ADP ( $\beta_{DP}$ ) y al Mg·ATP ( $\beta_{TP}$ ).

<sup>b</sup> Obtenida de (Luque y Freyre, 1998).

<sup>c</sup> Obtenida de los valores de capacidad calorífica reportados por Marcus (1994).

<sup>d</sup> Obtenida de Chavelas y García-Hernández (2009).

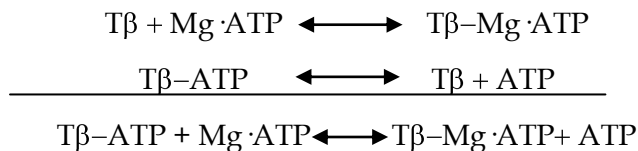
Como se observa en la *Tabla 6*, el uso de este conjunto refinado de parámetros proporciona un excelente valor estimado de  $\Delta C_{p_b}$  para el complejo T $\beta$ -Mg·ADP. En contraste, en el caso del complejo T $\beta$ -Mg·ATP, el valor estimado resultó la mitad del valor obtenido

calorimétricamente. Esto sugiere que la conformación  $\beta_{TP}$  de  $MF_1$  no es un buen modelo (como  $\beta_{DP}$ ) para la conformación unida a  $Mg \cdot ATP$  de la  $T\beta$  aislada.

Yaggi *et al.* (2004) midieron la unión de nucleótidos utilizando las señales de RMN de los 12 residuos de tirosinas que posee la subunidad  $T\beta$ . El espectro de RMN para  $T\beta$  unida a ADP,  $Mg \cdot ADP$  y  $ATP$  mostraron ser muy similares entre ellos, y diferentes al complejo  $T\beta \cdot Mg \cdot ATP$ . Más recientemente, Yaggi *et al.* (2009) realizaron un estudio más detallado de RMN para analizar los cambios conformacionales en  $T\beta$  inducidos por el nucleótido. Utilizando marcado isotópico segmentado, los autores encontraron que la orientación relativa del dominio carboxilo terminal en los complejos de  $T\beta$  unido a  $MgATP$  y  $MgADP$  difiere  $10^\circ$ . Estos estudios indican que la subunidad  $T\beta$  monomérica adopta diferentes conformaciones cuando une  $Mg \cdot ATP$  y  $Mg \cdot ADP$ , de forma que la subunidad  $T\beta$  adopta una conformación más cerrada cuando une  $Mg \cdot ATP$ . Así, el valor más negativo de  $\Delta C_p$  para el complejo  $T\beta \cdot Mg \cdot ATP$  podría ser explicado sobre las bases de un mayor ocultamiento de áreas superficiales de la proteína, provocado por un mayor cambio conformacional comparado con el observado en  $T\beta$  de  $MF_1$  (Abrahams *et al.* 1994).

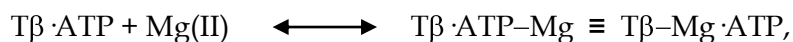
***Energética del reconocimiento de unión de nucleótidos de  $Mg(II)$  por la subunidad  $T\beta$  aislada.***

De acuerdo con la ley de Hess, la diferencia entre los complejos  $T\beta \cdot Mg \cdot ATP$  y  $T\beta \cdot ATP$  corresponden a la transferencia del ión  $Mg(II)$  a partir de  $ATP$  al complejo preformado  $T\beta \cdot ATP$ :

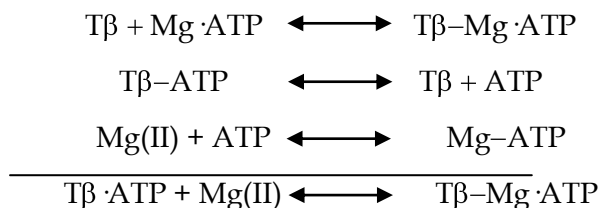


**Esquema 1**

Para determinar la contribución del Mg(II) en la unión



la asociación entre el ión metálico y el ATP libre necesita ser considerado



### Esquema 2

La *Tabla 7A* muestra los cálculos de acuerdo al esquema 2, utilizando los datos termodinámicos de las *Tablas 1 y 2*. Como puede observarse, la unión del Mg es favorecida por aproximadamente 7 kcal mol<sup>-1</sup> en la energía libre de Gibbs, contra ~1 kcal mol<sup>-1</sup> obtenida de la diferencia directa entre los complejos Tβ-Mg·ATP y Tβ-ATP. El ión Mg es secuestrado por Tβ-ATP y esta reacción es tanto entálpica como entrópicamente conducida. En contraste, si sólo fuese considerada la diferencia entre los complejos Tβ-Mg·ATP y Tβ-ATP, se llegaría a un panorama diferente: que la unión del Mg (II) es entálpicamente conducida y entrópicamente desfavorable. Resultados similares a los calculados al considerar el esquema 2 son obtenidos si los parámetros para la unión de Mg (II) a Tβ-nucleótido son calculados utilizando los parámetros para la unión de Mg(II) al ATP y los parámetros de cooperatividad ( $K_{b1}^* = \alpha K_{b1}$ ,  $\Delta H_{b1}^* = \Delta H_{b1} + \Delta h$ ; ver *materiales y métodos*). De hecho, esta es otra forma de aplicar la ley de Hess.

**Tabla 7.** Parámetros termodinámicos para la unión de Mg(II) a:

A) Tβ·ATP

		$\Delta G_b$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_b$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$T\Delta S_b$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta C_{p_b}$ (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	
Tβ + Mg·ATP	$\rightleftharpoons$	Tβ-Mg·ATP	-6.8	-10.4	-3.6	-150
Tβ-ATP	$\rightleftharpoons$	Tβ + ATP	5.6	3.4	-2.2	99
Mg(II) + ATP	$\rightleftharpoons$	Mg-ATP	-6.2	4.4	10.6	37
Tβ·ATP + Mg(II)	$\rightleftharpoons$	Tβ·ATP-Mg	-7.4	-2.6	4.8	-14

B) T $\beta$ ·ADP

		$\Delta G_b$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_b$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$T\Delta S_b$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	
T $\beta$ + Mg·ADP	$\rightleftharpoons$	T $\beta$ -Mg·ADP	-6.6	-10.5	-3.9
T $\beta$ ·ADP	$\rightleftharpoons$	T $\beta$ + ADP	6.5	7.1	0.6
Mg(II) + ADP	$\rightleftharpoons$	Mg-ADP	-4.6	3.7	8.3
T $\beta$ ·ADP + Mg(II)	$\rightleftharpoons$	T $\beta$ ·ADP-Mg	-4.7	0.3	5.0

Para explorar las características moleculares de la incorporación de Mg(II) a T $\beta$ ·ATP, se calculó el valor de  $\Delta C_{p_b}$  teórico. En la estructura de  $\beta_{TP}$  unida al Mg·AMPPNP extraída a partir de la estructura cristalográfica de MF<sub>1</sub>, el átomo del Mg(II) está completamente inaccesible al solvente. La remoción del Mg(II) del complejo, no provoca cambios de área superficial considerables ni en el nucleótido ni en la proteína (<1 Å<sup>2</sup>). Así, en el caso de una asociación tipo cuerpo rígido entre el Mg (II) y T $\beta$ ·ATP, la capacidad calorífica correspondería enteramente a la desolvatación del ión Mg (II). La completa desolvatación de un ión Mg (II) conlleva un incremento de 39 cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> en la capacidad calorífica, una vez que se ha corregido por los efectos de expansión (Makhatadze and Privalov, 1992). Este valor es significativamente diferente al valor negativo del  $\Delta C_{p_b}$  obtenido a partir de los datos calorimétricos obtenidos para el secuestro de Mg(II) por T $\beta$ ·ATP (Tabla 7A). En conjunto, estos resultados indican que ciertos rearrreglos conformacionales ocurren en el complejo T $\beta$ ·ATP después de la unión con el Mg (II). Esto es consistente con las variaciones conformacionales entre los complejos T $\beta$ ·ATP y T $\beta$ -Mg·ATP evidenciados a partir de los datos de RMN (Yaggi *et al.*, 1999; Yaggi *et al.*, 2009).

La contribución del Mg (II) en el complejo T $\beta$ -Mg·ADP fue también determinado en este trabajo. Para tal propósito, los parámetros de formación de los complejos T $\beta$ -ADP y Mg-ADP fueron medidos calorimétricamente (Tabla 6B). Similar a lo observado con el complejo Mg-ATP, la unión del Mg (II) al ADP libre es entrópicamente conducida y entálpicamente desfavorable, aunque con una constante de unión un orden de magnitud más pequeña ( $K_b = 2455 \pm 108$  M<sup>-1</sup>). En el caso del complejo T $\beta$ -ADP, la interacción es más estable ( $K_b = 60,000$  M<sup>-1</sup>) y más exotérmica (aproximadamente dos veces más negativa) que para el complejo T $\beta$ -ATP. Con la determinación de los parámetros calorimétricos para la formación

de T $\beta$ -ADP y Mg-ADP, los datos calorimétricos reportados previamente (Pérez-Hernández *et al.*, 2002) fueron reanalizados utilizando el modelo ternario descrito en *materiales y métodos* (Tabla 2). Debido a que no se encontró evidencia de la formación del complejo Mg<sub>2</sub>-ADP, K<sub>b2</sub> y  $\Delta H_{b2}$  fueron fijadas en cero al realizar el ajuste de los datos.

Como se muestra en la Tabla 6B, hay algunas diferencias en la energética de unión de los dos nucleótidos con T $\beta$ . La interacción de T $\beta$  con Mg·ATP es energéticamente similar a la del Mg·ADP. Sin embargo, las diferencias termodinámicas entre los complejos T $\beta$ -Mg·ATP y T $\beta$ -ATP son significativamente mayores que las que corresponden a los complejos con ADP, indicando un efecto diferente del ión metálico en ambos complejos de T $\beta$ -nucleótidos. De acuerdo al esquema 2, el complejo T $\beta$ ·ATP une al Mg (II) con mayor afinidad que el complejo T $\beta$ ·ADP. Esta mejor afinidad se debe principalmente a la contribución entálpica favorable, mientras que las entropías de unión de ambos complejos son aproximadamente del mismo valor. La entalpía de unión es una medida de la fuerza de interacción de las partes moleculares ( $\Delta H_{int}$ ) relativa al pago energético por la desolvatación ( $\Delta H_{dsolv}$ ) de las superficies en contacto:

$$\Delta H_b = \Delta H_{int} + \Delta H_{dsolv}$$

Algunos ejemplos pueden encontrarse en la literatura de valores exotérmicos ( $\Delta H_{int} < -\Delta H_{dsolv}$ ) o endotérmicos ( $\Delta H_{int} > -\Delta H_{dsolv}$ ) en el reconocimiento de metales por las proteínas (Wilcox, D., 2008). De acuerdo con esto, es claro que el complejo T $\beta$ ·ATP proporciona un mejor ambiente estereoquímico para el anclaje del Mg (II) que el de T $\beta$ ·ADP. De hecho, algunos estudios con mutaciones han mostrado que la completa coordinación del Mg (II) en el sitio catalítico cerrado de F<sub>1</sub> requiere la presencia del fosfato  $\gamma$  del ATP (Weber *et al.* 1998). El fosfato  $\beta$  del ATP y cuatro residuos de la subunidad  $\beta$  (tres de ellos unidos vía moléculas de agua estructural) complementan la coordinación del ión metálico. Por lo tanto, debido a que ningún residuo de la subunidad  $\alpha$  es involucrado en la unión del Mg (II) en F<sub>1</sub>, en principio la completa coordinación del ión metálico puede lograrse en la subunidad  $\beta$  aislada en presencia de ATP, mientras que en con ADP no es posible completar dicha coordinación.



Otra forma de ver el efecto del Mg (II) en el reconocimiento de nucleótidos por T $\beta$  es a través de la constante de asociación cooperativa heterotrópica ( $\alpha$ ), la cual es calculada como la relación entre las constantes de unión de T $\beta$ -Mg·ATP y T $\beta$ -ATP (ver *materiales y métodos*) (Velázquez-Campoy, A., 2006; Martínez-Julvez, M., 2009). De acuerdo a los datos de la *Tabla 4*, la unión de ATP y el Mg (II) a T $\beta$  es altamente cooperativa ( $\alpha = 7.7$ ), mientras que el Mg (II) no tiene ese efecto en el caso del ADP ( $\alpha = 1.1$ ). De forma similar, la entalpía cooperativa ( $\Delta h$ ) está dada por la diferencia de entalpía entre los complejos de T $\beta$  unido a nucleótido con y sin Mg (II). Para el reconocimiento de ATP,  $\Delta h$  es  $-7.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ , mientras que para el ADP,  $\Delta h$  es  $-3.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ . El término de entropía cooperativa para ATP,  $\Delta s$ , es  $-5.8 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , mientras que para ADP es  $-3.3 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ . En el caso de ADP, la entalpía y la entropía cooperativa se cancelan dando un resultado nulo en la energía de Gibbs cooperativa. Además, los términos entrópico y entálpico para el ATP son más negativos (aproximadamente dos veces) que aquellos para el ADP. Con respecto a la cooperatividad de unión en el sistema ternario constituido por T $\beta$ -Mg·ADP, y considerando al ATP como la molécula de referencia, este sistema representa un ejemplo de acoplamiento entre una interacción homotrópica cooperativa (ATP puede unirse a uno o dos iones Mg (II)) y una interacción heterotrópica cooperativa (ATP puede unir T $\beta$ , puede unir Mg(II), o puede unir simultáneamente T $\beta$  y Mg(II), pero la unión de un segundo Mg(II) excluye la unión de ATP).

Resulta interesante notar que mientras la diferencia en la entalpía de formación entre los complejos T $\beta$ -Mg·ATP y T $\beta$ -Mg·ADP ( $\Delta\Delta H_b = -0.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) es muy similar a la que existe entre los complejos Mg-ATP y Mg-ADP ( $\Delta\Delta H_b = -0.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), la diferencia en la entropía de formación es significativamente más pequeña ( $\Delta(T\Delta S_b) = 0.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ , comparado con  $\Delta(T\Delta S_b) = 2.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) (*Tabla 5B*). El cambio neto en el número de grados de libertad después de la asociación molecular está determinada por tres contribuciones principales:

$$\Delta S_b = \Delta S_{\text{conf}} + \Delta S_{\text{solv}} + \Delta S_{\text{r-t}}$$

Donde  $\Delta S_{\text{conf}}$ ,  $\Delta S_{\text{solv}}$  y  $\Delta S_{\text{r-t}}$  corresponden a los cambios de entropía conformacional, de solvatación y roto-translacional, respectivamente (Luque y Freire, 1998). Está documentado que la formación de complejos bimoleculares involucra una pérdida constante de  $\Delta S_{\text{r-t}}$ , independientemente del tamaño de las moléculas que están interactuando (Amzel, 1997). Por

otro lado, es de esperar que la presencia del fosfato  $\gamma$  del ATP propicie un  $\Delta S_{\text{solv}}$  favorable, debido a que se oculta en la unión a la proteína una mayor área superficial. Por lo tanto, la pequeña diferencia en la entropía entre los complejos  $T\beta\text{-Mg}\cdot\text{ATP}$  y  $T\beta\text{-Mg}\cdot\text{ADP}$  puede ser interpretada en términos de un  $\Delta S_{\text{conf}}$  más desfavorable para la formación del complejo  $T\beta\text{-Mg}\cdot\text{ATP}$ , es decir, el congelamiento de una mayor número de enlaces rotables de la proteína.

En general, el análisis realizado arriba indica que el aducto  $T\beta\cdot\text{ATP}$  representa un mejor sitio para el anclaje del  $\text{Mg(II)}$  que el aducto  $T\beta\cdot\text{ADP}$ . Por lo tanto, los cambios en la entropía y en la capacidad calorífica son consistentes con que la subunidad catalítica adopta una conformación más cerrada cuando une  $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$  que cuando está uniendo  $\text{ATP}$  o  $\text{Mg}\cdot\text{ADP}$ . Estos resultados confirman y complementan en términos energéticos los resultados obtenidos recientemente por Yagi *et al.* (2009), quienes encontraron que en presencia de  $\text{Mg(II)}$ , el fosfato  $\gamma$  induce un rearrreglo estructural adicional en el sitio catalítico, un arreglo que no es observado después de la unión con  $\text{ADP}$  o  $\text{Mg}\cdot\text{ADP}$ .

### ***Papel energético del Mg en el reconocimiento de ATP por el sitio catalítico en $F_1$***

A pesar de la abundante información disponible sobre las propiedades catalíticas y de unión de  $F_1$ , existe un debate significativo con respecto a si es necesaria la ocupación de dos (Boyer, 1997; Milgrom y Cross, 2005; Bulygin y Milgrom, 2007; Dong, 2002) o tres sitios (Dou *et al.* 1998; Weber y Senior, 2001; Yasuda *et al.* 2003) para alcanzar la actividad catalítica máxima de  $\text{ATPase}$ . Además, algunos datos cinéticos y de unión de la  $\text{ATP-sintasa}$  y sus diferentes subcomplejos han mostrado ser difíciles de analizar e interpretar. Por ejemplo, aunque los sitios catalíticos de  $F_1$  muestran cooperatividad negativa para la unión (Kayalar, 1977; Zheng, 2009), algunos datos experimentales han sido descritos utilizando modelos de sitios secuenciales o sitios independientes (Milgrom y Cross, 2005; Dou, 1998).

Evidentemente, la solución de estos aspectos mecánicos es esencial para la correcta determinación de los parámetros de unión de  $F_1$ . Algunos estudios basados ya sea en modelos bi- o tri-sitios han sido reportados, donde se miden las constantes de asociación

tanto de nucleótidos de Mg (II), como de nucleótidos libres de Mg(II). Así, como se realizó anteriormente con la subunidad aislada T $\beta$ , las contribuciones a la energía libre de Gibbs del Mg(II) en los sitios catalíticos de F<sub>1</sub> fueron determinados utilizando los datos de unión de bi-sitios y tri-sitios reportados en la literatura. Es útil recordar que, de acuerdo al análisis presentado arriba para la subunidad T $\beta$  aislada, la determinación de los verdaderos parámetros termodinámicos para el reconocimiento del nucleótido unido al Mg(II) requiere la consideración simultánea de los parámetros de asociación del nucleótido libre al ATP o al Mg (II). No obstante, en el caso de T $\beta$ , solo diferencias significativas en los valores de  $\Delta H_b$  y  $\Delta S_b$  ( $< 2 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) fueron obtenidos usando un modelo simple de unión binario o un modelo complejo ternario, mientras las diferencias en  $\Delta G_b$  ( $< 0.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) fueron despreciables.

Senior y sus colaboradores han estudiado exhaustivamente F<sub>1</sub> de *E. coli* (EF<sub>1</sub>), siguiendo el apagamiento de un residuo de Trp introducido en la posición 331 de la subunidad  $\beta$  (EF<sub>1</sub> $\beta$ Y331W) (Nadanaciva *et al.*, 1999; Weber, *et al.* 1998; Prabhu and Sharp, 2005; Yasuda, *et al.* 2003; Bandyopadhyay *et al.* 2002). Los datos de unión fueron analizados usando un modelo de tres sitios independientes (S1, S2 y S3). La *Tabla 8A* muestra la energía de Gibbs para la unión de los sitios catalíticos de EF<sub>1</sub> al ADP y al ATP, en presencia y ausencia de Mg(II). En presencia del ión metálico, fueron observadas tres diferentes afinidades. De acuerdo con estos datos, EF<sub>1</sub> presenta una mayor afinidad por el Mg·ATP que por el Mg·ADP. Para ambos nucleótidos,  $\Delta G_b(S1)$  es  $\sim 2.5 \text{ kcal/mol}$  más exergónico que  $\Delta G_b(S2)$ , el cual es  $\sim 1.7 \text{ kcal/mol}$  más negativo que  $\Delta G_b(S3)$ . En contraste, los tres sitios mostraron afinidades idénticas en ausencia de Mg (II). Este último resultado condujo a la propuesta de que el Mg (II) es esencial para impartir las propiedades de asimetría en la unión en F<sub>1</sub>.

En un estudio reciente, Bulygin y Milgrom (2007) notaron que el sulfato compite con los nucleótidos de adenosina por los sitios catalíticos en EF<sub>1</sub>, similar a lo que se había observado previamente para el fosfato inorgánico. Esta observación resulta relevante, ya que una muchos estudios (incluyendo los del laboratorio de Senior) han sido realizados utilizando al sulfato como cosoluto. Bulygin y Milgrom (2007) obtuvieron las constante de unión de EF<sub>1</sub> $\beta$ Y331W libre de sulfato con ADP, Mg·ADP y ATP considerando dos sitios de unión independientes, mientras que Mg·ATP no fue utilizado en este estudio. La *Tabla 8B* muestra

los datos de unión bi-sitio para ADP y Mg·ADP. Las mediciones realizadas en ausencia de sulfato revelaron que los sitios catalíticos de EF<sub>1</sub>βY331W también presentan diferentes afinidades para los nucleótidos libres de Mg(II), una observación que contradice la visión de que el ión metálico es determinante para la asimetría de unión. Para Mg·ADP, la diferencia entre ΔG<sub>b</sub>(S1) y ΔG<sub>b</sub>(S2) (~4 kcal/mol) es significativamente mayor que la diferencia entre los mismos sitios bajo el modelo tri-sitio (~2.5 kcal/mol). Además, bajo el modelo de dos sitios la diferencia entre S1 y S2 no es sensible a la presencia o ausencia de Mg(II).

**Tabla 8.** Energética de unión para los sitios catalíticos de F<sub>1</sub><sup>a</sup>.

**A. Datos Tri-sitio para EF<sub>1</sub><sup>b</sup>**

ΔG <sub>b</sub> (S1)	ΔG <sub>b</sub> (S2)	ΔG <sub>b</sub> (S3)	ΔG <sub>b</sub> (S1)=ΔG <sub>b</sub> (S2)=ΔG <sub>b</sub> (S3)	ΔG <sub>b</sub> (S1)	ΔG <sub>b</sub> (S2)	ΔG <sub>b</sub> (S3)	Ref
EF <sub>1</sub> β + Mg·ATP			EF <sub>1</sub> β + ATP	EF <sub>1</sub> β·ATP + Mg(II)			Weber and Senior, 2004
-10.43	-7.93	-6.17	-5.79	-10.84	-8.36	-6.50	
EF <sub>1</sub> β + Mg·ADP			EF <sub>1</sub> β + ADP	EF <sub>1</sub> β·ADP +Mg(II)			Weber and Senior, 2004
-10.02	-7.78	-6.04	-5.53	-10.29	-8.05	-5.80	

**B. Datos Bi-sitio para EF<sub>1</sub><sup>b</sup>**

ΔG <sub>b</sub> (S1)	ΔG <sub>b</sub> (S2)	ΔG <sub>b</sub> (S1)	ΔG <sub>b</sub> (S2)	ΔG <sub>b</sub> (S1)	ΔG <sub>b</sub> (S2)	Referencia
EF <sub>1</sub> β + Mg·ADP		EF <sub>1</sub> β + ADP		EF <sub>1</sub> β·ADP +Mg(II)		Bulygin and Milgrom 2007
-10.80	-6.88	-9.95	-5.99	-6.91	-6.95	

**C. Datos Tri-sitio para TF<sub>1</sub><sup>c</sup>**

ΔG <sub>b</sub> (S2)	ΔG <sub>b</sub> (S3)	ΔG <sub>b</sub> (S2)	ΔG <sub>b</sub> (S3)	ΔG <sub>b</sub> (S2)	ΔG <sub>b</sub> (S3)	Referencia
TF <sub>1</sub> β+ Mg·ATP		TF <sub>1</sub> β + ATP		TF <sub>1</sub> β·ATP +Mg(II)		Marcus, 1994
-9.00	-6.26	-6.91	-5.60	-8.28	-6.71	
TF <sub>1</sub> β + Mg·ADP		TF <sub>1</sub> β + ADP		TF <sub>1</sub> β·ADP +Mg(II)		Bandyopadhyay <i>et al.</i> 2002
-9.11	-6.37	-7.85	-6.19	-5.88	-4.80	

<sup>a</sup> ΔG<sub>b</sub> valores en kcal mol<sup>-1</sup>

<sup>b</sup> Datos obtenidos a 23 °C

<sup>c</sup> Datos obtenidos a 25 °C

Allison y colaboradores reportaron datos de unión tri-sitio de  $TF_1$  también utilizando una mutante de la subunidad  $\beta$ ,  $\beta Y341W$  (Bandyopadhyay *et al.*, 2002; Dou *et al.*, 1998). La *Tabla 8C* muestra los valores sólo para los sitios catalíticos S2 y S3, debido a que bajo las condiciones utilizadas por los autores, no fue posible resolver el valor de  $\Delta G_b(S1)$ . Los valores de  $\Delta G_b(S2)$  para los nucleótidos-Mg son significativamente más exergónicos para  $TF_1$  que para  $EF_1$ , mientras que los valores para  $\Delta G_b(S3)$  son muy similares. En la unión de nucleótidos sin Mg(II), tres diferentes afinidades fueron observadas para  $TF_1$ , con un valor de  $\Delta G_b(S3)$  comparable a los valores obtenidos para los tres sitios catalíticos de  $EF_1$ .

Los modelos de unión de dos o tres sitios conducen a diferentes escenarios para el papel del Mg (II) en la estabilización de  $F_1$  (*Tabla 8*). Los datos inferidos con modelos de tres sitios indican que la incorporación del ión Mg(II) depende altamente de la conformación del sitio catalítico, con la fuerza de estabilización relacionada directamente con la afinidad por los nucleótidos-Mg. Esta conclusión parece ser la misma independientemente de si los tres sitios catalíticos son considerados teniendo diferentes o idénticas afinidades por nucleótidos sin Mg(II). En el caso de  $EF_1$ , la diferencia entre  $\Delta G_b(S1)$  y  $\Delta G_b(S2)$  es mayor que entre  $\Delta G_b(S2)$  y  $\Delta G_b(S3)$ . Debido a que  $\beta_{TP}$  y  $\beta_{DP}$  son conformacionalmente muy similares entre ellas, significa que el Mg (II) percibe de alguna forma el ambiente asimétrico proporcionado por las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  adyacentes. En contraste, el modelo de dos sitios conduce a la conclusión de que el Mg (II) contribuye de forma similar en ambos sitios catalíticos. En otras palabras, el Mg (II) *per se* no hace ninguna contribución a la heterogeneidad de los sitios catalíticos, al menos en términos de  $\Delta G_b$ . La idea de que las interacciones inter-subunidades son capaces por sí solas de inducir la heterogeneidad de los sitios catalíticos al unir los nucleótidos ha recibido recientemente mucha importancia a partir de la estructura cristalográfica de  $F_1$  mitocondrial, sin nucleótidos, donde las tres subunidades presentan diferentes conformaciones (Kabaleeswaran *et al.*, 2009), similar a las observadas en la estructura de  $MF_1$  unida a nucleótidos.

Similarmente a lo observado para la subunidad  $T\beta$  aislada, las constantes de afinidad disponibles para los sitios catalíticos de  $F_1$  indican que los efectos de estabilización del Mg (II) dependen significativamente del nucleótido involucrado. Recientemente ha sido sugerido

que para liberar los productos eficientemente, la subunidad  $\beta$  uniendo ADP en  $F_1$  podría adoptar una conformación menos cerrada que la de la subunidad uniendo ATP (Yagi *et al.*, 2009). Así, el cambio conformacional dependiente del nucleótido y el comportamiento energético de la subunidad monomérica parecen tener repercusiones funcionales en  $F_1$ . Para explorar las bases energéticas que conducen el reconocimiento de nucleótidos por parte de los sitios catalíticos de  $F_1$ , una caracterización calorimétrica de la unión de este oligómero con nucleótidos-Mg y nucleótidos libres de Mg(II) está siendo realizada actualmente en nuestro laboratorio.

## CONCLUSIONES

---

---

Al finalizar este estudio se observaron diferencias considerables en los parámetros termodinámicos entre los complejos  $T\beta\text{-Mg}\cdot\text{ATP} / T\beta\text{-ATP}$  a diferencia de las observadas entre los complejos  $T\beta\text{-Mg}\cdot\text{ADP} / T\beta\text{-ADP}$  o entre  $T\beta\text{-Mg}\cdot\text{ATP} / T\beta\text{-Mg}\cdot\text{ADP}$ . Los datos de unión obtenidos para los complejos estudiados, en conjunto con los obtenidos para la asociación del Mg (II) libre con los nucleótidos, permitió realizar una determinación energética de los efectos del ión metálico en el reconocimiento de los nucleótidos de adenosina por  $T\beta$ . Se observó una contribución entálpica favorable para la unión, mostrando que el Mg (II) es reconocido por el complejo  $T\beta\cdot\text{ATP}$  con mayor avidez que por el complejo  $T\beta\cdot\text{ADP}$ , indicando una mejor complementariedad estereoquímica. El análisis energético-estructural sugiere que  $T\beta$  adopta una conformación más cerrada cuando une  $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$  que con  $\text{ATP}$  o  $\text{Mg}\cdot\text{ADP}$ , lo cual coincide con lo reportado recientemente en estudios realizados con RMN. Utilizando datos publicados, se realizó un análisis similar considerando los efectos energéticos del Mg(II) sobre el cambio de energía libre en los sitios catalíticos de  $F_1$ . Las constantes de afinidad disponibles para los sitios catalíticos de  $F_1$  indican que los efectos de estabilización del Mg (II) dependen significativamente del nucleótido involucrado (AT(D)P).

## PERSPECTIVAS

---

---

El método de calorimetría de titulación isotérmica y el análisis estructural han demostrado proporcionar datos cuantitativos de la relación entre la estructura y la función de las proteínas. Para obtener el esquema completo del funcionamiento de la ATP-sintasa se plantean las siguientes perspectivas:

- Caracterizar mediante ITC los parámetros termodinámicos para la formación de los complejos de  $TF_1$  con  $AMPPNP \cdot Mg$ ,  $ADP \cdot Mg$ ,  $AMPPNP$ ,  $ADP$  y  $ATP$ .
- Generar mediante biología molecular construcciones de  $F_1$  sin capacidad de unir nucleótidos en los sitios no catalíticos.
- Generar mediante biología molecular construcciones de  $F_1$  sin capacidad de unir nucleótidos en los sitios catalíticos.
- Caracterizar mediante ITC la formación de los complejos de las mutantes con  $AMPPNP \cdot Mg$ ,  $ADP \cdot Mg$ ,  $AMPPNP$ ,  $ADP$  y  $ATP$ .
- Generar un modelo de cooperatividad y comunicación entre sitios basado en estados al equilibrio.
- Evaluar el papel energético-estructural del magnesio en el reconocimiento de nucleótidos dentro del núcleo catalítico  $F_1$ .



## BIBLIOGRAFÍA

---

---

- Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., and Walker, J. E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621-628
- Alberty, R. A. (1969) Maxwell relations for thermodynamics quantities of biochemical reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 91, 3899-3903
- Amzel, L.M. (1997) Loss of translational entropy in binding, folding, and catalysis. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 28,144-149
- Antes, I., Chandler, D., Wang, H., and Osterz, G. (2003). The unbinding of ATP from F<sub>1</sub>-ATPase. *Biophysical J.* 25, 695-706.
- Baker, B.M. and Murphy, K. P. (1998) Prediction of binding energetics from structure using empirical parameterization. *Methods Enzymol* 323:167- 177
- Bandyopadhyay, S., Valder, C. R., Huynh, H. G., Ren, H., and Allison, W. S. (2002) The βG156C substitution in the F<sub>1</sub>-ATPase from the thermophilic *Bacillus* PS3 affects catalytic site cooperativity by destabilizing the closed conformation of the catalytic site. *Biochemistry* 41, 14421-14429
- Bello, M., Pérez-Hernández, G., Fernández-Velasco, DA., Arreguín-Espinosa, R., and García-Hernández, E. (2008) Energetics of protein homodimerization: effects of water sequestering on the formation of β-lactoglobulin dimer. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* 70, 1475-1487
- Bowler, M. W., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., and Walker, J. E. (2007) Ground state structure of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria at 1.9Å resolution. *J. Biol. Chem.* 282, 14238-14242.
- Boyer, P. D. (1993) The binding change mechanism for ATP synthase, some probabilities and possibilities *Biochem. Biophys. Acta* 1140, 215-230
- Boyer, P. D. (1997) The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 717-749
- Bulygin, V. V., and Milgrom, Y. M. (2007) Studies of nucleotide binding to the catalytic sites of *Escherichia coli* βY331W-F<sub>1</sub>-ATPase using fluorescence quenching. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 4327-4331
- Burgard, S., Jurgen H. N, Sauer, H. E., Kagawa, Y., Schafefl, H.J., Wise, J.G., Vogel, P.D. and Trommer, W.E. (1994). Effects of Magnesium Ions on the Relative Conformation of Nucleotide Binding Sites of F<sub>1</sub>-ATPases as Studied by Electron Spin Resonance Spectroscopy. *J Biol Chem.* 269:27 , 17815-17819.
- Chavelas, E. A., and García-Hernández, E. (2009) Heat capacity changes in carbohydrates and protein-carbohydrate complexes. *Biochem. J.* 420, 239-247

Dong, K., Ren, H., and Allison, W. S. (2002) The fluorescence spectrum of the introduced tryptophans in the  $\alpha_3(\beta F155W)_3\gamma$  subcomplex of the F1-ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3* cannot be used to distinguish between the number of nucleoside di- and triphosphates bound to catalytic sites. *J. Biol. Chem.* 277, 9540-9547

Dou, C., Fortes, G., and Allison, W. S. (1998) The  $\alpha_3(\beta Y341W)_3\gamma$  subcomplex of the F1-ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3* fails to dissociate ADP when MgATP is hydrolyzed at a single catalytic site and attains maximal velocity when three catalytic sites are saturated with MgATP. *Biochemistry* 37, 16757-16764

Frasch, W.D. (2000). The participation of metals in the mechanism of the F1ATP-ase, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1458: 310-325

Hubbard, S.J. and Thornton, J.M. NACCESS Computer Program, London UK: Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College; 1993

Kabaleeswaran, V., Puri, N., Walker, J.E., Leslie, A.G.W., and Mueller, D.M. (2006) Novel features of the rotary catalytic mechanism revealed in the structure of yeast F1 ATPase. *EMBO J.* 25, 5433-5442

Kayalar, C., Rosing, J., and Boyer, P.D. (1977) An alternating site sequence for oxidative phosphorylation suggested by measurement of substrate binding patterns and exchange reaction inhibitions. *J. Biol. Chem.* 252, 2486-2491

Ladbury, J.E., and Williams, M.A. (2004) The extended interface: measuring non-local effects in biomolecular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 562-569

Laemli, U.K. (1970) *Nature* 227: 680-685

Löbau S, Weber J, Wilke-Mounts S, Senior AE. (1997). F1-ATPase, roles of three catalytic site residues. *J Biol Chem.* Feb 7;272(6):3648-56

Luque, I., and Freire, E. (1998) Structure-based prediction of binding affinities and molecular design of peptide ligands. *Methods Enzymol.* 295, 100-135.

Makhatadze, G. I., and Privalov, P. L. (1992) Contribution of hydration and non-covalent interactions to the heat capacity effect on protein unfolding. *J. Mol. Biol.* 224, 715-723

Marcus, Y. (1994) A simple empirical model describing the thermodynamics of hydration of ions of widely varying charges, sizes, and shapes. *Biophys. Chem.* 51, 111-127

Martinez-Julvez, M., Medina, M., and Velazquez-Campoy, A. (2009) Binding thermodynamics of ferredoxin:NADP<sup>+</sup> reductase: Two different protein substrates and one energetics. *Biophys. J.* 96, 4966-4975

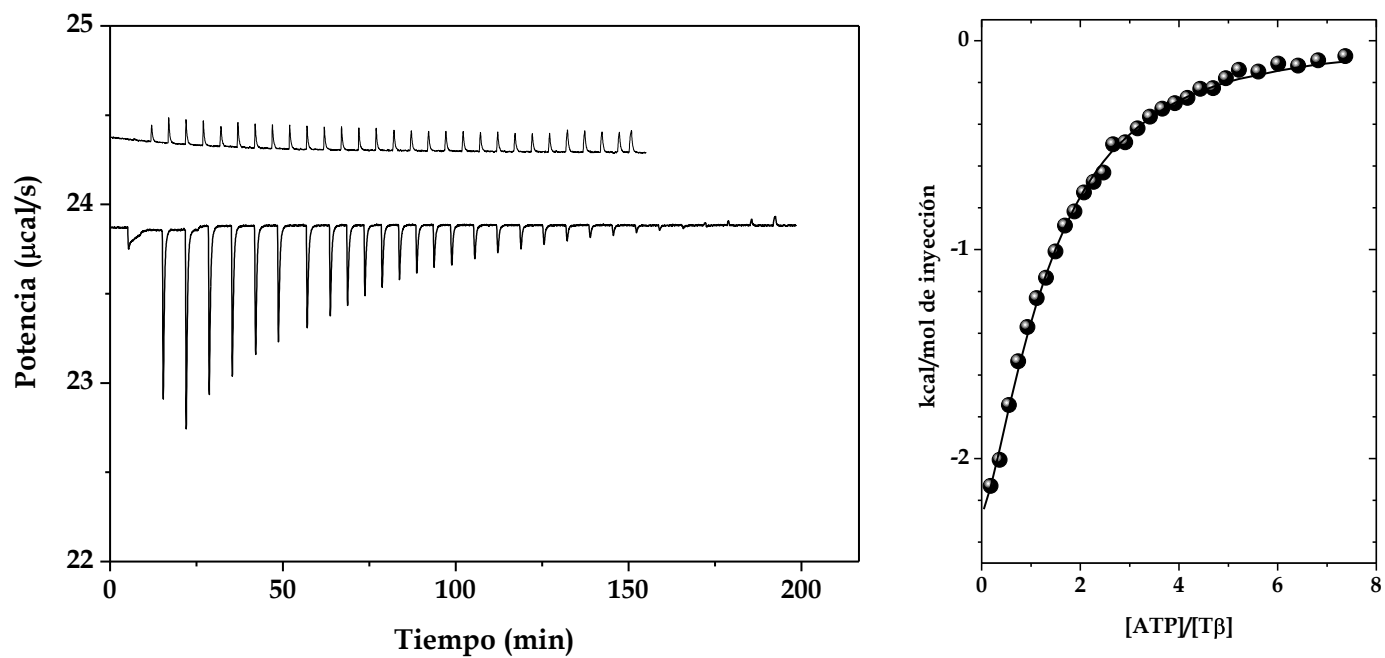
Menz, R.I., Leslie, A.G. W. and Walker, J.E. (2001) *FEBS Lett* 494:11-14.

Milgrom, Y. M., and Cross, R. L. (2005) Nucleotide binding sites on beef heart mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 13831-13836

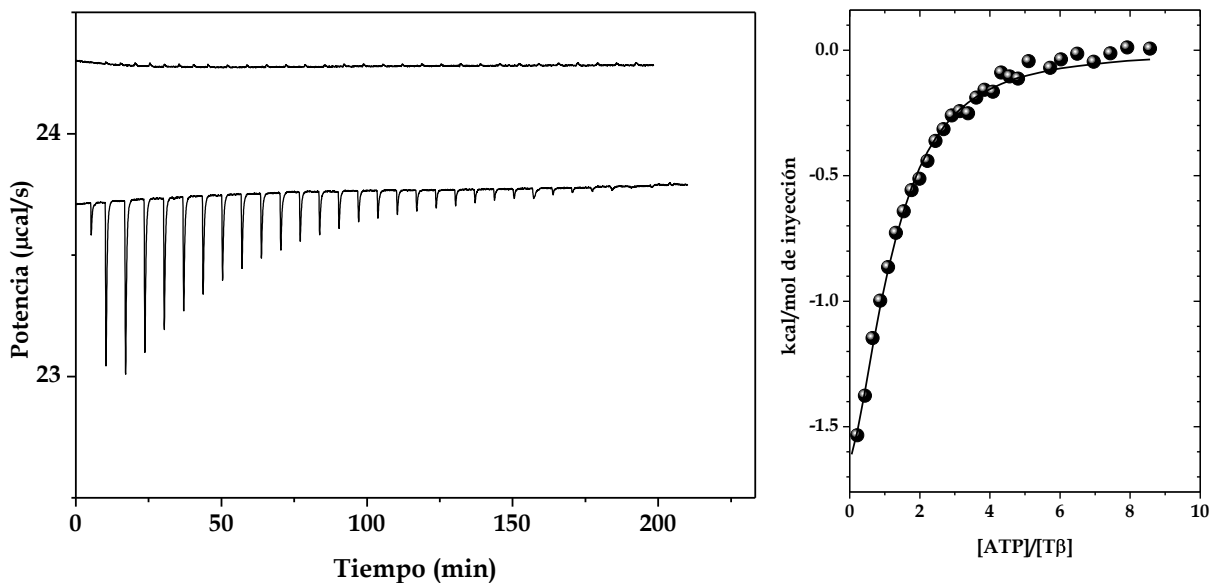
- Mills, D. and Richter, M. L. (1991) Nucleotide binding to isolated  $\beta$  subunit of the chloroplast ATP synthase. *J. Biol Chem* 266: 7440-7444
- Nadanaciva, S., Weber, J., and Senior, A. E. (1999) Binding of the transition state analog MgADP-fluoroaluminate. *J. Biol. Chem.* 274, 7052-7058
- Najera, P. H., Vázquez-Contreras, E., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Pérez-Hernández, G. (1999) Nucleotide Binding Drives Conformational Changes in the Isolated  $\alpha$  and  $\beta$  Subunits of the F<sub>1</sub>-ATPase from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266: 58-61
- Odaka, M., Kaibara, C., Amano, T., Matsui, T., Muneyuki, E., Ogasahara, K., Yutani, K., and Yoshida, M. (1994) Tyr-341 of the  $\alpha$  subunit is a major K<sub>m</sub>-determining residue of F<sub>1</sub>-ATPase: parallel effect of its mutations on K<sub>d</sub>(ATP) of the  $\alpha$  subunit and on K<sub>m</sub>(ATP) of the  $\alpha\beta\gamma$  complex. *J. Biochem.* 115, 789-796
- Ohta, S., Yohda, M., Ishizuka, M., Hirata, H., Hamamoto, T., Otawara, Y., Matsuda, K., and Kagawa, Y. (1988) Sequence and over-expression of subunits of adenosine triphosphate synthase in thermophilic bacterium PS3. *Biochim. et Biophys. Acta* 933: 141-155
- Pérez-Hernández, G., García-Hernández, E., Zubillaga, R. A., and Tuena de Gómez-Puyou, M. (2002) Structural energetics of MgADP binding to the isolated  $\beta$  subunit of F<sub>1</sub>-ATPase from thermophilic *Bacillus PS3*. *Arch. Biochem. Biophys.* 408, 177-183
- Prabhu, N. V., and Sharp, K. A. (2005) Heat capacity in proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 56, 521-548
- Senior, A. E., Nadanaciva, S., and Weber, J. (2002) The molecular mechanism of ATP synthesis by F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1553:188-211.
- Smith, R. M., Martell, A. E., and Chen, Y. (1991) Critical evaluation of stability constants for nucleotide complexes with protons and metal ions and the accompanying enthalpy changes. *Pure Appl. Chem.*, 63, 1015-1080
- Velázquez-Campoy, A., Goñi, G., Peregrina, J.R., and Medina, M. (2006) Exact analysis of heterotropic interactions in proteins: Characterization of cooperative ligand binding by isothermal titration calorimetry. *Biophys. J.* 91, 1887-1904
- Wang, P., Oscarson, J. L., Izatt, R. M., Watt, G. D., and Larsen, C. D. (1995) Thermodynamic parameters for the interaction of adenosine 5'-diphosphate, and adenosine 5'-triphosphate with Mg<sup>2+</sup> from 323.15 to 398.15 K. *J. Solution Chem.* 24, 989-1012
- Weber, J. and Senior, A. E. (2000) ATP synthase: what we know about ATP hydrolysis and what we do not know about ATP synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1458, 300-309
- Weber, J., and Senior, A. E. (2001) Bi-site catalysis in F<sub>1</sub>-ATPase: Does it exist? *J. Biol. Chem.* 276, 35422-35428
- Weber, J., Hammond, S. T., Wilke-Mounts, S., and Senior, A. E. (1998) Mg<sup>2+</sup> coordination in catalytic sites of F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochemistry* 37, 608-614

- Wilcox, D. (2008) Isothermal titration calorimetry of metal ions binding to proteins: An overview of recent studies. *Inorg. Chim. Acta* 361, 857-867
- Wilson, J. E., and Chin, A. (1991) Chelation of divalent cations by ATP, studied by titration calorimetry. *Anal. Biochem.* 193, 16-19
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., and Lin, L. N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* 179, 131-137
- Yagi, H., Kajirawa, N., Iwabuchi, T., Izumi, K., Yoshida, M., and Akutsu, H. (2009) Stepwise propagation of the ATP-induced conformational change of the F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$  subunit revealed by NMR. *J. Biol. Chem.* 284, 2374-2382
- Yagi, H., Tozawa, K., Sekino, N., Iwabuchi, T., Yoshida, M., and Akutsu, H. (1999) Functional conformation changes in the TF<sub>1</sub>-ATPase subunit probed by 12 tyrosine residues. *Biophys. J.* 77, 2175-2183
- Yagi, H., Tsujimoto, T., Yamazaki, T., Yoshida, M., and Akutsu, H. (2004) Conformational change of H<sup>+</sup>-ATPase  $\beta$  monomer revealed on segmental isotope labeling NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 16632-16638
- Yasuda, R., Masaike, T., Adachi, K., Noji, H., Itoh, H., and Kinosita Jr, K. (2003) The ATP-waiting conformation of rotating F<sub>1</sub>-ATPase revealed by single-pair fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 9314-9318
- Yoshida, M., Muneyuki, E., and Hisabori, T. (2001) ATP synthase, a marvelous rotatory engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 669-677
- Zheng, W. (2009) Normal-mode-based modeling of allosteric couplings that underlie cyclic conformational transition in F<sub>1</sub> ATPase. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* 76, 747-762

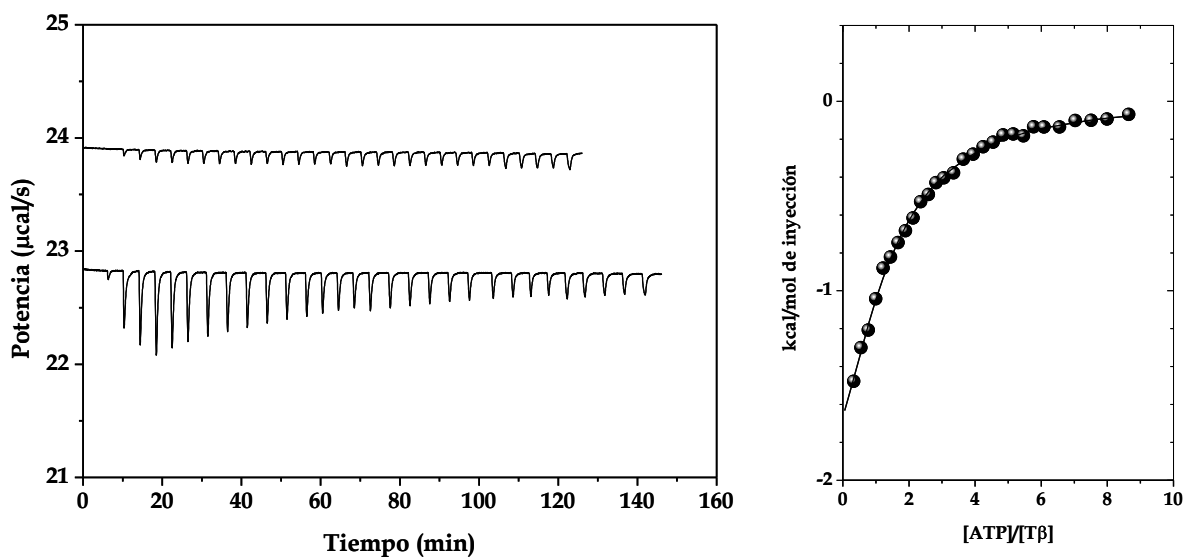
## APÉNDICE



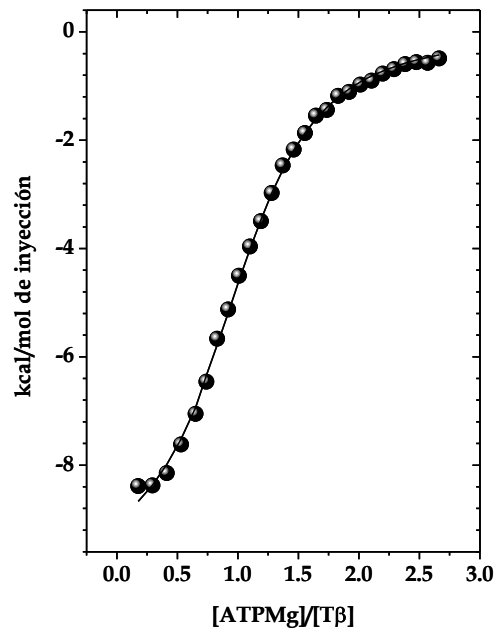
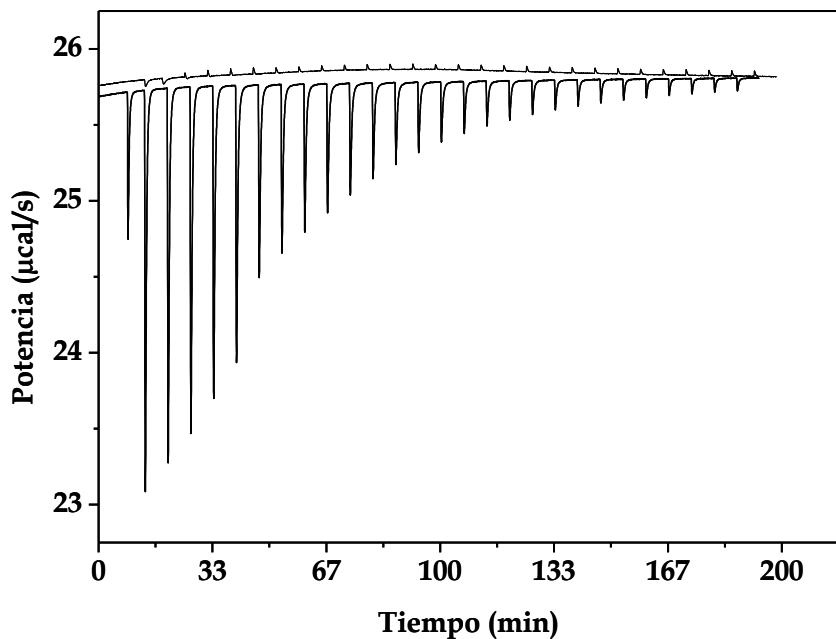
**Figura 10.** a) Potenciograma diferencial mostrando los datos crudos de la unión T $\beta$ -ATP, experimento realizado a 15°C. T $\beta$  (0.08 mM) y el ATP (2.6 mM) fueron disueltos en Tris-HCl 50 mM a pH 8. b) Isotherma de titulación, el mejor ajuste a los datos experimentales se observó al utilizar un modelo un solo tipo de sitio.



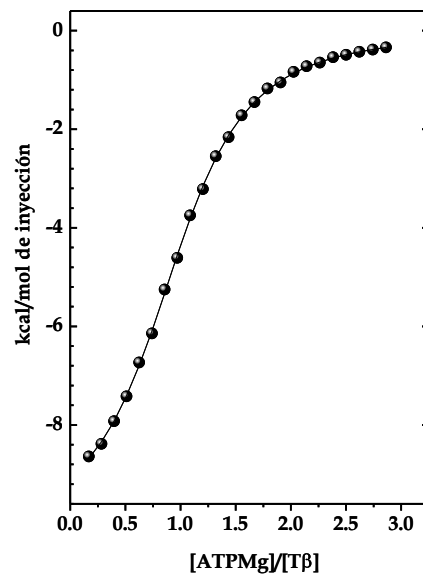
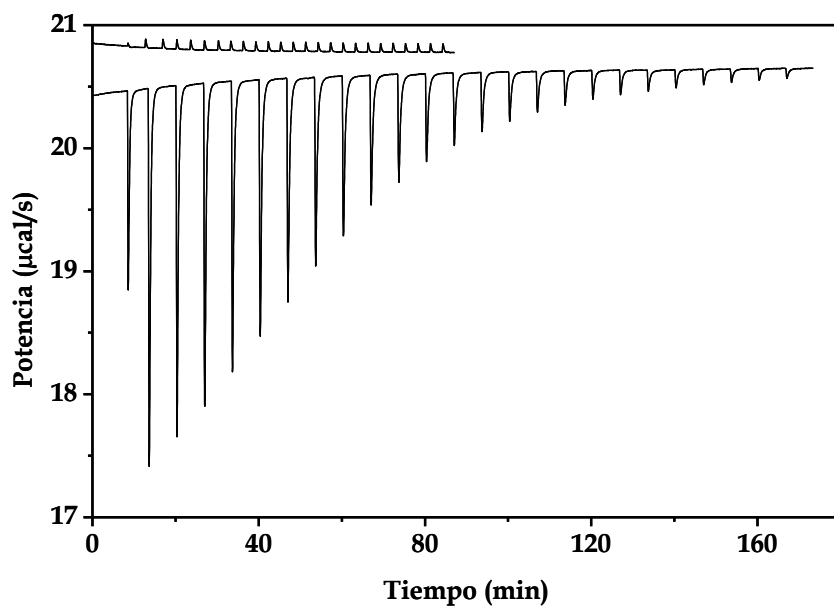
**Figura 11.** a) Potenciograma diferencial mostrando los datos crudos de la unión T $\beta$ -ATP, experimento realizado a 20°C. T $\beta$  (0.06 mM) y el ATP (2.3 mM) fueron disueltos en Tris-HCl 50 mM a pH 8. b) Isotherma de titulación, el mejor ajuste a los datos experimentales se observó al utilizar un modelo un solo tipo de sitio.



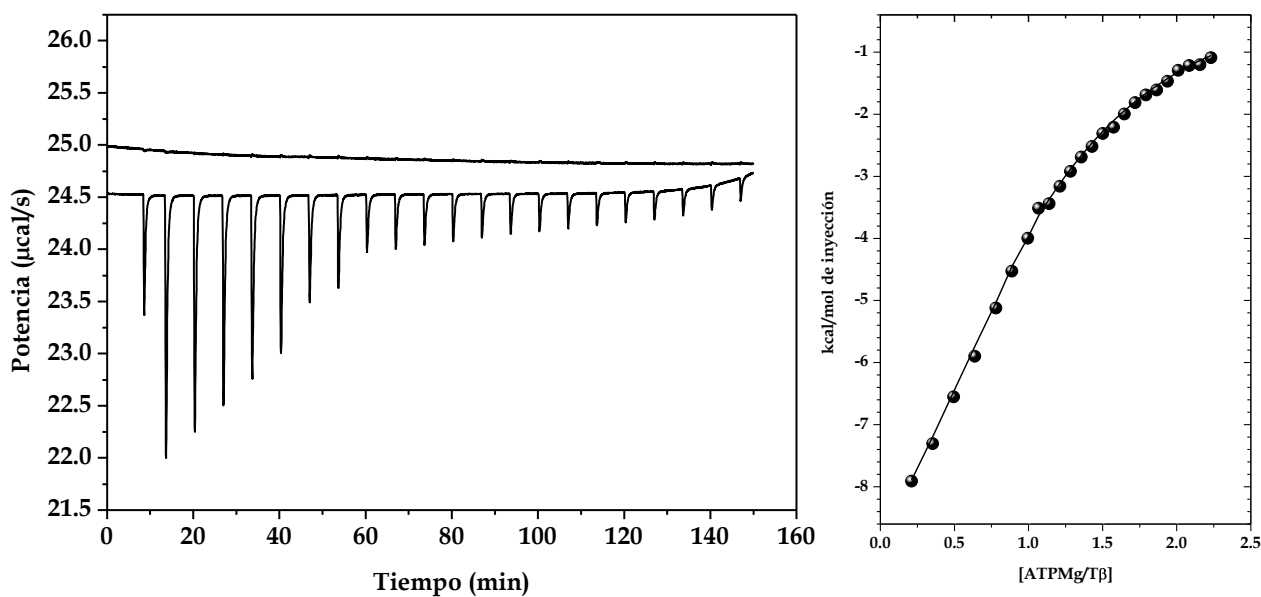
**Figura 12.** a) Potenciograma diferencial mostrando los datos crudos de la unión T $\beta$ -ATP, experimento realizado a 30°C. T $\beta$  (0.052 mM) y el ATP (2.0 mM) fueron disueltos en Tris-HCl 50 mM a pH 8. b) Isotherma de titulación, el mejor ajuste a los datos experimentales se observó al utilizar un modelo un solo tipo de sitio.



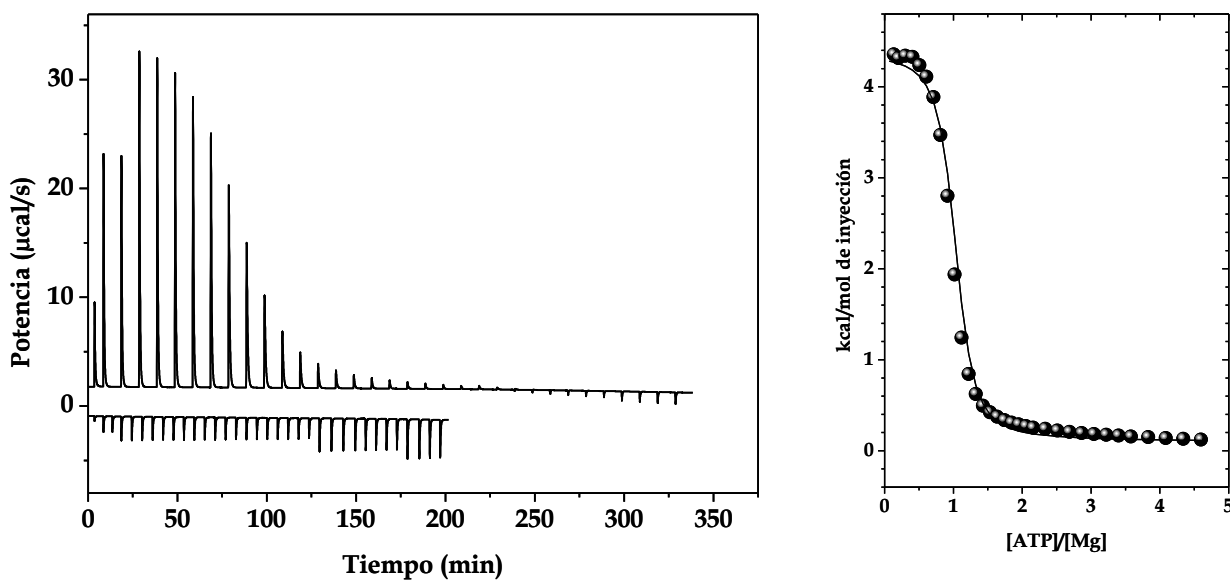
**Figura 13.** a) Potenciograma diferencial mostrando los datos crudos de la unión  $T\beta$ - $Mg \cdot ATP$ , experimento realizado a  $15^{\circ}C$ .  $T\beta$  (0.06 mM) y el  $Mg \cdot ATP$  (2.5 mM) fueron disueltos en Tris-HCl 50 mM a pH 8. b) Isotherma de titulación, el mejor ajuste a los datos experimentales se observó al utilizar un modelo un solo tipo de sitio.



**Figura 14 .**a) Potenciograma diferencial mostrando los datos crudos de la unión  $T\beta$ - $Mg \cdot ATP$ , experimento realizado a  $20^{\circ}C$ .  $T\beta$  (0.07 mM) y el  $Mg \cdot ATP$  (2.8 mM) fueron disueltos en Tris-HCl 50 mM a pH 8. b) Isotherma de titulación, el mejor ajuste a los datos experimentales se observó al utilizar un modelo de un solo tipo de sitio.

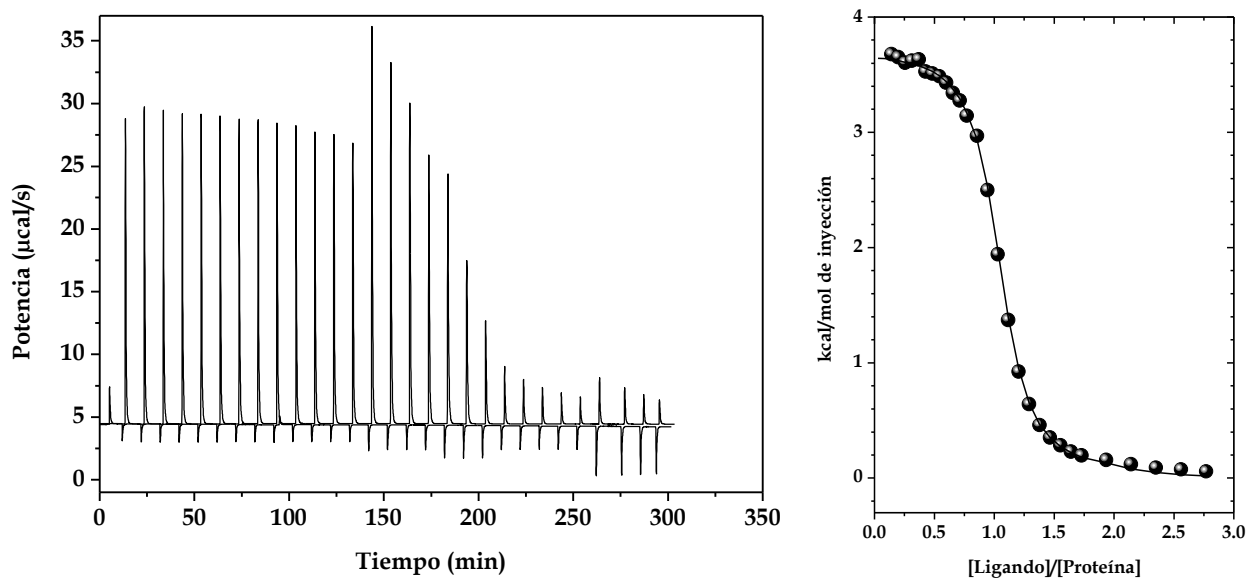


**Figura 15.** a) Potenciograma diferencial mostrando los datos crudos de la unión  $T\beta$ - $Mg \cdot ATP$ , experimento realizado a  $30^\circ C$ .  $T\beta$  (0.05 mM) y el  $Mg \cdot ATP$  (2.5 mM) fueron disueltos en Tris-HCl 50 mM a pH 8. b) Isotherma de titulación, el mejor ajuste a los datos experimentales se observó al utilizar un modelo un solo tipo de sitio.

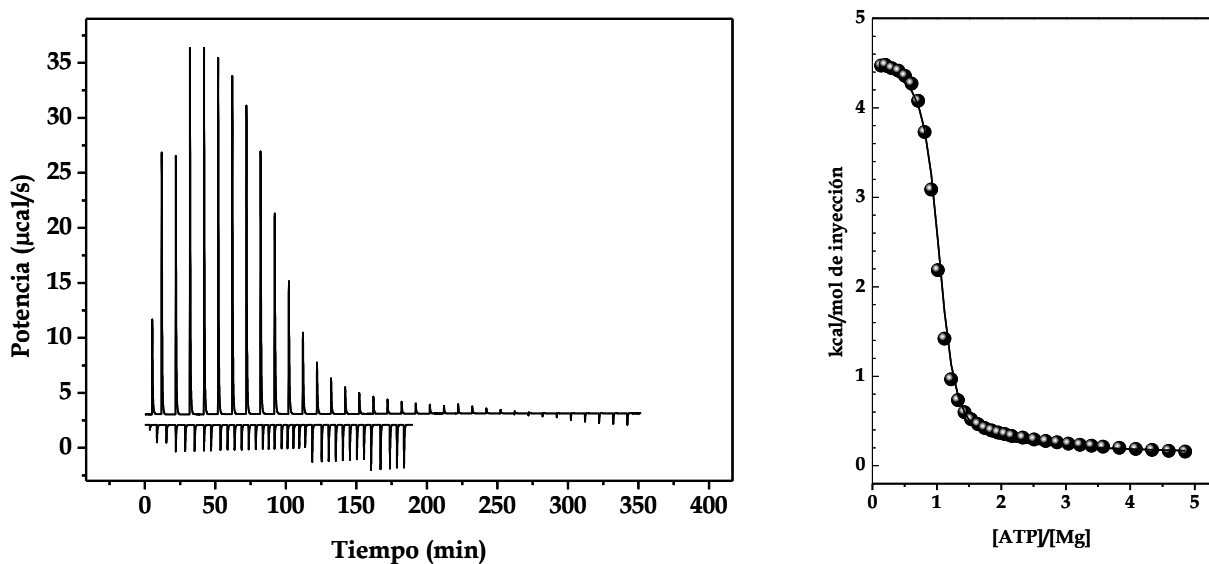


**Figura 16.** a) Potenciograma diferencial mostrando los datos crudos de la unión  $ATP-Mg$ , experimento realizado a  $30^\circ C$ . El  $ATP$  (1.68 mM) y el  $MgCl_2$  (80 mM) fueron disueltos en Tris-HCl 50 mM a pH 8. b) Isotherma de titulación, el mejor ajuste a los datos experimentales se observó al utilizar un modelo de sitios secuenciales.





**Figura 17.** a) Potenciograma diferencial mostrando los datos crudos de la unión ATP-Mg, experimento realizado a 35°C. El ATP (2.3 mM) y el MgCl<sub>2</sub> (80 mM) fueron disueltos en Tris-HCl 50 mM a pH 8. b) Isotherma de titulación, el mejor ajuste a los datos experimentales se observó al utilizar un modelo de sitios secuenciales.



**Figura 18.** a) Potenciograma diferencial mostrando los datos crudos de la unión ATP-Mg, experimento realizado a 40°C. El ATP (2.3 mM) y el MgCl<sub>2</sub> (80 mM) fueron disueltos en Tris-HCl 50 mM a pH 8. b) Isotherma de titulación, el mejor ajuste a los datos experimentales se observó al utilizar un modelo de sitios secuenciales.

## Energetic Effects of Magnesium in the Recognition of Adenosine Nucleotides by the $F_1$ -ATPase $\beta$ Subunit<sup>†</sup>

Nancy O. Pulido,<sup>‡</sup> Guillermo Salcedo,<sup>‡</sup> Gerardo Pérez-Hernández,<sup>‡</sup> Concepción José-Núñez,<sup>‡</sup>  
Adrián Velázquez-Campoy,<sup>§</sup> and Enrique García-Hernández<sup>¶\*</sup>

<sup>†</sup>Instituto de Química, and <sup>‡</sup>Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04510, D.F., México, <sup>§</sup>Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Pedro Antonio de los Santos 84, San Miguel Chapultepec, Miguel Hidalgo, México 11850, México, and <sup>¶</sup>Institute of Biocomputation and Physics of Complex Systems (BIPT), Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain, and Fundación ARAID, Diputación General de Aragón, Zaragoza, Spain

Received April 30, 2010

**ABSTRACT:** Nucleotide-induced conformational changes of the catalytic  $\beta$  subunits play a crucial role in the rotary mechanism of  $F_1$ -ATPase. To gain insights into the energetic bases that govern the recognition of nucleotides by the isolated  $\beta$  subunit from thermophilic *Bacillus* PS3 (T $\beta$ ), the binding of this monomer to Mg(II)-free and Mg(II)-bound adenosine nucleotides was characterized using high-precision isothermal titration calorimetry. The interactions of Mg(II) with free ATP or ADP were also measured calorimetrically. A model that considers simultaneously the interactions of T $\beta$  with Mg·ATP or with ATP and in which ATP is able to bind two Mg(II) atoms sequentially was used to determine the formation parameters of the 1 $\beta$ -Mg·ATP complex from calorimetric data. This analysis yielded significantly different  $\Delta H_b$  and  $\Delta S_b$  values in relation to those obtained using a single-binding site model, while  $\Delta G_b$  was almost unchanged. Published calorimetric data for the titration of T $\beta$  with Mg·ADP [Pérez-Hernández, G., et al. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.* 408, 177–183] were reanalyzed with the ternary model to determine the corresponding true binding parameters. Interactions of 1 $\beta$  with Mg·ATP, ATP, Mg·ADP, or ADP were enthalpically driven. Larger differences in thermodynamic properties were observed between 1 $\beta$ -Mg·ATP and T $\beta$ -ATP complexes than between T $\beta$ -Mg·ADP and T $\beta$ -ADP complexes or between T $\beta$ -Mg·ATP and T $\beta$ -Mg·ADP complexes. These binding data, in conjunction with those for the association of Mg(II) with free nucleotides, allowed for a determination of the energetic effects of the metal ion on the recognition of adenosine nucleotides by T $\beta$  [i.e., T $\beta$ ·AT(D)P + Mg(II)  $\rightleftharpoons$  T $\beta$ ·AT(D)P·Mg]. Because of a more favorable binding enthalpy, Mg(II) is recognized more avidly by the T $\beta$ -ATP complex, indicating better stereochemical complementarity than in the T $\beta$ -ADP complex. Furthermore, a structural–energetic analysis suggests that T $\beta$  adopts a more closed conformation when it is bound to Mg·ATP than to ATP or Mg·ADP, in agreement with recently published NMR data [Yagi, H., et al. (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 2374–2382]. Using published binding data, a similar analysis of Mg(II) energetic effects was performed for the free energy change of  $F_1$  catalytic sites, in the framework of bi- or tri-site binding models.

$F_1F_0$ -ATP synthase occupies a prominent place in the repertory of proteins that specialize in the interconversion of mechanical and chemical energies. Through a sophisticated mechanism involving internal rotary movements, this multimeric enzyme couples the electrochemical potential of protons across membranes to the endergonic synthesis of ATP from ADP and  $P_i$ .<sup>1</sup> The water-soluble  $F_1$  sector ( $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ ) carries the enzymatic machinery. In this subcomplex, three  $\alpha$  subunits and three  $\beta$  subunits are arranged alternately, forming a hexagonal ring that encloses part of the elongated  $\gamma$  subunit structure (*J*). The three catalytic sites of the enzyme are positioned at  $\alpha$ – $\beta$  subunit interfaces, with a large preponderance of  $\beta$  subunit residues. The  $\alpha_3\beta_3\gamma$  oligomer is the minimal construction that preserves

normal rotational and hydrolytic activities (2–4), while the  $\alpha_3\beta_3$  oligomer retains some ATPase activity (5). Dissociation of the  $\alpha_3\beta_3$  oligomer yields native-like structured monomeric subunits

<sup>†</sup>Abbreviations: Mg(II), free magnesium ion; AMPPNP, adenylyl 5'-imidodiphosphate;  $P_i$ , inorganic phosphate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; Tris, 2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol; MgCl<sub>2</sub>, magnesium chloride; NaOH, sodium hydroxide; ATPase, adenosine 5'-triphosphatase; T $\beta$ , isolated  $\beta$  subunit from thermophile *Bacillus* PS3; TF<sub>1</sub>,  $F_1$  sector from *Bacillus* PS3; EF<sub>1</sub>,  $F_1$  sector from *Escherichia coli*; S1–S3, high-, medium-, and low-affinity  $\beta$  subunit sites in  $F_1$ , respectively;  $\beta_{1st}$  and  $\beta_{2nd}$ ,  $\beta$  subunits in the crystal structure of  $F_1$  bound to Mg·ADP and Mg·AMPPNP, respectively; ITC, isothermal titration calorimetry; NMR, nuclear magnetic resonance;  $K_b$ , equilibrium binding constant;  $\Delta H_b$ , binding enthalpy;  $\Delta G_b$ , Gibbs binding free energy;  $\Delta S_b$ , binding entropy;  $\Delta C_{p,b}$ , binding heat capacity;  $K_{11}$  and  $K_{12}$ , stepwise association constants for the interaction of ATP with Mg(II);  $K_{11}$  and  $K_{22}$ , association constants for ATP and Mg·ATP, respectively, binding to T $\beta$ ;  $\Delta H_{11b}$ , intrinsic binding enthalpy,  $\Delta H_{12b}$ , desolvation enthalpy;  $\Delta S_{11b}$ ,  $\Delta S_{21b}$ , and  $\Delta S_{12b}$ , conformational, solvation, and roto-translational entropy changes, respectively;  $\Delta A$ , surface area change;  $\Delta C_{p,s}$ , specific heat capacity for the surface area of the type *i* or *j*;  $K_{11j}$ , cooperative heterotropic association constant;  $\Delta H_i$ , cooperative enthalpy;  $\Delta S_i$ , cooperative entropy.

<sup>†</sup>This work was supported in part by DGAPA, UNAM (PAPIIT, IN204505), and CONACyT (Grant 47097). N.O.P. and G.S. received fellowships from CONACyT and DGAPA.

\*To whom correspondence should be addressed: Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04510, D.F., México. Telephone: +52 55 56 22 44 24. Fax: +52 55 56 16 22 03. E-mail: egarcia@unam.mx.

which, although catalytically inactive, bind nucleotides with considerable affinity (6–12).

According to the binding change mechanism (2), the three catalytic sites act in a concerted manner, alternating sequentially through three different conformations (tight, loose, and open) with vastly different substrate affinities [high (S1), medium (S2), and low (S3) affinity]. These sites exhibit strong positive and negative cooperativity in catalysis and binding, respectively (13). High-resolution crystal structures of  $F_1$  have yielded invaluable information for unveiling key molecular elements of the binding change mechanism (1, 14–22). The structure of bovine mitochondrial  $F_1$  bound to Mg-nucleotides (the Mg-ADP-inhibited  $F_1$  state) obtained by Abrahams et al. (1) revealed the three  $\beta$  subunits in different conformations. One  $\beta$  subunit ( $\beta_H$ ) shows an open conformation and has an empty catalytic site. The other two  $\beta$  subunits are in the closed conformation, one binding Mg-ADP ( $\beta_{DA}$ ) and the other binding Mg-AMPPNP ( $\beta_{TP}$ ). Noninhibited structures of bovine and yeast mitochondrial  $F_1$  have also been determined (20, 21). In these structures, the  $\beta_{DA}$  catalytic site is occupied by Mg-AMPPNP.

In spite of the impressive advances in establishing the molecular bases of the function of  $F_1F_0$ -ATP synthase and its different subcomplexes, many key aspects remain to be unveiled. In particular, knowledge of the energetic principles that drive substrate recognition and intersubunit communication is still rudimentary. The energetic contribution of Mg(II) in this enzyme is also poorly understood (2). Besides its role as a cofactor required for stabilization of the transition state (23), Mg(II) has been implicated as being crucial in determining the binding asymmetry and cooperativity between catalytic sites (24, 25). However, recent studies have challenged that conclusion, indicating that heterogeneity in  $\beta$  subunit affinities is an inherent property of nucleotide-free  $F_1$  (22, 26, 27). As far as we know, no systematic characterization of the energetic contribution of Mg(II) in the recognition of nucleotides by  $F_1$  or by the isolated subunits has been conducted.

Nucleotide-induced conformational changes in  $\beta$  subunits are considered to be the essential driving force for rotational catalysis in  $F_1$  (1, 3, 4, 11, 12, 28, 29). Saliently, the isolated  $\beta$  subunit undergoes conformational changes that resemble those between open and closed  $\beta$  subunit conformations in  $F_1$  crystal structures (6, 7, 10–12, 30). Therefore, the isolated  $\beta$  subunit provides an excellent opportunity to study issues that are difficult to address in larger  $F_1F_0$ -ATP synthase subcomponents. In this work, we have aimed to gain new insights into the energetic bases of the recognition of adenosine nucleotides by the monomeric  $\beta$  subunit from thermophilic *Bacillus* PS3 ( $T\beta$ ). For this purpose, the binding of  $T\beta$  to ATP and Mg-ATP was characterized as a function of temperature using high-precision isothermal titration calorimetry. The association of Mg(II) with free ATP was also characterized calorimetrically. The binding data of these complexes allowed the determination of the energetic contribution of Mg(II) in the recognition of ATP by  $T\beta$ . A similar analysis was performed for ADP as the ligand, and the properties of the two nucleotide complexes were compared. Finally, the energetic effects of Mg(II) in  $F_1$  catalytic sites were explored using affinity constants available in the literature.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials.** All chemicals, including ATP and ADP sodium salts, were from Sigma Chemical Co.

**Expression and Purification of the  $T\beta$  Subunit.** Monomeric  $T\beta$  was expressed in *Escherichia coli* strain DK 8(8), which lacks the genes for  $F_1F_0$ , and purified to homogeneity as previously described (30).

All experiments were performed at pH 8.0 in a 0.05 M Tris-HCl buffer solution supplemented with 0.1 M NaCl to prevent protein aggregation. Purified  $T\beta$  was thoroughly dialyzed against the buffer solution prior to calorimetric measurements. After degassing, the protein concentration was determined spectrophotometrically, using an extinction coefficient of  $15360 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 280 nm. For ADP and ATP, an extinction coefficient of  $15600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 259 nm was used.  $\text{MgCl}_2$  and nucleotides (sodium salts) were dissolved into the buffer solution obtained from the last dialysis. The solution's pH was readjusted to 8.0 using NaOH when necessary.

**Isothermal Titration Calorimetry.** ITC determinations were performed using the high-precision VP-ITC microcalorimeter (MicroCal, Inc.). Binding of  $T\beta$  to Mg-ATP or ATP was assessed in the temperature range of 15–30 °C. The  $T\beta$  concentration was typically 0.05–0.07 mM, while the ligand concentration in the syringe was 2.0–2.5 mM. In the titration of  $T\beta$  with the Mg(II)-free nucleotide, ligand and protein solutions were supplemented with 2 mM EDTA to sequester any residual trace of Mg(II) in the solution. The titration schedule consisted of 20–30 consecutive injections of 3–8  $\mu\text{L}$  with a 6 min interval between injections. The dilution heat of the ligand was obtained via addition of the ligand to a buffer solution under identical conditions and the injection schedule used with the protein sample. In the case of the titration of  $T\beta$  with Mg(II)-free nucleotide, the binding constant ( $K_b$ ), the enthalpy change ( $\Delta H_b$ ), and the stoichiometry ( $n$ ) were determined by nonlinear fitting of normalized titration data using an identical and independent binding site model (31):

$$Q = \frac{nM_T\Delta H_b V_0}{2} \left[ 1 + \frac{X_T}{nM_T} + \frac{1}{nK_b M_T} \right] - \sqrt{\left( 1 + \frac{X_T}{nM_T} + \frac{1}{nK_b M_T} \right)^2 - \frac{4X_T}{nM_T}}$$

where  $Q$  is the normalized differential heat evolved per mole of ligand, after correction for the heats of dilution of the ligand,  $V_0$  is the working volume of the cell, and  $X_T$  and  $M_T$  are the ligand and macromolecule concentrations, respectively. For the titration of  $T\beta$  with Mg(II)-bound ATP, both the ligand and protein solutions contained 5 mM  $\text{MgCl}_2$ . The resulting binding isotherms were analyzed using a ternary model in which  $T\beta$  may bind ATP or Mg-ATP, while ATP may also be in the form of  $\text{Mg}_2\text{-ATP}$  (see Appendix). In the fitting of this model, formation parameter values for  $T\beta$ -ATP, Mg-ATP, and  $\text{Mg}_2\text{-ATP}$  (determined in independent experiments) were kept fixed, while those for the  $T\beta$ -Mg-ATP complex were the fitting parameters.

Titration of ATP with  $\text{MgCl}_2$  was performed in the temperature range of 15–30 °C. The reaction cell contained 1.5 mM ATP, and the syringe contained 80 mM  $\text{MgCl}_2$ . Each titration consisted of a series of 35 consecutive injections of 2–15  $\mu\text{L}$  with a 10 min interval between injections. The binding isotherms were analyzed using a model in which two Mg(II) ions bind sequentially to ATP (32):

$$Q = ([\text{ATP}]_T V_0) \{ [K_{b1} [\text{Mg}^2+] \Delta H_{b1} + K_{b1} K_{b2} [\text{Mg}^2+]^2 (\Delta H_{b1} + \Delta H_{b2})] / (1 + K_{b1} [\text{Mg}^2+] + K_{b1} K_{b2} [\text{Mg}^2+]^2) \}$$

where  $Q$  is the cumulative heat effect, subscripts 1 and 2 stand for the binding of the first and second Mg(II), respectively,  $[\text{ATP}]_T$  is the total ATP concentration, and  $[\text{Mg}]$  is the free Mg(II) concentration.

**Changes in Solvent-Accessible Surface Area.** Surface area calculations were conducted with NACCESS [Hubbard, S. J., and Thornton, J. M. (1993) *NACCESS*, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College, London], using a probe radius of 1.4 Å and a slice width of 0.1 Å. Changes in solvent-accessible surface areas ( $\Delta A$ ) were estimated from the difference between the complex and the sum of the free molecules.

**$\Delta A$ -Based Calculations of  $\Delta C_{p,0}$ .** To estimate  $\Delta C_{p,0}$  from structural data, we used the semiempirical relationship

$$\Delta C_{p,0} = \sum \Delta c_{p,i} \Delta A_i$$

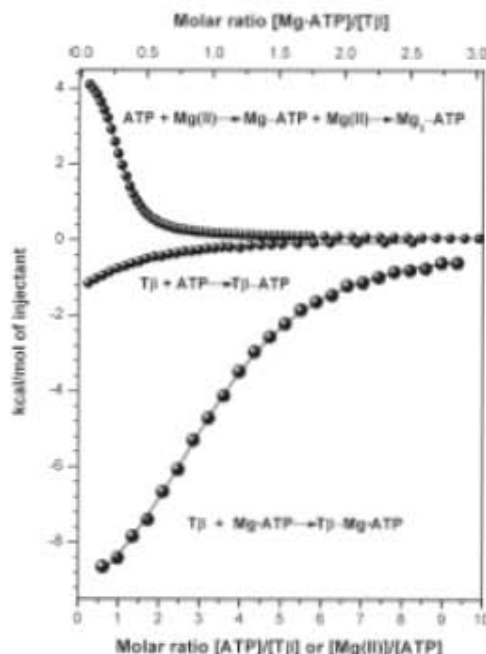
where  $\Delta c_{p,i}$  is the specific heat capacity contribution per unit of surface area of type  $i$ . Parameters for protein's apolar (carbon and sulfur atoms) and polar (oxygen and nitrogen atoms) surfaces, obtained from data of cyclic dipeptides for the transfer from the solid state to water, were taken from ref 33. These parameters were also used for the adenine surfaces. A recently published sugar-specific parametrization was used for the ribose moiety in the nucleotide (34). For Mg(II) and phosphate surfaces, we derived corresponding specific parameters. Heat capacity changes accompanying the transfer of magnesium and inorganic phosphate from the gas phase to an aqueous solution were taken from ref 35. These magnitudes ( $-41$  and  $-81$  cal mol $^{-1}$  K $^{-1}$  for magnesium and inorganic phosphate, respectively) were then corrected for expansion effects by adding to them  $R$ , the universal constant of ideal gases (36), and normalized by the corresponding total surface area (113 and 188 Å $^2$  for magnesium and inorganic phosphate, respectively).

## RESULTS

**Thermodynamics of Mg(II) Binding to Free ATP.** At pH 8, ATP is completely unprotonated (ATP $^{4-}$ ). Therefore, it is able to bind two Mg(II) ions in a stepwise manner:



Consistent with this, binding isotherms obtained for the titration of ATP with MgCl $_2$  were best described with a sequential binding site model (Figure 1). Results from calorimetric measurements performed at different temperatures are summarized in Table 1. ATP binds the first Mg(II) with an  $\sim 400$ -fold avidity in relation to the second one. Both binding events are entropically driven, with the enthalpic component being more unfavorable for the formation of the mono-Mg(II) species. Assuming  $\Delta C_{p,0}$  is temperature-independent, a linear regression analysis of  $\Delta H_b$  data versus temperature in Table 1 gives values of  $37 \pm 10$  and  $20 \pm 10$  cal mol $^{-1}$  K $^{-1}$  for Mg $\cdot$ ATP and Mg $_2$  $\cdot$ ATP complexes, respectively (Figure 2). The  $\Delta H_{b,1}$  and  $K_{b,1}$  values obtained here are similar to those recommended by Smith et al. (37) ( $T = 25$  °C,  $\Delta H_b = 4.49$  kcal mol $^{-1}$ , and  $K_b = 35500$  M $^{-1}$ ), who compiled and critically examined a large set of published binding data for the Mg $\cdot$ ATP complex. As far as we know, only one ITC study of the interaction of Mg(II) with ATP has been reported (38). Data in that study (28 °C) were analyzed using a single-site model, yielding a similar enthalpy change ( $\Delta H_b = 4.2$  kcal/mol), but a somewhat smaller binding constant ( $K_b = 9600$  M $^{-1}$ ) compared to those listed in Table 1. In contrast to the large number of  $\Delta H_b$



**Figure 1:** Calorimetric isotherms for the formation of T $\beta$ -ATP, T $\beta$ -Mg $\cdot$ ATP, Mg $\cdot$ ATP, and Mg $_2$  $\cdot$ ATP complexes at 25 °C, in a 0.05 M Tris-HCl buffer solution supplemented with 0.1 M NaCl (pH 8.0). Solid lines correspond to the best fitting curves. In the titration of ATP with Mg(II), the experimental data were best fitted by a sequential binding two-site model. For the T $\beta$ -ATP complex, an identical and independent binding site model was used. In the case of the T $\beta$ -Mg $\cdot$ ATP complex, a coupled equilibrium model was used which considers the binding of T $\beta$  to ATP or Mg $\cdot$ ATP and the binding of ATP to one or two magnesium ions.

and  $K_b$  values available in the literature,  $\Delta C_{p,0}$  values are still scarce. Alberty (39) reported a value of 30 cal mol $^{-1}$  K $^{-1}$  for the Mg $\cdot$ ATP complex, which is similar to that obtained in this study. In contrast, Wang et al. (40), using isothermal flow calorimetric data in the temperature range of 50–125 °C, obtained significantly larger values for the two Mg(II)-bound ATP complexes (121 and 50 cal mol $^{-1}$  K $^{-1}$  for Mg $\cdot$ ATP and Mg $_2$  $\cdot$ ATP complexes, respectively).

**Thermodynamics of ATP and Mg $\cdot$ ATP Binding to Isolated T $\beta$ .** Figure 1 shows examples of binding isotherms obtained for T $\beta$ -ATP and T $\beta$ -Mg $\cdot$ ATP complexes.<sup>2</sup> The binding isotherms for the T $\beta$ -ATP complex were well fitted using a single-site binding model. For the titration of T $\beta$  with Mg(II)-bound ATP, the calorimetric data were fitted using a model in which ATP and Mg $\cdot$ ATP compete for T $\beta$ 's binding site, and the equilibria among the ATP, Mg $\cdot$ ATP, and Mg $_2$  $\cdot$ ATP species are taken into account (see Appendix).

Table 2 summarizes the calorimetric results obtained for T $\beta$ -ATP and T $\beta$ -Mg $\cdot$ ATP complexes at different temperatures. For both binding events, calorimetric data consistently yielded an  $\sim 1:1$  stoichiometry. The two complexes differ significantly from each other in their thermodynamic properties.

<sup>2</sup>The new noncovalent bond formed in the considered binding reaction is indicated by a dash. In the formation of a ternary complex, the noncovalent contact in the preformed binary complex is indicated by a center dot.

Table 1: Thermodynamic Parameters for the Binding of Mg(II) to ATP at Different Temperatures<sup>a</sup>

temp (°C)	Mg-ATP				Mg <sub>2</sub> -ATP			
	$K_{12}$ ( $\times 10^{-4} \text{M}^{-1}$ )	$\Delta G_{12}$ (kcal/mol)	$\Delta H_{12}$ (kcal/mol)	$T\Delta S_{12}$ (kcal/mol)	$K_{12}$ ( $\text{M}^{-1}$ )	$\Delta G_{12}$ (kcal/mol)	$\Delta H_{12}$ (kcal/mol)	$T\Delta S_{12}$ (kcal/mol)
15	2.2 ± 0.2	-5.7	3.9 ± 0.1	9.6	49 ± 21	-2.2	1.5 ± 0.2	3.7
20	3.0 ± 0.0	-6.0	4.2 ± 0.1	10.2	63 ± 7	-2.4	1.5 ± 0.1	3.9
25	3.6 ± 0.1	-6.2	4.4 ± 0.2	10.6	98 ± 15	-2.7	1.7 ± 0.2	4.4
30	4.0 ± 0.1	-6.4	4.6 ± 0.1	11.0	101 ± 17	-2.8	1.8 ± 0.1	4.6

<sup>a</sup>Equilibrium constants correspond to stepwise association constants. Values are means of three independent experiments at each temperature.

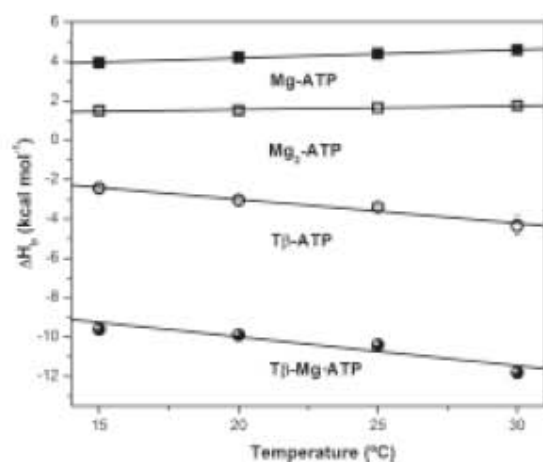


FIGURE 2: Binding enthalpies as a function of temperature for the Tβ-ATP, Tβ-Mg-ATP, Mg-ATP, and Mg<sub>2</sub>-ATP complexes in a 0.05 M Tris-HCl buffer solution supplemented with 0.1 M NaCl (pH 8.0). Dashed lines correspond to the least-squares linear fittings of the Kirchhoff equation ( $\partial \Delta H_b / \partial T = \Delta C_p$ ) to the calorimetric data, assuming  $\Delta C_p$  is independent of temperature.

The 7-fold association constant value obtained for the Tβ-Mg-ATP complex arises from significant, although partially counterbalanced, variations in enthalpy and entropy. At all temperatures sampled, Tβ binding to Mg-ATP was around 2-fold more exothermic than that to ATP. In contrast, the binding entropy was more favorable for the Tβ-ATP complex.

Also using ITC, Odaka et al. (8) measured Tβ-Mg-ATP binding energetics at a single temperature (21 °C). Data obtained in that study ( $\Delta H_b = -12$  kcal/mol,  $T\Delta S_b = -5.5$  kcal/mol, and  $K_b = 66000 \text{M}^{-1}$ ) are somewhat different from those in Table 2. These differences are in part due to the use of different binding models. In fact, if our binding isotherms were analyzed using a simple 1:1 binding model, values closer to those of Odaka et al. would be obtained (for instance, at 20 °C,  $\Delta H_b$  and  $T\Delta S_b$  would be  $-10.7$  and  $-4.1$  kcal/mol, respectively). These contrasting results illustrate the importance of taking into account the coupled equilibria occurring during the titration of Tβ with Mg(II)-bound ATP (i.e., that Tβ is able to bind Mg-ATP or ATP, and that ATP is able to bind one or two magnesium ions) for the determination of the true formation parameters of the Tβ-Mg-ATP complex. Analysis of the thermal dependence of  $\Delta H_b$  yields  $\Delta C_p$  values of  $-150 \pm 20$  and  $-96 \pm 17$  kcal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> for Tβ-Mg-ATP and Tβ-ATP complexes, respectively (Figure 2).

Table 3 shows the cooperativity parameters for the heterotropic interaction between magnesium and nucleotides. These

Table 2: Thermodynamic Parameters for the Binding of Mg-ATP or ATP to Tβ at Different Temperatures

temp (°C)	$K_b$ ( $\times 10^{-3} \text{M}^{-1}$ )	$\Delta G_b$ (kcal/mol)	$\Delta H_b$ (kcal/mol)	$T\Delta S_b$ (kcal/mol)	$\alpha$
Tβ-Mg-ATP					
15	1.8 ± 0.1	-6.9	-9.6 ± 0.2	-2.7	1.02 ± 0.01
20	1.3 ± 0.1	-6.9	-9.9 ± 0.1	-3.0	0.98 ± 0.01
25	1.0 ± 0.1	-6.8	-10.4 ± 0.2	-3.6	0.99 ± 0.01
30	0.73 ± 0.1	-6.7	-11.8 ± 0.2	-5.1	0.95 ± 0.02
Tβ-ATP					
15	0.25 ± 0.01	-5.8	-2.4 ± 0.2	3.4	0.98 ± 0.09
20	0.19 ± 0.00	-5.7	-3.1 ± 0.2	2.7	1.01 ± 0.05
25	0.13 ± 0.01	-5.6	-3.4 ± 0.1	2.2	1.05 ± 0.05
30	0.12 ± 0.01	-5.6	-4.3 ± 0.5	1.3	1.02 ± 0.10

Table 3: Thermodynamic Cooperativity Parameters for the Heterotropic Interaction in the Binding of Mg(II) and Nucleotides to Tβ at 25 °C

complex	$\alpha$	$\Delta g$ (kcal/mol)	$\Delta h$ (kcal/mol)	$T\Delta s$ (kcal/mol)
Tβ-Mg-ATP	7.7	-1.2	-7.0	-5.8
Tβ-Mg-ADP	1.1	-0.1	-3.4	-3.3

parameters, the cooperativity association constant,  $\alpha$ , and the cooperativity enthalpy,  $\Delta h$ , can be calculated from the thermodynamic parameters for the binding of the nucleotide and Mg-bound nucleotide to Tβ, and they reflect the reciprocal effect of each ligand on the binding to Tβ [ $\alpha = K_{p2}/K_{p1} = K_{s1}^*/K_{s1}$ , and  $\Delta h = \Delta H_{p2} - \Delta H_{p1} = \Delta H_{s1}^* - \Delta H_{s1}$  (see Appendix)].

## DISCUSSION

The elucidation of the molecular bases that govern the formation of noncovalent protein adducts requires a quantitative knowledge of the forces that drive the recognition process. In what follows, a structural-energetic analysis is presented for the formation of the Tβ complexes studied here, simultaneously considering the full set of thermodynamic functions.

*Tβ-Mg-ATP and Tβ-Mg-ADP Complexes Differ from Each Other Energetically and Structurally.* Figure 3 compares the thermodynamic signatures for the Tβ-Mg-ATP and Tβ-Mg-ADP complexes. For the last complex, the calorimetric data obtained previously (30) were fitted using the ternary binding model depicted in Appendix. For that purpose, the formation parameters of the Mg-ADP and Tβ-ADP complexes were also measured calorimetrically (see below). As seen in Figure 3, the presence of the γ-phosphate moiety makes the

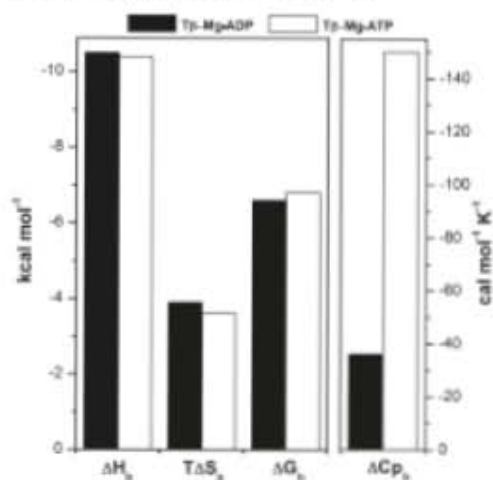


FIGURE 3. Thermodynamic signatures of T $\beta$ -Mg-ATP and T $\beta$ -Mg-ADP complexes at 25 °C as determined by isothermal titration calorimetry. See the legend of Figure 1 for the experimental conditions.

affinity slightly higher for Mg-ATP compared to that of Mg-ADP, with a binding enthalpy similar to that of Mg-ADP ( $\Delta\Delta H_b = -0.1$  kcal/mol), while the binding entropy becomes slightly less unfavorable ( $\Delta(T\Delta S_b) = 0.3$  kcal/mol). In contrast, T $\beta$  catalytic sites exhibit a slightly stronger preference for Mg-ADP over Mg-ATP, indicating the importance of the oligomeric environment for substrate recognition (47). This preference is even more dramatic in the whole F $_0$ F $_1$ -ATP synthase, where the presence of the transmembrane proton gradient decreases the affinity for Mg-ATP by more than 6 orders of magnitude (42).

Figure 3 also compares  $\Delta C_{p,b}$  values for T $\beta$ -Mg-ADP and T $\beta$ -Mg-ATP complexes. The binding of Mg-ATP to T $\beta$  elicits a significantly larger decrease in heat capacity in relation to Mg-ADP. Although exceptions can be found (34), typically the desolvation of polar surfaces increases the heat capacity, due to the liberation of water molecules that undergo a net gain of soft vibration modes upon return to the bulk solvent (43). In the case of phosphate groups, gas-to-water transfer data indicate that their desolvation yields positive heat capacity changes (35), which is consistent with the calorimetric results for the Mg-ATP and Mg-ADP complexes (Figure 2). Thus, the more negative  $\Delta C_{p,b}$  value observed for the T $\beta$ -Mg-ATP complex cannot be explained on the basis of  $\gamma$ -phosphate desolvation, suggesting the occurrence of additional molecular events.

Besides desolvation effects, a number of factors can contribute significantly to the heat capacity of biomolecular complexes, namely, (1) (de)protonation effects, (2) exchange of counterions, (3) sequestration or liberation of structural water molecules, and (4) conformational changes (43–45). For the T $\beta$ -Mg-ADP complex, very similar binding values were obtained using Tris or cacodylate buffers (30). These buffers differ from each other largely in their ionization enthalpies ( $\Delta\Delta H_{ion} = 12$  kcal/mol) and in the electrical charge of their unprotonated bases (neutral for Tris and negative for cacodylate). Therefore, it seems that factors 1 and 2 can be ruled out as major contributors to  $\Delta C_{p,b}$  in the formation of T $\beta$ -nucleotide complexes. On the other hand, scrutiny of the inhibited-state MF $_1$  structure (Protein Data Bank

Table 4. Surface Area Changes and Structure-Based Estimations of  $\Delta C_{p,b}$  for the Formation of T $\beta$ -Mg-ADP and T $\beta$ -Mg-ATP Complexes<sup>a</sup>

surface	$\Delta A$ ( $\text{\AA}^2$ )		$\Delta C_{p,b}$ (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> $\text{\AA}^{-2}$ )
	T $\beta$ -Mg-ADP	T $\beta$ -Mg-ATP	
protein			
polar	-9	-61	-0.27 <sup>b</sup>
apolar	-240	-334	0.43 <sup>b</sup>
nucleotide			
magnesium	-72	-39	-0.30 <sup>c</sup>
phosphate	-143	-203	-0.43 <sup>c</sup>
hydroxyl (ribose)	-34	-39	0.10 <sup>d</sup>
no-ring carbon (ribose)	-19	-15	0.30 <sup>d</sup>
ring carbon (ribose)	-32	-29	0.09 <sup>d</sup>
nitrogen (adenine)	-107	-106	-0.27 <sup>e</sup>
carbon (adenine)	-34	-30	0.43 <sup>e</sup>
$\Delta A$ -based calculation			
$\Delta C_{p,b}^{\text{calc}}$ (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	-40	-67	
$\Delta C_{p,b}^{\text{exp}}$ (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	-36	-130	

<sup>a</sup>The atomic coordinates of the three  $\beta$  subunits were extracted from the X-ray structure of MF $_1$  (Protein Data Bank entry 1bmf) and used to calculate  $\Delta A$  values for the binding of the isolated free  $\beta$  subunit ( $\beta_{\text{free}}$ ) to Mg-ADP ( $\beta_{\text{ADP}}$ ) and Mg-ATP ( $\beta_{\text{ATP}}$ ). <sup>b</sup>From ref. 33. <sup>c</sup>Obtained from hydration heat capacities reported in ref. 35. <sup>d</sup>From ref. 34.

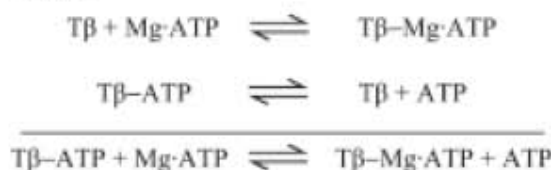
entry 1bmf) indicates that the two catalytic sites in closed conformation share similar residual hydration. Six and five water molecules are seen at the  $\beta_{\text{DP}}$  and  $\beta_{\text{TP}}$  sites, respectively, bridging the contact between the protein and the Mg-bound nucleotide ( $\leq 3.5$   $\text{\AA}$  cutoff). Thus, it seems that residual hydration effects (factor 3) are also not significant in the determination of the difference in  $\Delta C_{p,b}$  between T $\beta$ -Mg-ADP and T $\beta$ -Mg-ATP complexes.

A previous structural-energetic analysis showed that the small  $\Delta C_{p,b}$  ( $-36$  cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) observed for the T $\beta$ -Mg-ADP complex can be explained satisfactorily on the basis of desolvation of the protein binding site and ligand surfaces (30). In that analysis, the coordinates of the empty and the Mg-ADP-filled  $\beta$  subunits, extracted from the X-ray structure of inhibited MF $_1$  (1), were used for calculation of the changes in solvent accessibility of surface areas ( $\Delta A$ ) accompanying the formation of the complex. The large structural rearrangement involved in the transition from  $\beta_{\text{E}}$  to  $\beta_{\text{DP}}$  elicits extensive exposition and burying of surface areas at opposite zones of the protein. This strong compensatory effect yields a marginal net protein  $\Delta A$ , explaining why a small  $\Delta C_{p,b}$  value is observed experimentally. Following the same approach, area changes were calculated for the binding of Mg-ATP to the isolated  $\beta$  subunit, using the isolated structures of MF $_1$ 's  $\beta_{\text{E}}$  and  $\beta_{\text{TP}}$ . Table 4 lists  $\Delta A$  values for this complex and compares them with those for the Mg-ADP-bound complex. For this analysis, recently published sugar-specific parameters were used for ribose surfaces in the nucleotides (34). Furthermore, we derived specific heat capacity parameters for Mg(II) and phosphate surfaces, by using hydration data available in the literature (35). As shown in Table 4, the use of this refined set of parameters yields an excellent estimation of  $\Delta C_{p,b}$  for the T $\beta$ -Mg-ADP complex. In contrast, in the case of the T $\beta$ -Mg-ATP complex, the estimated value is approximately half of that measured calorimetrically, suggesting that the MF $_1$ 's  $\beta_{\text{TP}}$  conformation is not as a good model as MF $_1$ 's  $\beta_{\text{DP}}$  for the corresponding nucleotide-bound conformation of isolated T $\beta$ .

Yagi et al. (10) measured the influence of nucleotides on the NMR signals of the 12 T $\beta$  tyrosine residues. The NMR spectra for T $\beta$  bound to ADP, Mg·ADP, and ATP were very similar to each other, while the T $\beta$ -Mg·ATP complex exhibited a dissimilar spectrum. More recently, Yagi et al. (12) performed a more detailed NMR analysis of the nucleotide-induced conformational changes in T $\beta$ . By using segmental isotope labeling, they found that the relative orientation of the C-terminal domain in Mg·ATP-bound and Mg·ADP-bound T $\beta$  complexes differs by 10°. These studies indicate that the monomeric T $\beta$  subunit adopts a closer conformation when bound to Mg·ATP. Thus, the more negative  $\Delta C_{pb}$  value of the T $\beta$ -Mg·ATP complex might be explained on the basis of a greater burial of protein surface area, elicited by a larger conformational change compared to that observed in MF $_1$ 's  $\beta_{TP}$  (1).

**Energetic Effects of Mg(II) in the Recognition of Nucleotides by Isolated T $\beta$ .** According to Hess' law, the difference between T $\beta$ -Mg·ATP and T $\beta$ -ATP complexes corresponds to the transfer of Mg(II) from ATP to the T $\beta$ -ATP preformed complex:

Scheme 1



To determine the "pure" Mg(II) binding contribution



the association between the metal ion and free ATP needs to be taken into account:

Scheme 2

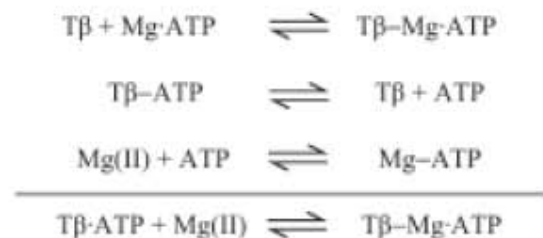


Table 5A shows calculations according to Scheme 2 using the thermodynamic data in Tables 1 and 2. Mg(II) binding is favored by  $\sim 7$  kcal/mol of Gibbs free energy, versus the  $\sim 1$  kcal/mol obtained from the difference between T $\beta$ -Mg·ATP and T $\beta$ -ATP complexes. Mg(II) sequestration by the T $\beta$ -ATP complex is both enthalpically and entropically driven. In contrast, the straight difference between T $\beta$ -Mg·ATP and T $\beta$ -ATP complexes would lead to a different picture, i.e., that Mg(II) binding is enthalpically driven and entropically disfavored. The same results as those calculated considering Scheme 2 are obtained if the parameters for Mg(II) binding to the T $\beta$ -nucleotide complex are calculated using the binding parameters for Mg(II) binding to ATP and the cooperativity parameters [ $K_{b1}^* = \alpha K_{b1}$ , and  $\Delta H_{b1}^* = \Delta H_{b1} + \Delta h$  (see Appendix)]. In fact, this is another way of applying Hess' law.

To explore the molecular features of the incorporation of Mg(II) into the T $\beta$ -ATP adduct, the theoretical  $\Delta C_{pb}$  was calculated for this binding event. In the structure of  $\beta_{TP}$  bound to Mg·AMPPNP extracted from the inhibited MF $_1$  crystal structure, the Mg(II) atom is completely inaccessible to the solvent. Removing Mg(II) from the complex yields virtually no surface area changes ( $< 1 \text{ \AA}^2$ ) in either the nucleotide or the protein. Thus, in the case of a rigid body-like association between Mg(II) and T $\beta$ -ATP, the heat capacity effect would correspond entirely to desolvation of the Mg(II) ion. The complete desolvation of an Mg(II) ion elicits a heat capacity increase of  $39 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , once corrected for expansion effects (36). This value is significantly different from the negative  $\Delta C_{pb}$  value obtained from calorimetric data for the sequestration of Mg(II) by T $\beta$ -ATP (Table 5A). Overall, these results indicate that some conformational rearrangements occur in the T $\beta$ -ATP complex upon Mg(II) binding. This picture is consistent with the conformational variations between T $\beta$ -ATP and T $\beta$ -Mg·ATP complexes evidenced from NMR data (10, 12).

The Mg(II) contribution in the T $\beta$ -Mg·ADP complex was also determined in this work. For that purpose, the formation parameters of the T $\beta$ -ADP and Mg·ADP complexes were measured calorimetrically (Table 5B). Similar to that observed with the Mg·ATP complex, binding of Mg(II) to free ADP is entropically driven and enthalpically disfavored, although with a binding constant that is 1 order of magnitude smaller ( $K_b = 2655 \pm 108 \text{ M}^{-1}$ ). In the case of the T $\beta$ -ADP complex, the interaction is both more stable ( $K_b = 60000 \text{ M}^{-1}$ ) and more exothermic ( $\sim 2$ -fold more

Table 5: Thermodynamic Parameters for the Binding of Mg(II)<sup>a</sup>

	(A) T $\beta$ -ATP			
	$\Delta G_b$ (kcal/mol)	$\Delta H_b$ (kcal/mol)	$T\Delta S_b$ (kcal/mol)	$\Delta C_{pb}$ (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
T $\beta$ + Mg·ATP $\rightleftharpoons$ T $\beta$ -Mg·ATP	-6.8	-10.4	-3.6	-1.50
T $\beta$ -ATP $\rightleftharpoons$ T $\beta$ + ATP	5.6	3.4	-2.2	99
Mg(II) + ATP $\rightleftharpoons$ Mg·ATP	-6.2	4.4	10.6	37
T $\beta$ -ATP + Mg(II) $\rightleftharpoons$ T $\beta$ -ATP-Mg	-7.4	-2.6	4.8	-14
	(B) T $\beta$ -ADP			
	$\Delta G_b$ (kcal/mol)	$\Delta H_b$ (kcal/mol)	$T\Delta S_b$ (kcal/mol)	
T $\beta$ + Mg·ADP $\rightleftharpoons$ T $\beta$ -Mg·ADP	-6.6	-10.5	-3.9	
T $\beta$ -ADP $\rightleftharpoons$ T $\beta$ + ADP	6.5	7.1	0.6	
Mg(II) + ADP $\rightleftharpoons$ Mg·ADP	-4.6	3.7	8.3	
T $\beta$ -ADP + Mg(II) $\rightleftharpoons$ T $\beta$ -ADP-Mg	-4.7	0.3	5.0	

<sup>a</sup>All data obtained at 25 °C.

negative) than that of the  $T\beta$ -ATP complex. With the  $T\beta$ -ADP and  $Mg$ -ADP complex formation parameters determined, the calorimetric data reported previously for the  $T\beta$ - $Mg$ -ADP complex (30) were reanalyzed using the ternary model described in Appendix (Table 2). Since there was no evidence of the formation of the  $Mg_2$ -ADP complex,  $K_{M_2}$  and  $\Delta H_{M_2}$  were set to zero in the fitting analysis.

As shown in Table 5B, there are some differences in the binding energetics of the two nucleotides to  $T\beta$ . The interaction of  $T\beta$  with  $Mg$ -ATP is energetically similar to that of  $Mg$ -ADP. However, the thermodynamic differences between the  $T\beta$ - $Mg$ -ATP and  $T\beta$ -ATP complexes are significantly larger than those between the corresponding ADP complexes, indicating a very different effect of the metal ion in both types of nucleotide- $T\beta$  complexes. According to Scheme 2, the  $T\beta$ -ATP complex binds to  $Mg(II)$  with significantly more avidity. This improved affinity is mainly due to a favorable enthalpic contribution, while the binding entropies of both complexes are approximately the same size. The binding enthalpy is a measure of the strength of the interaction between the molecular partners ( $\Delta H_{int}$ ) relative to the energy penalty paid by desolvation ( $\Delta H_{desolv}$ ) of the contact surfaces:

$$\Delta H_b = \Delta H_{int} + \Delta H_{desolv}$$

Examples can be found in the literature of exothermic ( $\Delta H_{int} < -\Delta H_{desolv}$ ) or exothermic ( $\Delta H_{int} > -\Delta H_{desolv}$ ) recognition of metal ions by proteins (46). Accordingly, it is clear that the  $T\beta$ -ATP adduct provides a better stereochemical environment for  $Mg(II)$  anchoring than the  $T\beta$ -ADP adduct. In fact, mutational studies have shown that the complete octahedral coordination of  $Mg(II)$  in  $F_1$  closed catalytic sites requires the presence of the  $\gamma$ -phosphate of ATP (24). The  $\beta$ -phosphate of ATP and four  $\beta$  subunit residues (three of them linked via structural water molecules) complement the coordination of the metal ion. Furthermore, since no  $\alpha$  subunit residue is involved in the binding to  $Mg(II)$  in  $F_1$ , in principle the full coordination of the metal ion can be achieved in the isolated  $\beta$  subunit.

Another way to look at the effect of  $Mg(II)$  in the recognition of nucleotides by  $T\beta$  is through the cooperative heterotropic association constant ( $\alpha$ ), which is calculated as the ratio between the  $T\beta$ - $Mg$ -ATP and  $T\beta$ -ATP binding constants (see Appendix) (47, 48). According to the data listed in Table 3, the binding of ATP and  $Mg(II)$  to  $T\beta$  is highly cooperative ( $\alpha = 7.7$ ), while  $Mg(II)$  has virtually no effect in the case of ADP ( $\alpha = 1.1$ ). Similarly, the cooperative enthalpy ( $\Delta h$ ) is given by the enthalpy difference between the  $Mg(II)$ -bound and  $Mg(II)$ -free nucleotide- $T\beta$  complexes. For ATP recognition,  $\Delta h$  is  $-7.0$  kcal/mol, whereas for ADP,  $\Delta h$  is  $-3.4$  kcal/mol. The cooperative entropic term for ATP ( $\Delta s$ ) is  $-5.8$  cal mol $^{-1}$  K $^{-1}$ , whereas for ADP it is  $-3.3$  cal mol $^{-1}$  K $^{-1}$ . In the case of ADP, the cooperative enthalpy and entropy cancel out, giving rise to a negligible cooperative Gibbs energy. Besides, both enthalpic and entropic terms for ATP are smaller (approximately 2-fold) than those for ADP. With regard to the binding cooperativity in the  $T\beta$ - $Mg$ -ADP ternary system, from a formal point of view it is interesting to point out that, considering ATP as the reference binding molecule, this system represents an example of coupling between a cooperative homotropic interaction [ATP may bind one or two  $Mg(II)$  ions] and cooperative heterotropic interaction [ATP may bind  $T\beta$ , may bind  $Mg(II)$ , or may bind both  $T\beta$  and

$Mg(II)$  simultaneously, but the binding of a second  $Mg(II)$  excludes the binding of ATP].

It is interesting to note that while the difference in the enthalpy of formation between  $T\beta$ - $Mg$ -ATP and  $T\beta$ - $Mg$ -ADP ( $\Delta\Delta H_b = -0.1$  kcal/mol) complexes is very similar to that between  $Mg$ -ATP and  $Mg$ -ADP complexes ( $\Delta\Delta H_b = -0.3$  kcal/mol), the difference in the entropy of formation between the protein adducts is significantly smaller [ $\Delta(T\Delta S_b)$  of 0.3 kcal/mol vs  $\Delta(T\Delta S_b)$  of 2.3 kcal/mol] (Table 5B). The net change in the number of degrees of freedom upon molecular association is determined by three major contributions, namely

$$\Delta S_b = \Delta S_{conf} + \Delta S_{solv} + \Delta S_{r-c}$$

where  $\Delta S_{conf}$ ,  $\Delta S_{solv}$ , and  $\Delta S_{r-c}$  stand for the conformational, solvation, and roto-translational entropy changes, respectively (33). It is well established that the formation of bimolecular complexes involves a constant loss of  $\Delta S_{r-c}$ , regardless of the size of the interacting molecules (49). On the other hand, the presence of the  $\gamma$ -phosphate of ATP should yield a more favorable  $\Delta S_{solv}$ , since a larger surface area becomes buried upon binding to the protein. Therefore, the smaller entropy difference between  $T\beta$ - $Mg$ -ATP and  $T\beta$ - $Mg$ -ADP complexes in relation to that between  $Mg$ -ATP and  $Mg$ -ADP complexes may be interpreted in terms of a more unfavorable  $\Delta S_{conf}$  for the formation of the  $T\beta$ - $Mg$ -ATP complex, i.e., the freezing of a larger number of protein rotatable bonds.

Overall, the analysis given above indicates that the  $T\beta$ -ATP adduct provides a better site for  $Mg(II)$  anchoring than the  $T\beta$ -ADP adduct. Furthermore, entropy and heat capacity changes are consistent with the catalytic subunit adopting a more closed conformation when it is bound to  $Mg$ -ATP than when it is bound to ATP or  $Mg$ -ADP. These results confirm and complement in energetic terms the conclusions reached recently by Yagi et al. (12), who found that in the presence of  $Mg(II)$ , the  $\gamma$ -phosphate elicits a structural rearrangement at the catalytic site that follows the overall bending motion, a rearrangement that is not seen upon ADP or  $Mg$ -ADP binding.

*Energetic Role of Mg(II) in the Recognition of ATP by Catalytic Sites in  $F_1$ .* In spite of the wealth of available information about the catalytic and binding properties of  $F_1$ , there is still a debate regarding whether the occupancy of two (2, 26, 27, 50) or three catalytic sites (41, 51, 52) is sufficient to achieve rapid ATPase activity. Furthermore, binding and kinetic data of ATP synthase and its different subcomplexes have proven to be difficult to analyze and interpret. For instance, although  $F_1$  catalytic sites exhibit strong negative binding cooperativity (13, 53), experimental data have been just as well-described using sequential or independent site models (26, 41). Needless to say, settlement of these mechanistic aspects is essential for the correct determination of  $F_1$  binding parameters. Studies based on either bi- or tri-site models have been conducted for measurement of the association constants of both  $Mg(II)$ -free and  $Mg(II)$ -bound nucleotides. Thus, just as with the isolated  $T\beta$  subunit, the Gibbs free energy contributions of  $Mg(II)$  in  $F_1$  catalytic sites were determined using both bi- and tri-site binding data. It is worth recalling that, according to the analysis presented above for isolated  $T\beta$ , the determination of the true thermodynamic parameters for the recognition of the  $Mg(II)$ -bound nucleotide requires the simultaneous consideration of the association parameters of the free nucleotide with  $T\beta$



Table 6: Binding Energetics of F<sub>1</sub> Catalytic Sites<sup>a</sup>

(A) Tri-site Data for EF <sub>1</sub> <sup>b</sup>							
$\Delta G_b(S1)$	$\Delta G_b(S2)$	$\Delta G_b(S3)$	$\Delta G_b(S1) = \Delta G_b(S2) = \Delta G_b(S3)$	$\Delta G_b(S1)$	$\Delta G_b(S2)$	$\Delta G_b(S3)$	ref
-10.43	EF <sub>1</sub> $\beta$ + Mg·ATP -7.93	-6.17	EF <sub>1</sub> $\beta$ + ATP -5.79	-10.84	EF <sub>1</sub> $\beta$ ·ATP + Mg(II) -8.36	-6.50	54
-10.02	EF <sub>1</sub> $\beta$ + Mg·ADP -7.78	-6.04	EF <sub>1</sub> $\beta$ + ADP -5.53	-10.29	EF <sub>1</sub> $\beta$ ·ADP + Mg(II) -8.05	-5.80	54
(B) Bi-site Data for EF <sub>1</sub> <sup>b</sup>							
$\Delta G_b(S1)$	$\Delta G_b(S2)$	$\Delta G_b(S1)$	$\Delta G_b(S2)$	$\Delta G_b(S1)$	$\Delta G_b(S2)$		ref
-10.80	EF <sub>1</sub> $\beta$ + Mg·ADP -6.88	-9.95	EF <sub>1</sub> $\beta$ + ADP -5.99	-6.91	EF <sub>1</sub> $\beta$ ·ADP + Mg(II) -6.95		27
(C) Tri-site Data for TF <sub>1</sub> <sup>c</sup>							
$\Delta G_b(S2)$	$\Delta G_b(S3)$	$\Delta G_b(S2)$	$\Delta G_b(S3)$	$\Delta G_b(S2)$	$\Delta G_b(S3)$		ref
-9.00	TF <sub>1</sub> $\beta$ + Mg·ATP -6.26	-6.91	TF <sub>1</sub> $\beta$ + ATP -5.60	-8.28	TF <sub>1</sub> $\beta$ ·ATP + Mg(II) -6.71		35, 55
-9.11	TF <sub>1</sub> $\beta$ + Mg·ADP -6.37	-7.85	TF <sub>1</sub> $\beta$ + ADP -6.19	-5.88	TF <sub>1</sub> $\beta$ ·ADP + Mg(II) -4.80		35, 55

<sup>a</sup> $\Delta G_b$  values are given in kilocalories per mole. <sup>b</sup>Data obtained at 23 °C. <sup>c</sup>Data obtained at 25 °C.

or Mg(II). Nevertheless, in the case of TF<sub>1</sub>, the consideration of all the different coupled equilibria simultaneously yields only minor differences in the  $\Delta H_b$  and  $\Delta S_b$  values (<2 kcal/mol) determined using either a simple binary binding model or a complex ternary model, while the differences in  $\Delta G_b$  were negligible (<0.2 kcal/mol).

Senior and colleagues have thoroughly studied F<sub>1</sub> from *E. coli* (EF<sub>1</sub>) following the quenching of a Trp residue introduced at position 331 in the  $\beta$  subunit (EF<sub>1</sub> $\beta$ Y331W) (24, 25, 42, 51, 54). Binding data were analyzed using a model of three independent sites (S1–S3). Table 6A shows Gibbs free energies for the binding of EF<sub>1</sub> catalytic sites to ADP and ATP, in the presence or absence of Mg(II). In the presence of the metal ion, three different affinities were observed. According to these data, EF<sub>1</sub> exhibits a somewhat stronger avidity for Mg·ATP than for Mg·ADP. For both nucleotides,  $\Delta G_b(S1)$  is ~2.5 kcal/mol more exergonic than  $\Delta G_b(S2)$ , which in turn is ~1.7 kcal/mol more negative than  $\Delta G_b(S3)$ . In contrast, the three sites exhibited identical affinities in the absence of Mg(II). This last result led to the proposal that Mg(II) is essential for imparting asymmetric binding properties in F<sub>1</sub>.

In a recent study, Bulygin and Milgrom (27) noted that sulfate competes with adenosine nucleotides for catalytic sites in EF<sub>1</sub>, similar to that observed previously for inorganic phosphate. This observation is relevant, as a large body of data (including those from Senior's lab) has been obtained with sulfate as a cosolute. Bulygin and Milgrom (27) obtained binding constants of sulfate-free EF<sub>1</sub> $\beta$ Y331W for ADP, Mg·ADP, and ATP considering two independent binding sites, while Mg·ATP was not measured in that study. Therefore, Table 6B lists only bi-site binding data for ADP and Mg·ADP. Measurements performed in the absence of sulfate revealed that EF<sub>1</sub> $\beta$ Y331W catalytic sites also exhibit different affinities for Mg(II)-free nucleotides, an observation that contradicts the view that the metal ion is the determinant for the nucleotide binding asymmetry. For Mg·ADP, the difference between  $\Delta G_b(S1)$  and  $\Delta G_b(S2)$  (~4 kcal/mol) is significantly larger than the difference between the same two sites in the tri-site model (~2.5 kcal/mol). Furthermore, in the bi-site model, the

difference in affinity between S1 and S2 is not sensitive to the presence or absence of Mg(II).

Allison and co-workers reported tri-site binding data for TF<sub>1</sub> also using mutant  $\beta$  subunits,  $\beta$ Y341W (41, 55). Table 6C lists values for only catalytic sites S2 and S3, since under the conditions used by the authors, only the upper limits for  $\Delta G_b(S1)$  were inferred.  $\Delta G_b(S2)$  values for Mg(II)-bound nucleotides are significantly more exergonic for TF<sub>1</sub> than for EF<sub>1</sub>, while  $\Delta G_b(S3)$  values are rather similar. For the binding of Mg(II)-free nucleotides, three different affinities were observed for TF<sub>1</sub>, with  $\Delta G_b(S3)$  being comparable to the single affinity value obtained for the three EF<sub>1</sub> catalytic sites.

Bi- or tri-site binding models lead to very different pictures of the role of Mg(II) in stabilization in F<sub>1</sub> (Table 5). Data inferred from the tri-site model indicate that incorporation of the Mg(II) ion depends strongly on the conformation of the catalytic site, with the strength of the stabilization paralleling the affinity for the Mg(II)-bound nucleotide. This conclusion remains the same, regardless of whether the three catalytic sites are thought to have different or identical affinities for Mg(II)-depleted nucleotides. In the case of EF<sub>1</sub>, the difference between  $\Delta G_b(S1)$  and  $\Delta G_b(S2)$  is larger than that between  $\Delta G_b(S2)$  and  $\Delta G_b(S3)$ . Since  $\beta_{TP}$  and  $\beta_{DP}$  are conformationally very similar to each other, it follows that Mg(II) perceives in some way the asymmetric environment provided by the adjacent  $\alpha$  and  $\gamma$  subunits. In contrast, the bi-site model leads to the conclusion that Mg(II) contributes similarly in both catalytic sites. In other words, Mg(II) does not make any contribution per se to the heterogeneity of the catalytic sites, at least in terms of  $\Delta G_b$ . The idea that intersubunit interactions alone induce nucleotide binding heterogeneity at catalytic sites has recently received important support from the recently determined crystal structure of nucleotide-free mitochondrial F<sub>1</sub>, where the three  $\beta$  subunits present different conformations (22), as in the structure of nucleotide-bound MF<sub>1</sub>.

Like those observed for isolated TF<sub>1</sub>, available affinity constants for F<sub>1</sub> catalytic sites indicate that the stabilization effects of Mg(II) depend significantly on the nucleotide

involved. Furthermore, it has recently been suggested that to liberate products efficiently, the ADP-releasing  $\beta$  subunit in  $F_1$  should adopt a less closed conformation compared to that of the ATP-bound subunit (12). Thus, the nucleotide-dependent conformational and energetic behavior of the monomeric subunit seems to have functional repercussions in  $F_1$ . To further explore the energetic bases that drive nucleotide recognition by  $F_1$  catalytic sites, a calorimetric characterization of the binding of this oligomer to Mg(II)-free and Mg(II)-bound nucleotides is currently being undertaken in our lab.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank M. in S. Virginia Gómez Vidales for her invaluable assistance in the ITC experiments and Drs. Armando Gómez-Puyou and Marietta Tuena de Gómez-Puyou (IFC, UNAM) for their critical reading of the manuscript prior to its submission.

#### APPENDIX

We will consider a ternary system in which the  $T\beta$  subunit may bind ATP or  $Mg \cdot ATP$  and, at the same time, ATP may bind one or two magnesium ions (Scheme 3).

The concentration of the different complexes can be expressed as a function of the concentrations of free species:

$$\begin{aligned} [Mg \cdot ATP] &= K_{b1} [ATP] [Mg(II)] \\ [Mg_2 \cdot ATP] &= K_{b1} K_{b2} [ATP] [Mg(II)]^2 \\ [T\beta \cdot ATP] &= K_{p1} [T\beta] [ATP] \\ [T\beta \cdot Mg \cdot ATP] &= K_{p2} K_{b1} [T\beta] [ATP] [Mg(II)] = \\ &K_{p1} K_{b1} * [T\beta] [ATP] [Mg(II)] \end{aligned}$$

Considering the mass conservation for each component  $[T\beta]$ ,  $[ATP]$ , and  $[Mg(II)]$ :

$$\begin{aligned} [ATP]_T &= [ATP] + [Mg \cdot ATP] + [Mg_2 \cdot ATP] + [T\beta \cdot ATP] \\ &\quad + [T\beta \cdot Mg \cdot ATP] \\ [Mg]_T &= [Mg(II)] + [Mg \cdot ATP] + 2[Mg_2 \cdot ATP] \\ &\quad + [T\beta \cdot Mg \cdot ATP] \\ [T\beta]_T &= [T\beta] + [T\beta \cdot ATP] + [T\beta \cdot Mg \cdot ATP] \end{aligned}$$

Then, introducing the equilibrium constants for each complex, we arrive at the following set of nonlinear equations:

$$\begin{aligned} [ATP]_T &= [ATP] + K_{b1} [ATP] [Mg(II)] + K_{b1} K_{b2} [ATP] [Mg(II)]^2 \\ &\quad + K_{p1} [T\beta] [ATP] + K_{p2} K_{b1} [T\beta] [ATP] [Mg(II)] \\ [Mg]_T &= [Mg(II)] + K_{b1} [ATP] [Mg(II)] + 2K_{b1} K_{b2} [ATP] [Mg(II)]^2 \\ &\quad + K_{p2} K_{b1} [T\beta] [ATP] [Mg(II)] \\ [T\beta]_T &= [T\beta] + K_{p1} [T\beta] [ATP] + K_{p2} K_{b1} [T\beta] [ATP] [Mg(II)] \end{aligned}$$

where  $K_{b1}$  and  $K_{b2}$  are the stepwise association constants for the sequential binding of Mg(II) to ATP,  $K_{p1}$  and  $K_{p2}$  are the

association constants for ATP and  $Mg \cdot ATP$  binding to  $T\beta$ , respectively, and  $K_{b1}^*$  is the association constant for Mg(II) binding to  $T\beta \cdot ATP$ .

The total concentrations of ATP, magnesium, and  $T\beta$  after each calorimetric injection  $i$  are given by

$$\begin{aligned} [ATP]_{T,i} &= [ATP]_0 \left[ 1 - \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right)^i \right] \\ [Mg]_{T,i} &= [Mg]_0 \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right)^i \\ [T\beta]_{T,i} &= [T\beta]_0 \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right)^i \end{aligned}$$

where  $[ATP]_0$  is the concentration of ATP in the syringe,  $[Mg]_0$  is the concentration of magnesium in the syringe and the cell,  $[T\beta]_0$  is the initial concentration of  $T\beta$  in the cell,  $v$  is the injection volume, and  $V_0$  is the cell volume.

The Newton-Raphson method can be used to solve numerically the set of nonlinear equations for each titration point, thus determining the free concentrations of ATP, magnesium, and  $T\beta$  after each calorimetric injection. Using the association constants, the concentration of each complex after each injection can be calculated:

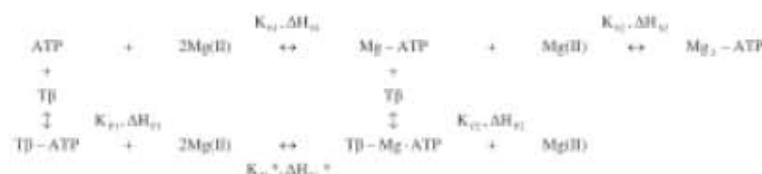
$$\begin{aligned} [T\beta \cdot ATP]_i &= K_{p1} [T\beta]_i [ATP]_i \\ [T\beta \cdot Mg \cdot ATP]_i &= K_{p2} K_{b1} [T\beta]_i [ATP]_i [Mg]_i \\ [Mg \cdot ATP]_i &= K_{b1} [ATP]_i [Mg]_i \\ [Mg_2 \cdot ATP]_i &= K_{b1} K_{b2} [ATP]_i [Mg]_i^2 \end{aligned}$$

The heat effect associated with each injection,  $q_i$ , can be calculated from the change in concentration for each complex after each calorimetric injection, and the enthalpy change associated with formation of each complex:

$$\begin{aligned} q_i &= V_0 \left\{ \left[ [T\beta \cdot ATP]_i - [T\beta \cdot ATP]_{i-1} \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right) \right] \Delta H_{p1} \right. \\ &\quad + \left[ [T\beta \cdot Mg \cdot ATP]_i - [T\beta \cdot Mg \cdot ATP]_{i-1} \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right) \right] (\Delta H_{p2} + \Delta H_{b1}) \\ &\quad + \left[ [Mg \cdot ATP]_i - [Mg \cdot ATP]_{i-1} \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right) - F_{Mg \cdot ATP} [ATP]_0 \frac{v}{V_0} \right] \Delta H_{b1} \\ &\quad + \left[ [Mg_2 \cdot ATP]_i - [Mg_2 \cdot ATP]_{i-1} \left( 1 - \frac{v}{V_0} \right) \right. \\ &\quad \left. - F_{Mg_2 \cdot ATP} [ATP]_0 \frac{v}{V_0} \right] (\Delta H_{b1} + \Delta H_{b2}) \left. \right\} \end{aligned}$$

where  $\Delta H_{p1}$  and  $\Delta H_{p2}$  are the enthalpy changes associated with the binding of ATP and  $Mg \cdot ATP$  to  $T\beta$ , respectively, and  $\Delta H_{b1}$  and  $\Delta H_{b2}$  are the enthalpy changes associated with the binding of the first and second Mg(II) molecules to ATP, respectively. The correction terms including  $F_{Mg \cdot ATP}$  and  $F_{Mg_2 \cdot ATP}$ , the fractions of ATP in the syringe with one and two magnesium atoms bound,

Scheme 3



respectively, reflect the amount of  $Mg \cdot ATP$  and  $Mg_2 \cdot ATP$  complexes introduced into the cell just by injection and not due to equilibrium balance.

Finally, the heat effect is normalized considering the amount of ligand injected:

$$Q = \frac{q}{v[ATP]_0}$$

In the experiments,  $K_{b1}$ ,  $\Delta H_{b1}$ ,  $K_{b2}$ ,  $\Delta H_{b2}$ ,  $K_{p1}$ , and  $\Delta H_{p1}$  were determined directly from direct binary titrations.  $K_{p2}$  and  $\Delta H_{p2}$  were determined from the ternary experiments, once the other parameters had been previously determined.

The cooperativity in the binding of ATP and  $Mg(II)$  to  $T\beta$  is contained in the values of  $K_{p2}$  and  $\Delta H_{p2}$ . If  $K_{p1}$  and  $K_{p2}$  are equal and  $\Delta H_{p1}$  and  $\Delta H_{p2}$  are equal, the binding of  $Mg \cdot ATP$  to  $T\beta$  is the same as that of ATP, and magnesium does not have any effect on the ATP binding. If  $K_{p1}$  and  $K_{p2}$  are not equal and/or  $\Delta H_{p1}$  and  $\Delta H_{p2}$  are not equal, the binding of  $Mg \cdot ATP$  to  $T\beta$  is different from that of ATP, and magnesium has some effect on the ATP binding. In that case, the cooperative heterotropic association constant for ATP and magnesium binding to  $T\beta$  will be given by

$$\alpha = \frac{K_{p2}}{K_{p1}}$$

where an  $\alpha$  of  $>1$  indicates positive cooperativity, an  $\alpha$  of  $<1$  indicates negative cooperativity, and an  $\alpha$  of 1 indicates no cooperativity. Similarly, the cooperative enthalpy change for ATP and magnesium binding to  $T\beta$  will be given by

$$\Delta h = \Delta H_{p2} - \Delta H_{p1}$$

The cooperative entropy change can be calculated as

$$T\Delta s = \Delta h - \Delta g = \Delta h + RT \ln \alpha$$

Finally, we may conclude that the cooperative effect between  $Mg(II)$  and ATP is reciprocal. From energy conservation (Hess' law) applied to the formation of the  $T\beta \cdot Mg(II) \cdot ATP$  ternary complex, we obtain

$$\begin{aligned} K_{b1}K_{p2} &= K_{p1}K_{b1}^* \\ \Delta H_{b1} + \Delta H_{p2} &= \Delta H_{p1} + \Delta H_{b1}^* \end{aligned}$$

then

$$\begin{aligned} \alpha &= \frac{K_{p2}}{K_{p1}} = \frac{K_{b1}^*}{K_{b1}} \\ \Delta h &= \Delta H_{p2} - \Delta H_{p1} = \Delta H_{b1}^* - \Delta H_{b1} \end{aligned}$$

## REFERENCES

1. Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., and Walker, J. E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621–628.
2. Boyer, P. D. (1997) The ATP synthase: A splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717–749.
3. Noji, H., and Yoshida, M. (2001) The rotary machine in the cell, ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **276**, 1665–1668.
4. Adachi, K., Owa, K., Nishizaka, T., Furukie, S., Noji, H., Itoh, H., Yoshida, M., and Kinoshita, K., Jr. (2007) Coupling of rotation and catalysis in F<sub>1</sub>-ATPase revealed by single-molecule imaging and manipulation. *Cell* **130**, 309–321.
5. Miwa, K., and Yoshida, M. (1989) The  $\alpha\beta_3$  complex, the catalytic core of F<sub>1</sub>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 6484–6487.
6. Dunn, S. (1980) ATP causes a large change in the conformation of the isolated  $\beta$  subunit of *Escherichia coli* F<sub>1</sub> ATPase. *J. Biol. Chem.* **255**, 11857–11860.
7. Hirano, M., Takeda, K., Kanazawa, H., and Futai, M. (1984) Detection of ATP-dependent conformational change in the F<sub>1</sub> portion and  $\beta$  subunit of *Escherichia coli* hydrogen-ATPase using 8-anilino-1-naphthalene-1-sulfonate. *Biochemistry* **23**, 1652–1656.
8. Odaka, M., Kaibara, C., Amano, T., Matsui, T., Muneyuki, E., Ogasahara, K., Yutani, K., and Yoshida, M. (1994) Tyr-341 of the  $\beta$  subunit is a major Km-determining residue of TF<sub>1</sub>-ATPase: Parallel effect of its mutations on Km(ATP) of the  $\alpha_3\beta_3$  complex and on Km(ATP) of the  $\alpha_3\beta_3\gamma$  complex. *J. Biochem.* **115**, 789–796.
9. Jault, J., Kaibara, C., Yoshida, M., Garrod, S., and Allison, W. S. (1994) Probing the specificity of nucleotide-binding to the F<sub>1</sub>-ATPase from thermophilic *Bacillus PS3* and its isolated  $\alpha$  and  $\beta$  subunits with 2-N<sub>1</sub>-( $\beta$ -<sup>32</sup>P)-ATP. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**, 282–288.
10. Yagi, H., Tozawa, K., Sekino, N., Iwabuchi, T., Yoshida, M., and Akutsu, H. (1999) Functional conformation changes in the TF<sub>1</sub>-ATPase subunit probed by 121-proline residues. *Biophys. J.* **77**, 2175–2183.
11. Yagi, H., Tsujimoto, T., Yamazaki, T., Yoshida, M., and Akutsu, H. (2004) Conformational change of H<sup>+</sup>-ATPase  $\beta$  monomer revealed on segmental isotope labeling NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 16632–16638.
12. Yagi, H., Kajiwara, N., Iwabuchi, T., Izumi, K., Yoshida, M., and Akutsu, H. (2009) Stepwise propagation of the ATP-induced conformational change of the F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$  subunit revealed by NMR. *J. Biol. Chem.* **284**, 2374–2382.
13. Kayalar, C., Rosing, J., and Boyer, P. D. (1977) An alternating site sequence for oxidative phosphorylation suggested by measurement of substrate binding patterns and exchange reaction inhibitions. *J. Biol. Chem.* **252**, 2486–2491.
14. Bianchet, M. A., Hällén, J., Pedersen, P. L., and Amzel, L. M. (1998) The 2.8-Å structure of rat liver F<sub>1</sub>-ATPase: Configuration of a critical intermediate in ATP synthesis/hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 11065–11070.
15. Gibbons, C., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., and Walker, J. E. (2000) The structure of the central stalk in bovine F<sub>1</sub>-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1055–1061.
16. Rodgers, A. J. W., and Wilce, M. C. J. (2000) Structure of the  $\gamma$ - $\epsilon$  complex of ATP synthase. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1051–1054.
17. Bragg, K., Menz, R. I., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., and Walker, J. E. (2000) Structure of bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase inhibited by Mg<sup>2+</sup>-ADP and aluminium fluoride. *Structure* **8**, 567–573.
18. Menz, R. I., Walker, J. E., and Leslie, A. G. W. (2001) Structure of bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase. *Cell* **106**, 331–341.
19. Chen, C., Saxena, A. K., Simcoke, W. N., Garbocci, D. N., Pedersen, P. L., and Ko, Y. H. (2006) Mitochondrial ATP synthase: Crystal structure of the catalytic F<sub>1</sub> unit in a vanadate-induced transition-like state and implications for mechanism. *J. Biol. Chem.* **281**, 13777–13783.
20. Kabalenkova, V., Pari, N., Walker, J. E., Leslie, A. G. W., and Mueller, D. M. (2006) Novel features of the rotary catalytic mechanism revealed in the structure of yeast F<sub>1</sub> ATPase. *EMBO J.* **25**, 5433–5442.
21. Bowler, M. W., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., and Walker, J. E. (2007) Ground state structure of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria at 1.9 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **282**, 14238–14242.
22. Kabalenkova, V., Shen, H., Symersky, J., Walker, J. E., Leslie, A. G. W., and Mueller, D. M. (2009) Asymmetric structure of the yeast F<sub>1</sub> ATPase in the absence of bound nucleotides. *J. Biol. Chem.* **284**, 10546–10551.
23. Ko, Y. H., Hong, S., and Pedersen, P. L. (1999) Chemical mechanism of ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **274**, 2853–2856.
24. Weber, J., Hammond, S. T., Wilke-Mounds, S., and Senior, A. E. (1998) Mg<sup>2+</sup> coordination in catalytic sites of F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochemistry* **37**, 603–614.
25. Nadanaciva, S., Weber, J., and Senior, A. E. (1999) Binding of the transition state analog MgADP-fluoroaluminate. *J. Biol. Chem.* **274**, 7052–7058.
26. Milgrom, Y. M., and Cross, R. L. (2005) Nucleotide binding sites on beef heart mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 13831–13836.
27. Bulygin, V. V., and Milgrom, Y. M. (2007) Studies of nucleotide binding to the catalytic sites of *Escherichia coli*  $\beta$ Y331W-F<sub>1</sub>-ATPase using fluorescence quenching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 4327–4331.
28. Garcia, J. J. (2000) The F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase: Binding energy, coupling and rotational catalysis. *Recent Res. Dev. Bienerg.* **1**, 41–62.

29. Böckmann, R. A., and Grubmüller, H. (2002) Nanoseconds molecular dynamics simulation of primary mechanical energy transfer steps in F<sub>1</sub>-ATP synthase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **9**, 198–202.
30. Pérez-Hernández, G., García-Hernández, E., Zubillaga, R. A., and Tuena de Gómez-Puyou, M. (2002) Structural emergence of MgADP binding to the isolated  $\beta$  subunit of F<sub>1</sub>-ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3*. *Arch. Biochem. Biophys.* **408**, 177–183.
31. Wiseman, T., Wilkison, S., Brandts, J. F., and Lin, L. N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**, 131–137.
32. Hammann, C., Cooper, A., and Lilley, D. M. J. (2001) Thermodynamics of ion-induced RNA folding in the hammerhead ribozyme: An isothermal titration calorimetric study. *Biochemistry* **40**, 1423–1429.
33. Luque, I., and Freire, E. (1998) Structure-based prediction of binding affinities and molecular design of peptide ligands. *Methods Enzymol.* **295**, 100–135.
34. Chavelas, E. A., and García-Hernández, E. (2009) Heat capacity changes in carbohydrates and protein-carbohydrate complexes. *Biochem. J.* **420**, 239–247.
35. Marcus, Y. (1994) A simple empirical model describing the thermodynamics of hydration of ions of widely varying charges, sizes, and shapes. *Biophys. Chem.* **51**, 111–127.
36. Makhatadze, G. I., and Pavačev, P. L. (1992) Contribution of hydration and non-covalent interactions to the heat capacity effect on protein unfolding. *J. Mol. Biol.* **224**, 715–723.
37. Smith, R. M., Martell, A. E., and Chen, Y. (1991) Critical evaluation of stability constants for nucleotide complexes with protons and metal ions and the accompanying enthalpy changes. *Pure Appl. Chem.* **63**, 1015–1080.
38. Wilson, J. E., and Chin, A. (1991) Chelation of divalent cations by ATP, studied by titration calorimetry. *Anal. Biochem.* **193**, 16–19.
39. Alberty, R. A. (1969) Maxwell relations for thermodynamic quantities of biochemical reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 3899–3903.
40. Wang, P., Oscarson, J. L., Izzit, R. M., Watt, G. D., and Larsen, C. D. (1995) Thermodynamic parameters for the interaction of adenosine 5'-diphosphate, and adenosine 5'-triphosphate with Mg<sup>2+</sup> from 323.15 to 398.15 K. *J. Solution Chem.* **24**, 989–1012.
41. Dou, C., Fortes, G., and Allison, W. S. (1998) The  $\alpha(\beta\gamma\delta\epsilon)\zeta$  subcomplex of the F<sub>1</sub>-ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3* fails to dissociate ADP when MgATP is hydrolyzed at a single catalytic site and attains maximal velocity when three catalytic sites are saturated with MgATP. *Biochemistry* **37**, 16757–16764.
42. Weber, J., and Senior, A. E. (2000) ATP synthase: What we know about ATP hydrolysis and what we do not know about ATP synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 300–309.
43. Prabhu, N. V., and Sharp, K. A. (2005) Heat capacity in proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **56**, 521–548.
44. Ladbury, J. E., and Williams, M. A. (2004) The extended interface: Measuring non-local effects in biomolecular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 562–569.
45. Bello, M., Pérez-Hernández, G., Fernández-Velasco, D. A., Arreguín-Espinosa, R., and García-Hernández, E. (2008) Energetics of protein homodimerization: Effects of water sequestering on the formation of  $\beta$ -lactoglobulin dimer. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **70**, 1475–1487.
46. Wilcox, D. (2008) Isothermal titration calorimetry of metal ion binding to proteins: An overview of recent studies. *Inorg. Chim. Acta* **361**, 857–867.
47. Velázquez-Campoy, A., Godí, G., Peregrina, J. R., and Medina, M. (2006) Exact analysis of heterotropic interactions in proteins: Characterization of cooperative ligand binding by isothermal titration calorimetry. *Biophys. J.* **91**, 1887–1904.
48. Martínez-Julvez, M., Medina, M., and Velázquez-Campoy, A. (2009) Binding thermodynamics of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase: Two different protein substrates and one energetics. *Biophys. J.* **96**, 4966–4975.
49. Amzel, L. M. (1997) Loss of translational entropy in binding, folding, and catalysis. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **28**, 144–149.
50. Dong, K., Ren, H., and Allison, W. S. (2002) The fluorescence spectrum of the introduced tryptophans in the  $\alpha_1(\beta\gamma\delta\epsilon)\zeta$  subcomplex of the F<sub>1</sub>-ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3* cannot be used to distinguish between the number of nucleoside di- and triphosphates bound to catalytic sites. *J. Biol. Chem.* **277**, 9540–9547.
51. Weber, J., and Senior, A. E. (2001) Bi-site catalysis in F<sub>1</sub>-ATPase: Does it exist? *J. Biol. Chem.* **276**, 35422–35428.
52. Yasuda, R., Masaike, T., Adachi, K., Noji, H., Itoh, H., and Kinosita, K., Jr. (2003) The ATP-waiting conformation of rotating F<sub>1</sub>-ATPase revealed by single-pair fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 9314–9318.
53. Zheng, W. (2009) Normal-mode-based modeling of allosteric couplings that underlie cyclic conformational transition in F<sub>1</sub> ATPase. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **76**, 747–762.
54. Weber, J., and Senior, A. E. (2004) Fluorescent probes applied to catalytic cooperativity in ATP synthase. *Methods Enzymol.* **380**, 132–152.
55. Bandyopadhyay, S., Valder, C. R., Huysh, H. G., Ren, H., and Allison, W. S. (2002) The  $\beta\text{G156C}$  substitution in the F<sub>1</sub>-ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3* affects catalytic site cooperativity by destabilizing the closed conformation of the catalytic site. *Biochemistry* **41**, 14421–14429.