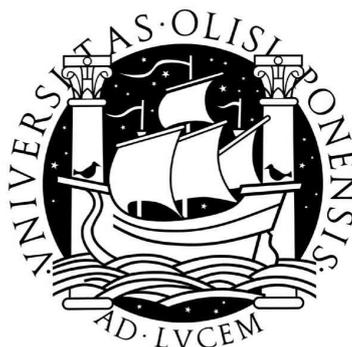


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



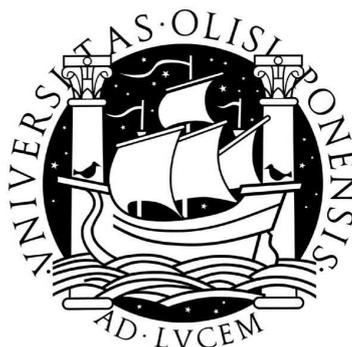
**ESTUDO DA DIFUSÃO DO HIDROGÉNIO
MOLECULAR NUMA HIDROGENASE [NIFESE]
POR MÉTODOS DE DINÂMICA MOLECULAR**

Carla Sofia Arrifes Baltazar

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**ESTUDO DA DIFUSÃO DO HIDROGÉNIO
MOLECULAR NUMA HIDROGENASE [NIFESE]
POR MÉTODOS DE DINÂMICA MOLECULAR**

Carla Sofia Arrifes Baltazar

Tese orientada por Prof. Doutor Cláudio Soares

e Prof. Doutor António Ferreira

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

2009

Índice

Índice	i
Agradecimentos	vii
Abreviaturas.....	viii
Resumo	ix
Abstract.....	x
1 Introdução.....	1
1.1 Hidrogenases: diversidade e função biológica	1
1.1.1 Hidrogenases [NiFe].....	3
1.1.2 Hidrogenases [FeFe].....	7
1.1.3 Hidrogenases [Fe].....	8
1.2 Potencial biotecnológico das hidrogenases	9
1.3 Ciclo catalítico das hidrogenases [NiFe].....	12
1.3.1 Estados de oxidação do centro activo.....	12
1.3.2 Activação	15
1.3.3 Ciclo catalítico.....	16
1.4 Difusão de gases	18
1.5 Hidrogenase [NiFeSe] de <i>Desulfovibrio baculatum</i>	22
2 Modelação molecular	25
2.1 Mecânica molecular.....	26
2.2 Simulações de dinâmica molecular	30
2.2.1 Sistema simulado.....	32
2.2.2 Simulações a temperatura e pressão constantes	33
3 Métodos	35
4 Resultados.....	39
4.1 Estabilidade do modelo de simulação	39
4.2 Quantidade de H ₂ interiorizado	45
4.3 Distribuição do H ₂ no interior da proteína	49
4.4 Canais e cavidades para percolação de H ₂	52
5 Conclusão	57

Anexos.....	59
Bibliografia.....	60

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Doutor Cláudio Soares por me ter recebido no grupo de Modelação de Proteínas e por ter sido condescendente comigo nos meus piores momentos.

Ao Professor António Ferreira por ter tornado este estágio possível.

Ao Bruno Vítor, à Ana Sofia Oliveira, ao João Damas, ao Luís Pereira, à Diana Lousa, ao Luís Filipe, à Sara Campos, ao Doutor António Baptista e ao Miguel Machuqueiro, pelo tempo e paciência que disponibilizaram para me ajudar neste trabalho, pelos bons momentos e pelas bolachas partilhadas. Eu sei que alguns gostavam de ter e mereciam um agradecimento especial, que eu não fiz para ser politicamente correcta.

Ao Vítor Teixeira pelo trabalho que lhe dei durante as orientações à distância.

Aos colegas que me acompanharam durante o meu percurso na FCUL, em especial ao Michael Pereira e ao Joaquim Marquês.

Ao Pedro Rafael por me aturar nos momentos difíceis e por me emprestar dinheiro quando eu preciso.

A todos os autores dos programas usados neste trabalho.

Aos meus pais por todo o apoio.

Por fim gostava de deixar um agradecimento especial a todas as pessoas que se preocupam comigo, e que eu não mencionei.

Abreviaturas

<i>D. desulfuricans</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
<i>D. fructosovorans</i>	<i>Desulfovibrio fructosovorans</i>
<i>D. gigas</i>	<i>Desulfovibrio gigas</i>
<i>D. vulgaris</i> Miyazaki	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Miyazaki
<i>Dm. baculatum</i>	<i>Desulfomicrobium baculatum</i>
EPR	Ressonância paramagnética nuclear
FeS	Centro ferro-enxofre
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
Hase	Hidrogenase
MBHases	Hidrogenase associada à membrana
MC	Monte Carlo
MD	Dinâmica molecular
MM	Mecânica molecular
PB	Poisson-Boltzman
<i>R. capsulatus</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
<i>R. eutropha</i>	<i>Ralstonia eutropha</i>
RMSD	Desvio quadrado médio
SHases	Hidrogenase solúvel

Abreviaturas de Aminoácidos

Ala	A	Alanina
Ile	I	Isoleucina
Leu	L	Leucina
Met	M	Metionina
Phe	F	Phenilalanina
Val	V	Valina

Resumo

As hidrogenases são enzimas que catalisam a oxidação reversível de H₂, considerado um combustível alternativo limpo. Como a sua inibição por O₂ tem sido um dos grandes obstáculos à sua aplicação em sistemas biotecnológicos, as poucas hidrogenases resistentes ou tolerantes ao O₂ têm despertado muita curiosidade.

O centro activo das hidrogenases do tipo [NiFe] contém um ferro e um níquel. Este último é coordenado por quatro cisteínas. O subgrupo das hidrogenase [NiFeSe], onde uma das cisteínas está substituída por uma selenocisteína, é particularmente interessante porque apresenta tolerância ao O₂ e maior eficiência na produção de H₂ quando comparada com as hidrogenases [NiFe] padrão, não se sabe, no entanto, como é que o selénio influencia estas propriedades. A cristalografia de raios X revelou a presença de canais que permitem ao H₂ e O₂ aceder ao centro activo, conservados nas hidrogenases padrão. No caso das hidrogenases reguladoras existem indícios de que o estreitamento destes canais, e conseqüente redução do acesso dos gases, pode ser a razão para a sua tolerância ao O₂. Na hidrogenase [NiFeSe] de *Dm. baculatum* um dos canais identificado nas hidrogenases padrão não está conservado.

O estudo apresentado neste trabalho tem por objectivo analisar os processos de difusão na hidrogenase [NiFeSe] de *Dm. baculatum*, através de simulações de dinâmica molecular e compará-los com o reportado para hidrogenase [NiFe] de *D. gigas*, de modo a perceber se estes podem influenciar a diferença de desempenho destes dois enzimas.

Os resultados indicam que a quantidade de H₂ interiorizada, assim com a sua densidade junto ao níquel é superior na hidrogenase [NiFeSe] de *Dm. baculatum*. As três principais vias de acesso são similares nas duas hidrogenases, mas a hidrogenase [NiFeSe] apresenta maior afluência no canal da subunidade pequena e menor circulação de H₂ na zona do canal menos conservado.

Palavras-chave:

Desulfomicrobium baculatum, hidrogenases [NiFeSe], difusão, H₂, dinâmica molecular

Abstract

Hydrogenases catalyze the reversible oxidation of H₂ to protons and electrons. These enzymes have large potential for producing and oxidizing H₂, which is considered an alternative green fuel. The O₂ inhibition is an obstacle to their application in biotechnological systems. Nonetheless, there are some hydrogenases that are O₂ resistant or tolerant.

The [NiFe]-type hydrogenases have a bimetallic active site with an iron and a nickel ion. In the subgroup of [NiFeSe]-hydrogenases, one of the four cysteins that coordinate the nickel in [NiFe]-hydrogenases, is replaced by a selenocystein. These [NiFeSe]-hydrogenases are particularly interesting for their higher H₂ production rate when compared to the standard [NiFe]-hydrogenases, in addition to their O₂ tolerance. It is not clear which role selenium plays in these properties. In regulatory hydrogenases, the diminished gas diffusion has been pointed by some studies as the reason for their O₂ resistance, suggesting that the hydrophobic channels that provide gas access in hydrogenases are narrower in these enzymes. One of those channels identified in the X-ray structure of standard [NiFe]-hydrogenase appears to be less conserved in the [NiFeSe]-hydrogenase of *Desulfomicrobium baculatum*.

The influence of H₂ diffusion in the *Dm. baculatum* [NiFeSe]-hydrogenase particular properties is addressed in this work. The H₂ diffusion in this protein is simulated with molecular dynamics methods, and the results are compared with a previous study concerning the *Desulfovibrio gigas* [NiFe]-hydrogenase.

The results indicate that the hydrogen internalization is higher for the [NiFeSe]-hydrogenase and a higher H₂ density near the nickel ion is registered for these enzymes. Although the three main pathways are roughly maintained, the flow of H₂ in the small subunit channel appears to be augmented in the [NiFeSe]-hydrogenase, while the least conserved channel in the X-ray structure present a reduced flow.

Keywords:

Desulfomicrobium baculatum, [NiFeSe]-hydrogenases, H₂ diffusion, molecular dynamics

1 Introdução

1.1 Hidrogenases: diversidade e função biológica

Hidrogenases (Hases) são enzimas que catalisam a reacção



O termo *hidrogenase* foi sugerido pela primeira vez, em 1931, num artigo de Marjory Stephenson e Leonard Huber Stickland¹. A sensibilidade ao O₂² e a presença de ferro sob a forma de centros ferro-enxofre³ (FeS) são características associadas à maioria das hidrogenases há muitos anos. No entanto, as hidrogenases constituem um grupo de enzimas consideravelmente heterogéneo⁴. Estes enzimas estão largamente difundidos pelos vários domínios da vida (Figura 1), e não são específicas de nenhum grupo taxonómico ou tipo de metabolismo. Existem diferentes estratégias metabólicas onde o H₂ está envolvido e nas quais as hidrogenases participam. Por exemplo, em organismos litotróficos, como as bactérias redutoras de sulfato, existem hidrogenases que oxidam o H₂, usado como fonte de energia por estes organismos⁵⁻⁷, enquanto que outros organismos libertam H₂ como forma de eliminar equivalentes redutores. O sentido em que catalisam a reacção *in vivo* está condicionado pelo potencial de oxiredução dos seus parceiros metabólicos⁴, pois *in vitro* conseguem catalisar a reacção (1) em ambos os sentidos. Apesar das hidrogenases catalisarem a reacção nos dois sentidos, é frequente que a sua capacidade de catálise seja mais eficiente num dos sentidos da reacção. Certas hidrogenases apresentam maior actividade na reacção de oxidação, enquanto que outras são mais eficientes na produção de H₂. Entre as hidrogenases é possível distinguir ainda vários tipos de estrutura^{4,8,9}. A cada tipo de estrutura está associado um tipo de centro activo, que nestes enzimas são complexos metálicos. Algumas têm centros bimetálicos com dois ferros, outras com um ferro e um níquel e existem ainda as que só têm um ferro. A única característica transversal a todos os tipos é a presença de ferro coordenado por monóxido de carbono.

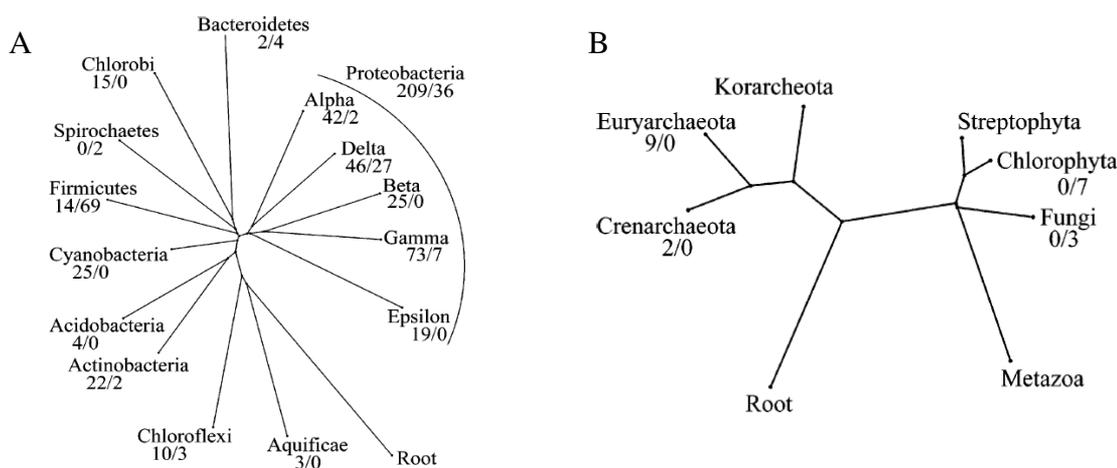


Figura 1 Árvores filogenéticas que ilustram a distribuição das hidrogenases nos domínios Bacteria (A), Archaea e Eucarya (B). O número à esquerda da barra representa as Hidrogenases [NiFe] e o da direita, as Hidrogenases [FeFe]. Figura retirada de Vignais & Billoud, 2007.

Os primeiros sistemas de classificação de hidrogenases agrupavam-nas de acordo com o dador ou aceitador de electrões⁴, e este é ainda o critério vigente na classificação E.C. da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*¹⁰. Quando se descobriu que as hidrogenases, para além de ferro, podiam ter níquel, tornou-se recorrente distinguir entre hidrogenases de níquel e de ferro. A distinção com base no conteúdo metálico, alargou-se ainda para incluir um tipo hidrogenases sem centros FeS descoberto recentemente. A sequenciação em larga escala permitiu usar os alinhamentos de sequências para uma classificação mais sistemática destes enzimas¹¹. Os trabalhos mais recentes de Vignais *et al.*⁴, nos quais comparam as 405 sequências de hidrogenases então conhecidas, corroboram a divisão baseada no conteúdo metálico e mostram ainda que estas classes são filogeneticamente distintas. Segue-se uma breve descrição das classes propostas no referido trabalho, com maior enfoque nas hidrogenases que contém níquel, a classe onde se inclui a proteína estudada no presente trabalho.

1.1.1 Hidrogenases [NiFe]

A maioria das hidrogenases conhecidas pertence a esta classe, que é também a mais estudada actualmente. O seu centro activo é bimetalico: para além do níquel, inclui também um ferro^{9,12,13}, daí a designação [NiFe]. O níquel é coordenado por quatro cisteínas, duas das quais fazem ponte com o ferro (Figura 2). Este último é ainda coordenado por uma molécula de monóxido de carbono e dois iões cianeto¹⁴, ligandos pouco comuns em proteínas.

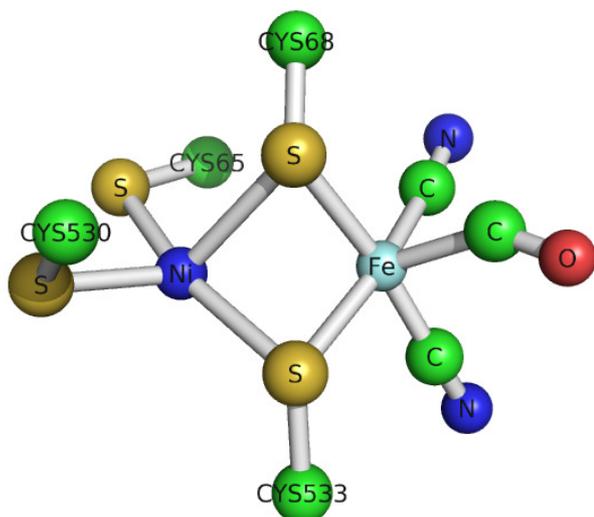


Figura 2 Centro activo das hidrogenase [NiFe] padrão. A numeração usada corresponde à hidrogenase [NiFe] de *D. gigas*, a primeira hidrogenase com estrutura conhecida.

A unidade catalítica básica (Figura 3) é um heterodímero globular formado por uma subunidade pequena com 30kDa e uma subunidade grande com 60kDa. A este dímero podem associar-se ou não outras subunidades⁴. O centro catalítico encontra-se internalizado no centro da proteína, na subunidade grande^{9,12}. Existem três centros FeS, dispostos linearmente na subunidade pequena^{12,15}. Funcionam como uma via que permite a transferência de electrões entre o centro activo internalizado na proteína e os parceiros metabólicos do enzima. Ao centro FeS mais próximo do centro activo atribui-se a designação de centro proximal e ao mais próximo da superfície dá-se o nome de centro distal. Entre estes encontra-se o centro médio. Por norma, o centro médio é do tipo [3Fe4S] e os centros proximal e distal são ambos do tipo [4Fe4S]. Todos os ferros são coordenados por cisteínas, à excepção de um dos ferros do centro distal que é

coordenado por uma histidina. A estrutura de raios X apresenta cavidades hidrofóbicas que ligam a superfície ao centro^{15,16}, por onde os gases, como o H₂ se difundem, como indicam alguns estudos^{17,18}. Também já foram propostas vias, constituídas por resíduos ionizáveis, por onde os prótons podem transitar^{19,20}. A estrutura inclui ainda um ião magnésio coordenado por três moléculas de água, pelo carbonilo da cadeia principal de uma isoleucina, por um glutamato e ainda pela cadeia lateral da histidina do terminal carboxilo da subunidade grande.

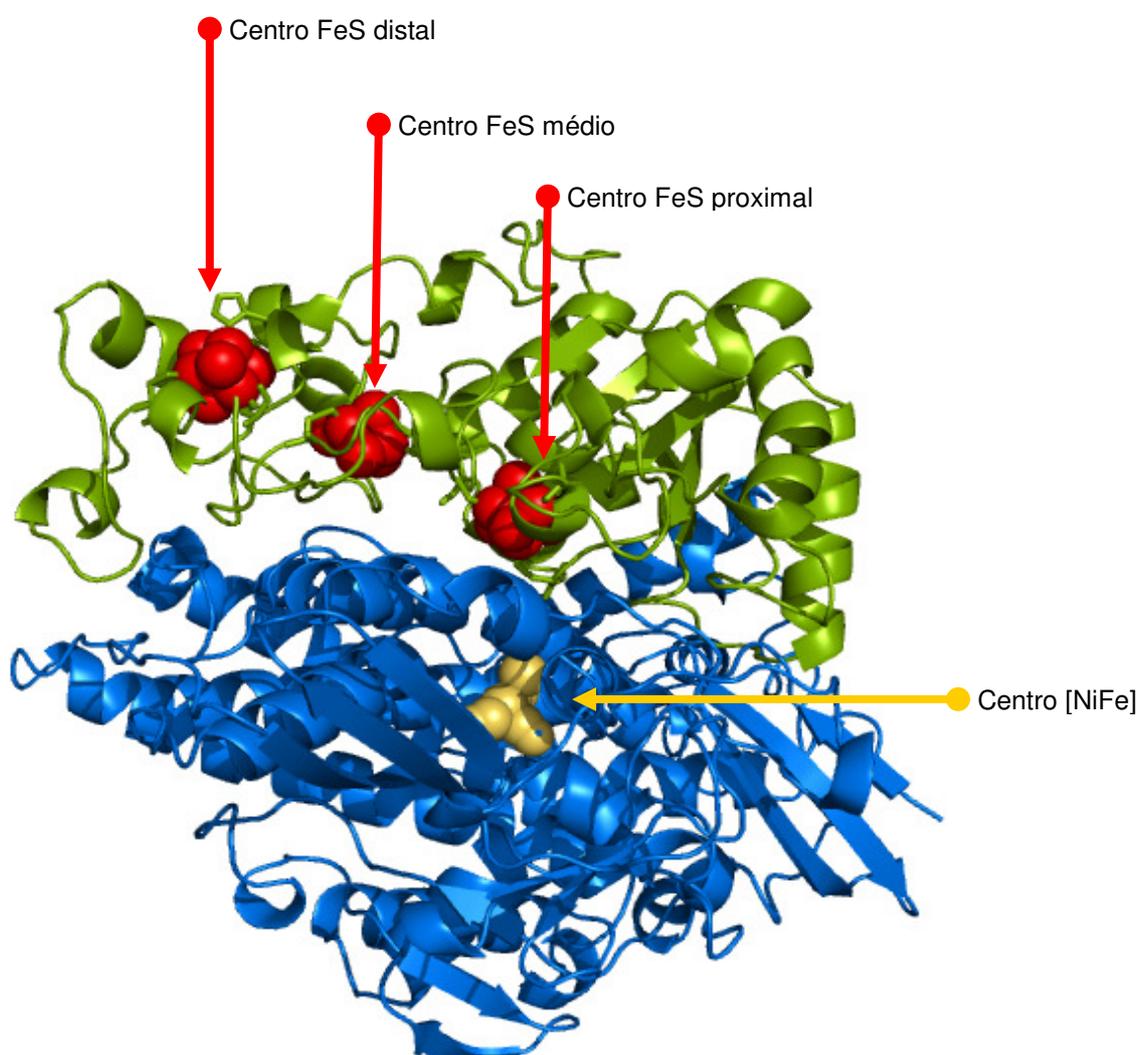


Figura 3 Estrutura de uma hidrogenase [NiFe]. A subunidade grande está representada a azul e a pequena a verde. Os centros FeS estão representados a vermelho e o centro activo está representado a amarelo.

As hidrogenases com as características referidas, como a hidrogenase [NiFe] de *Desulfovibrio gigas*, são consideradas hidrogenases padrão^{4,8}. Conhecem-se algumas hidrogenases com características excepcionais, como, é o caso das hidrogenases [NiFeSe] ou da hidrogenase solúvel (SHase) de *Ralstonia eutropha*. Nas hidrogenases [NiFeSe], a cisteína 350 (na numeração de *D. gigas*, ver Figura 2) foi substituída por uma selenocisteína^{16,21-23}, e o centro médio do tipo [3Fe4S] foi substituído por um centro [4Fe4S]¹⁶. Apesar de não se conhecer a estrutura de raios X, os estudos de FTIR sugerem que as hidrogenases citoplasmáticas de *R. eutropha* tem quatro moléculas de cianeto, uma delas a coordenar o níquel e as restantes a coordenar o ferro²⁴.

Na classe [NiFe], os alinhamentos de sequência permitem ainda definir quatro subgrupos que estão de acordo com as funções celulares que desempenham⁴.

Grupo 1 – Hases [NiFe] envolvidas na respiração de H₂

As hidrogenases deste grupo estão associadas a parceiros metabólicos com potencial de oxidação mais elevado que o par H⁺/H₂, o que permite que *in vivo* o H₂ seja oxidado e usado como fonte de energia. Todas têm um péptido sinal no terminal carboxílico da subunidade pequena, o qual é responsável pela translocação do dímero para o lado periplasmático. Algumas ficam associadas à membrana através de um grupo hidrófobo, enquanto que outras assumem uma forma solúvel. De uma forma geral, os electrões resultantes da oxidação do H₂ são transferidos, por intermédio de diversos componentes da cadeia respiratória, das hidrogenases para complexos membranares que procedem à redução dos aceitadores finais de electrões como O₂, CO₂, fumarato, NO₃⁻ ou SO₄²⁻. Durante o processo, a energia da oxidação do H₂ é conservada por um processo quimiosmótico.

Dentro deste subgrupo é ainda possível fazer distinções com base nas cadeias respiratórias em que estão inseridas. De uma forma geral, as hidrogenases associadas à membrana (MBHases) através de um grupo hidrófobo transferem os electrões para um

citocromo *b*. Este citocromo, que é uma proteína integral de membrana, para além de transferir os electrões, que recebe das hidrogenases, para um reservatório de quinonas, funciona também como uma subunidade envolvida na ancoragem das MDHases à membrana. A MBHase de *R. eutropha*, espécie com capacidade para usar simultaneamente H₂ como fonte de energia e O₂ como aceitador de electrões, tem a particularidade de ser resistente ao O₂. Noutros casos, como no género *Desulfovibrio*, as hidrogenases transferem os electrões para um citocromo *c*₃. Estas hidrogenases são normalmente solúveis, mas algumas destas apresentam também uma forma associada à membrana através de um grupo hidrófobo^{25,26}. A hidrogenase [NiFeSe] de *Dm. baculatum*, estudada neste trabalho, enquadra-se no grupo que interage com citocromo *c*.

Grupo 2 – Hases citoplasmáticas heterodiméricas

Existem duas características comuns entre os elementos deste grupo que os distinguem dos restantes: i) não têm o péptido sinal no terminal amina da subunidade pequena que permite a exportação para o lado periplasmático, o que as torna citoplasmáticas e, ii) para além disso, apresentam um conjunto específico de deleções relativamente às sequências de aminoácidos do grupo anterior. A designação heterodimérica é usada para fazer a distinção entre as citoplasmáticas multiméricas. Fazem parte deste grupo as hidrogenases que consomem H₂ das cianobactérias, e as hidrogenases reguladoras estudadas em organismos como *Ralstonia eutropha* e *Rhodobacter capsulatus*. As hidrogenases das cianobactérias reciclam o H₂ libertado pela acção da nitrogenase, enzima responsável pela fixação de azoto, e as reguladoras controlam a biossíntese das hidrogenases que oxidam H₂. Sabe-se que as hidrogenases reguladoras são resistentes ao O₂, mas em contrapartida têm uma actividade bastante reduzida. Apesar da estrutura de raios X destes enzimas não ter ainda sido determinada, os dados espectroscópicos indicam que os centros FeS padrão se encontram substituídos por dois centros [2Fe-2S] e uma espécie que se julga ser um complexo [4Fe-3S-3O].

Grupo 3 – Hidrogenases citoplasmáticas heteromultiméricas reversíveis

Neste grupo, o típico dímero que constitui a unidade catalítica básica está associado a subunidades que ligam cofactores solúveis, como o cofactor F420, o NAD e o NADP.

Estes enzimas têm a particularidade de catalisar a reacção nos dois sentidos *in vivo*, daí serem caracterizadas como bidireccionais. A maioria das hidrogenases desta classe é encontrada em organismos do domínio *Archaea*. Uma destas hidrogenases, isolada a partir de *R. eutropha*, tem quatro grupos cianeto no centro activo, um deles ligado ao níquel, e é resistente ao O₂. Experiências mostram que quando submetido a condições redutoras durante longos períodos de tempo, o enzima perde o cianeto ligado ao níquel, tornando-se susceptível à inactivação por O₂²⁴.

Grupo 4 – Hidrogenases produtoras de H₂ associadas à membrana

Estas hidrogenases produzem H₂ a partir de protões como forma de eliminar o excesso de equivalentes redutores resultantes da oxidação anaeróbia de compostos em C1, como o monóxido de carbono e o formato. São multiméricas e maioria pertence a organismos de domínio *Archaea*.

1.1.2 Hidrogenases [FeFe]

O centro activo das hidrogenases [FeFe], representado na Figura 4, tem dois ferros, como o nome sugere. Um deles está coordenado por duas moléculas de CO e um ião de CN⁻. O outro está ligado a um ião de CN⁻, a uma molécula de CO e a uma cisteína que coordena simultaneamente um centro [4Fe4S]⁹. Os dois enxofres de uma molécula de di(tiometil)-amina (DTN) fazem a ponte entre os dois ferros. A ligação ao centro FeS é a única ligação à proteína.

A unidade catalítica básica das hidrogenases [FeFe] é um monómero, que pode associar-se a outras subunidades. No monómero catalítico de todas as hidrogenases deste tipo existe um domínio bastante conservado, a que se dá o nome de *H-cluster*. É neste domínio que se encontra o centro activo. Associado a este, podem existir domínios adicionais que contêm os centros FeS.

As hidrogenases deste tipo são, na sua maioria, citoplasmáticas, mas também podem ser encontradas no periplasma, como acontece nos organismos redutores de sulfato. *In vivo*, encontram-se com mais frequência associadas à produção de H₂, enquanto as

hidrogenases [NiFe] estão preferencialmente associadas à oxidação de H₂, embora existam exceções. De um modo geral, quando comparadas com as hidrogenases [NiFe], apresentam actividades de produção de H₂ mais elevadas, mas em contrapartida são mais sensíveis à inibição por O₂²⁷.

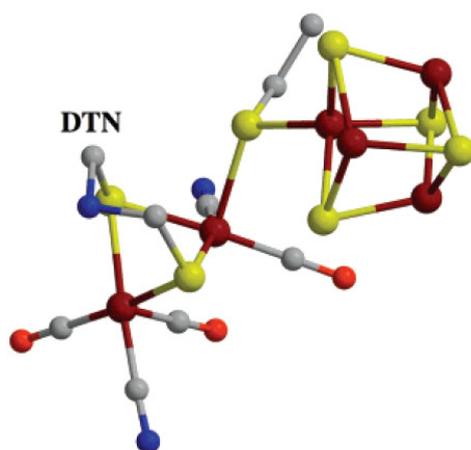


Figura 4 Centro activo das hidrogenases [FeFe]. Código de cores: cinzento – carbono, azul – azoto, vermelho – oxigénio, amarelo – enxofre, castanho – ferro. DTN é a abreviatura de di(tiometil)amina. Figura retirada de Fontecilla-Camps, 2007.

1.1.3 Hidrogenases [Fe]

Este tipo hidrogenases difere substancialmente das hidrogenases [NiFe] e [FeFe]. O centro activo, com apenas um ferro, é mononuclear. Não oxidam o H₂ a protões e electrões, nem reduzem protões. O H₂ é usado para reduzir a molécula metenil-H₄MPT⁺. A sua distribuição é bastante limitada: ocorrem apenas em alguns organismos metanogénicos do domínio *Archaea*.

1.2 Potencial biotecnológico das hidrogenases

A compreensão do funcionamento das hidrogenases pode encontrar aplicação em diferentes campos, como a produção de co-factores enzimáticos, a detecção de agentes patogénicos que libertam H₂, a diminuição dos danos da biocorrosão, ou a biorremediação²⁸. No entanto, é a busca por soluções que viabilizem uma economia do H₂ que mais tem feito crescer o interesse nestes enzimas.

As fontes de energia renováveis e não poluentes são um requisito fundamental para a sustentabilidade global, uma das grandes preocupações da actualidade. O H₂ é uma alternativa aos combustíveis fósseis muito atractiva²⁹. A sua combustão produz apenas água, sem libertação de CO₂, gás responsável pelo efeito de estufa, ou outros poluentes. Para além disto, é libertada uma grande quantidade de energia na reacção de combustão do H₂. No entanto, o H₂ não é uma fonte de energia primária, uma vez que não existe no planeta em quantidades suficientes para sustentar as necessidades energéticas globais. É necessário gastar energia para o produzir a partir de outros compostos, pelo que funciona antes como um vector da energia usada no processo de produção. Para que a produção deste combustível seja um processo limpo e sustentável é necessário usar água como matéria-prima e energias renováveis para a separar em H₂ e O₂. A solução ideal passaria pela aplicação da energia solar num processo de fotólise. Os métodos de produção que cumprem estes requisitos não são ainda viáveis em larga escala, por várias razões, nomeadamente de ordem económica. Existem também grandes obstáculos no armazenamento, uma vez que o H₂ ocupa um grande volume por unidade de energia. No consumo, as células de combustível são a solução mais provável. Estas apresentam uma eficiência considerável, mas a platina usada como catalisador nestes sistemas, para além do custo elevado, é também um recurso escasso, tornando-se assim um obstáculo à sua massificação. O princípio das células de combustível está ilustrado na Figura 5. Espera-se que o estudo das hidrogenases, capazes de catalisar a produção e a oxidação de H₂, usando metais de transição, de custo reduzido, permita desenvolver catalisadores alternativos para estas tecnologias.

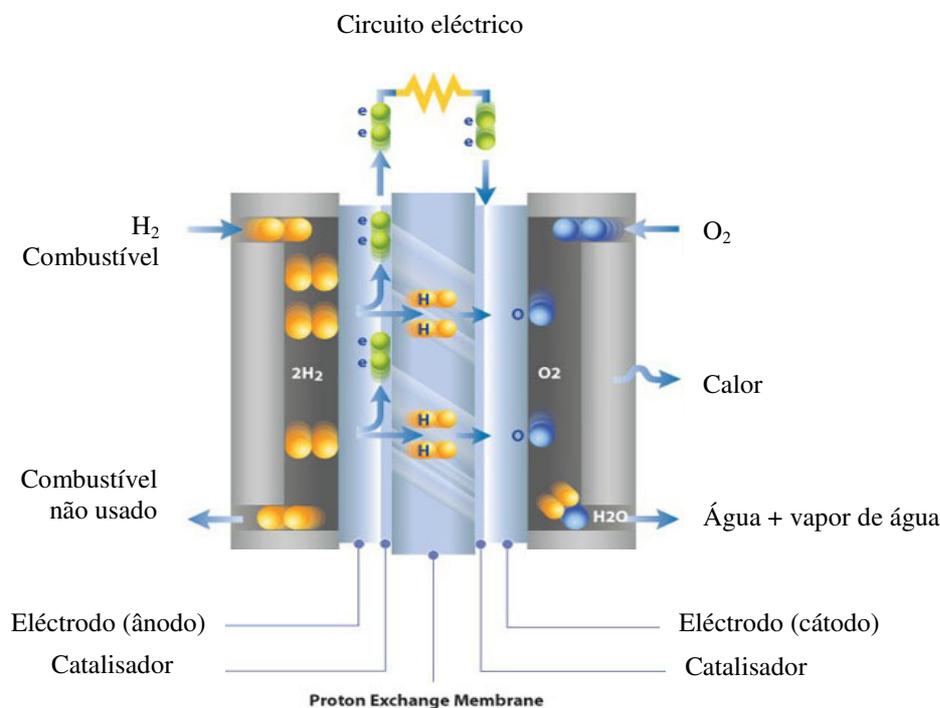


Figura 5 Representação de uma célula de combustível PEM (Proton Exchange Membrane).

A velocidade de oxidação do H₂ de uma hidrogenase [NiFe] adsorvida num eléctrodo de grafite é comparável à velocidade obtida com a platina³⁰. A produção fotolítica de H₂ com uso de Hases associadas a componentes fotossensíveis já foi reportada em vários estudos³¹. Em comparação com a platina as hidrogenases são mais selectivas e são menos sensíveis à inibição por CO.

Um dos grandes problemas destes sistemas é a instabilidade dos enzimas e a dificuldade em expressá-los heterologicamente, devido à complexa maquinaria envolvida na sua síntese proteica⁴. Uma forma de ultrapassar esta questão seria usar complexos metálicos que mimetizassem o centro activo destes enzimas, mas apesar dos esforços ainda não foram obtidos compostos com as propriedades desejadas³². Como explicação, julga-se que a matriz proteica que envolve o centro pode ser determinante nas propriedades

catalíticas dos centros activos das hidrogenases. O outro grande obstáculo à sua utilização é a inibição por O₂, pelo que o desenvolvimento de enzimas tolerantes a este gás é fulcral para que estes possam ter aplicação biotecnológica.

1.3 Ciclo catalítico das hidrogenases [NiFe]

O mecanismo pelo qual as hidrogenases conseguem catalisar a clivagem de um composto tão estável como o H₂, à temperatura ambiente e sem recurso a metais nobres, sempre gerou grande interesse e curiosidade. Igualmente intrigante é o seu peculiar perfil de reactivação após exposição ao O₂, cuja cinética pode ser rápida ou lenta consoante a preparação da amostra^{33,34}.

Sabe-se desde 1975, que a clivagem do H₂ é um processo heterolítico, ou seja, que um dos átomos recebe os dois electrões da molécula transformando-se num hidrato, com libertação de um protão³⁵. A maioria da informação usada actualmente na compreensão dos mecanismos de catálise e reactivação foi, no entanto, obtida nas últimas três décadas com o contributo de técnicas espectroscópicas como FTIR e EPR, e também da cristalografia de raios X e eletroquímica^{8,9,36,37}. Existem ainda aspectos dos processos de catálise e reactivação não clarificados pelos dados experimentais e que como tal permanecem controversos. O tempo de vida breve de alguns intermediários torna impossível segui-los experimentalmente. Esta dificuldade na obtenção de dados experimentais tem criado espaço para vários estudos teóricos.

São conhecidos vários estados de oxidação destes enzimas, incluindo os estados inactivos que derivam da reacção com o O₂. Para além do O₂, as hidrogenases também são inibidas por H₂, H₂S, pelo CO e, a temperaturas baixas, pela luz, mas estes estados não serão detalhados no presente trabalho.

1.3.1 Estados de oxidação do centro activo

Os estados de oxidação associados ao centro activo das hidrogenases padrão caracterizados espectroscopicamente até à data^{8,9,36,37} estão representados na Figura 6. Os primeiros destes estados a serem identificados foram descobertos através de EPR³⁸⁻⁴¹, e como tal, são paramagnéticos.

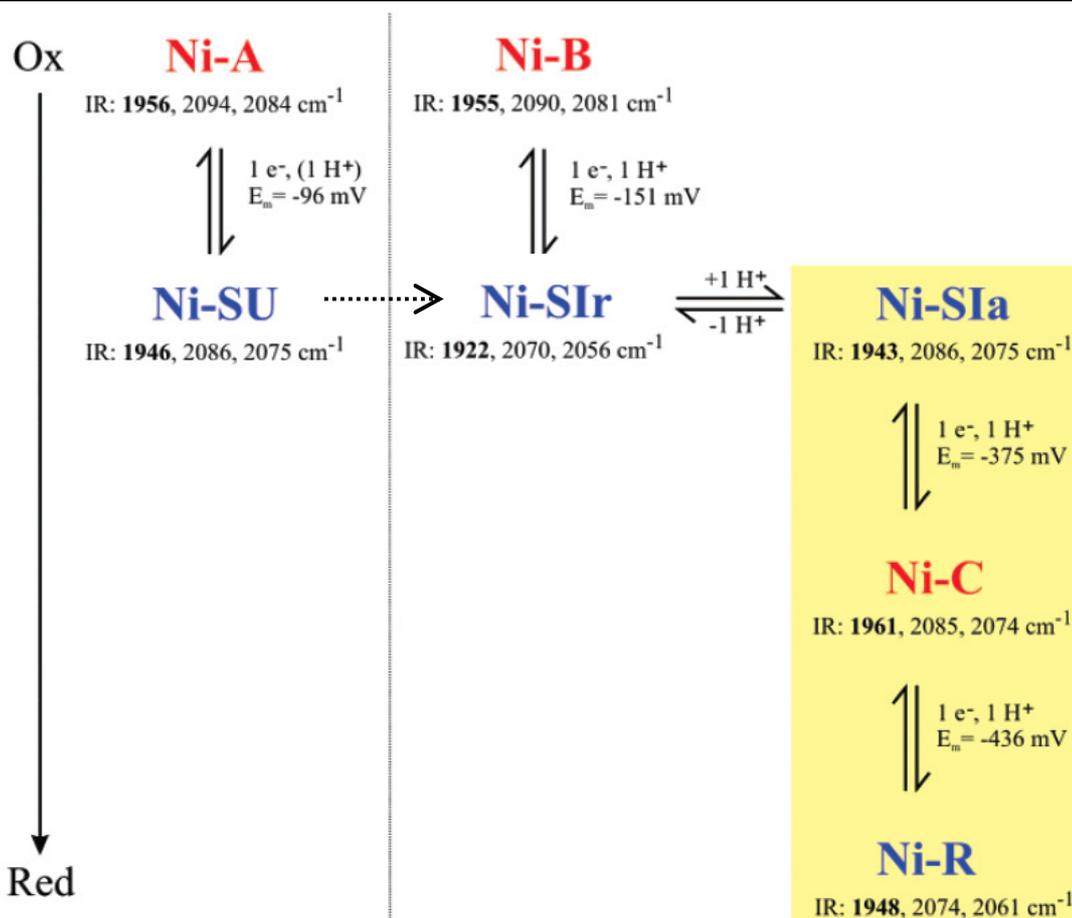


Figura 6 Estados de oxidação do centro activo da hidrogenase [NiFe] de *D. vulgaris* Miyazaki caracterizados espectroscopicamente. Os potenciais de ponto médio indicados foram determinados a pH=6 para o Ni-A e a pH=8 para os restantes estados. Os estados assinalados a vermelho são paramagnéticos. Estão indicadas as frequências de vibração do CO detectadas por FTIR. Os estados activos estão destacados a amarelo. Adaptado de Lubitz *et al.*, 2007.

Para além dos sinais com origem nos centros FeS, as hidrogenases apresentam tipicamente três sinais de EPR provenientes do centro activo: o Ni-A, o Ni-B e o Ni-C. As amostras preparadas aerobicamente não têm actividade e apresentam uma mistura de sinais Ni-A e Ni-B, em proporções que variam consoante a preparação da amostra³⁸. O sinal Ni-C é detectado nas amostras reduzidas, as quais são activas. O sinal Ni-A corresponde a um estado inactivo de reactivação lenta, designado *unready*⁴², enquanto que o sinal Ni-B corresponde a um estado de reactivação rápida, designado *ready*. Dados experimentais indicam que o Ni-A não reage com H₂, enquanto que o Ni-B reage

em segundos⁴³. Em todos estes estados o sinal de EPR tem origem no níquel, o qual está no estado de oxidação +3 e *spin* S=1/2, enquanto que o ferro tem carga +2 e o *spin* S=1¹³.

As titulações de oxidação-redução indicavam a existência de outros estados não detectados por EPR³⁸. A descoberta de que as hidrogenases produzem um intenso sinal de FTIR sensível a alterações de oxidação-redução, com origem nas moléculas de CO e CN- que coordenam o ferro^{13,14,44}, permitiu usar esta técnica para caracterizar um espectro mais alargado de estados.

O estado Ni-SU é resultante da redução do Ni-A e o estado Ni-SIr resultante da redução do Ni-B. Estas duas transformações são rápidas e reversíveis. O Ni-SU transforma-se depois lenta e espontaneamente no Ni-SIr, sendo ambos inactivos. O estado Ni-SIr está em equilíbrio ácido-base com o estado Ni-SIa, o qual é activo. O estado Ni-C resulta da redução do Ni-SIa e o Ni-R da redução do Ni-C. Alguns autores consideram que o estado Ni-SIr é activo⁸. Em todos estes estados não detectados por EPR, o Ni-SU, Ni-SIr, Ni-SIa e Ni-R, o ferro e o níquel têm carga +2^{13,45,46}. É consensual que o ferro tem baixo *spin* em todos estes estados, mas é matéria de debate se o *spin* do Ni(II) é alto ou baixo.

A frequência de vibração do CO e CN-, registada pelo FTIR, responde às alterações na densidade de carga do ferro⁸. Segundo os dados, o ferro mantém a carga formal, no entanto a deslocalização de carga no centro activo das hidrogenases permite que a carga parcial do ferro seja alterada em resposta a processos de oxiredução do níquel ou associação de ligandos. O mesmo efeito é responsável pela densidade de carga aproximadamente constante no níquel, apesar das alterações de oxidação-redução. O centro comporta-se como uma entidade electrónica una⁸.

A natureza estrutural das espécies referidas e as transformações que ocorrem nos processos de activação e ciclo catalítico são discutidas em seguida.

1.3.2 Activação

Vários estudos foram efectuados no intuito de compreender quais as características divergentes entre os estados Ni-A e Ni-B que estão na origem da conhecida diferença de comportamentos. A cristalografia de raios X mostra a presença de um ligando extra entre o ferro e o níquel nos estados oxidados Ni-A e Ni-B, ausente nos estados activos^{9,47}. Existem fortes indícios de que no caso do Ni-A se trata de um OOH⁻ e no caso do Ni-B de um OH⁻.⁴⁸ No entanto, existem vários dados que geram algumas dúvidas em relação à natureza dos ligandos no estado oxidado. As densidades electrónicas do ligando extra adequam-se mais a um enxofre em alguns estudos de *D. vulgaris* Miyazaki³⁷. Existem ainda indícios da libertação de sulfureto de hidrogénio aquando da redução do enzima³⁷ e, inclusive, parece existir uma molécula de sulfureto de hidrogénio a cerca de 7Å do centro na estrutura de *Dm. baculatum*¹⁶. Para além disto, em vários casos é reportada densidade electrónica junto da cisteína, interpretada como um átomo de oxigénio⁹, indicando que em algumas situações se podem formar sulfonatos. Fontecilla-Camps *et al*⁹, sugere, no entanto, que esta modificação da cisteína possa ser atribuída aos enzimas irreversivelmente inactivados e não ao estado Ni-A.

Vários estudos indicam que as espécies Ni-SU e Ni-SI mantêm os ligandos dos estado Ni-A e Ni-B, respectivamente, e que são ambas inactivas^{49-51,47}. Julga-se que a diferença de protonação entre as formas Ni-SIr e Ni-SIa se deva à transferência de um protão para o OH⁻^{8,36,37,43,52}, que assim se transforma numa molécula de água e perde a ligação ao centro activo. Como alguns trabalhos sugerem que as diferenças no espectro FTIR entre as duas formas se devem à protonação de uma cisteína⁸, foi proposto que o protão pode ser transferido da cisteína para o OH⁻⁵².

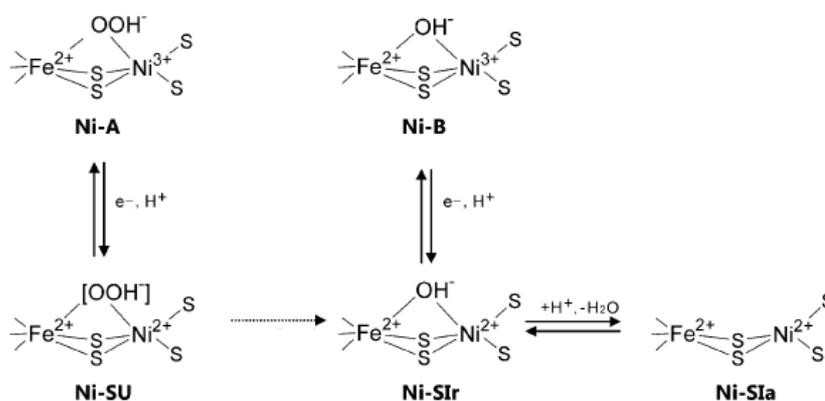


Figura 7 Alterações estruturais do processo de activação. Adaptado de Ogata *et al.*, 2009.

1.3.3 Ciclo catalítico

De entre os vários estados identificados espectroscopicamente são considerados activos o Ni-SIa, o Ni-C e o Ni-R^{8,36,37}. Sabe-se que o mecanismo é heterolítico, pelo que se espera que, durante o processo, um hidreto se ligue a um dos metais. É geralmente aceite que o estado Ni-C tem um hidreto ligado ao níquel⁵³, mas não se sabe mais nada acerca da estrutura dos restantes intermediários. Actualmente, existem dois modelos propostos para o ciclo catalítico igualmente válidos^{54,8}. O primeiro modelo (Figura 8A) inclui os três estados. O Ni-R seria obtido após reacção do H₂ com o Ni-SIa. A perda de um protão e de um electrão levaria à formação do Ni-C, e este transformar-se-ia de novo em Ni-SIa com a perda do segundo protão e do segundo electrão. O modelo alternativo (Figura 8B) considera que o Ni-C é formado por uma reacção preparatória do Ni-SIa com uma molécula de H₂ e que apenas os estados Ni-C e Ni-R estão envolvidos na catálise, em consonância com as experiências que indicam que a transição entre estes dois estados é a única em equilíbrio com o H₂^{50,55}. Segundo alguns autores isto seria possível para a produção do H₂, mas não para a sua oxidação⁸.

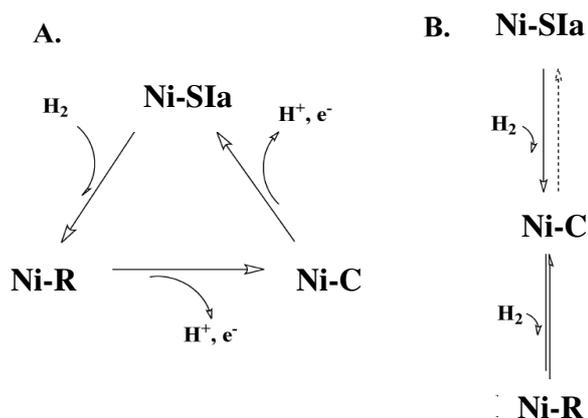


Figura 8 Possíveis modelos do ciclo catalítico das hidrogenases [NiFe]. Retirado de Lill *et al.*, 2009.

A detecção de intermediários que possam confirmar um dos modelos não é ainda possível, pelo que os estudos teóricos têm sido uma alternativa. Existem vários que estão de acordo com o primeiro modelo^{56,57} e estes normalmente indicam que o H₂ liga ao ferro. Estas observações estão de acordo com a tendência do H₂ para se ligar a metais d₆ *low-spin*. No entanto, os indícios experimentais favorecem a ligação ao níquel: a extremidade dos canais que conduzem o H₂ apontam para este metal^{15,17,18}, e o inibidor competitivo CO liga ao níquel⁵⁸. Recentemente Lill *et al.*⁵⁴, apercebendo-se que os estudos teóricos não conseguiam reproduzir a ligação do OOH⁻ ao centro activo, construíram um modelo híbrido de mecânica quântica/mecânica molecular (QM/MM) que incluísse os resíduos na envolvente do centro activo. No interior das hidrogenases, os resíduos carregados são anormalmente abundantes e a sua influência pode ser fundamental. Usando um modelo em que só o Ni-C e o Ni-R são incluídos no processo de catálise, embora diferente do anterior em alguns aspectos, e considerando que o hidreto se forma no níquel, este estudo obteve os valores de energia que mais se aproximam do experimental.

1.4 Difusão de gases

Segundo um estudo que usou a Hase de *Chromatium vinosum*, a difusão, nestes enzimas, é um factor limitante da velocidade de catálise⁵⁹. O centro activo nas hidrogenases [NiFe] cuja estrutura é conhecida está localizado no interior da proteína, o que sugere a necessidade de canais que permitam que moléculas como o H₂, o O₂ ou o CO atravessem a matriz proteica entre este e a superfície.

As estruturas cristalográfica mostram uma rede de canais conservados em *D. fructosovorans*, *D. gigas*, *D. desulfuricans* e *D. vulgaris* Miyazaki^{12,15,60,61}. A imagem na Figura 9 ilustra esta rede, composta por três canais comunicantes entre si. Os resíduos que revestem os canais, assim como os que circundam a entrada destes à superfície do enzima são maioritariamente hidrófobos^{15,9}. Esta característica favorece a presença de H₂ e evita que as moléculas de água se acumulem nestas zonas e impeçam o acesso aos canais⁹.

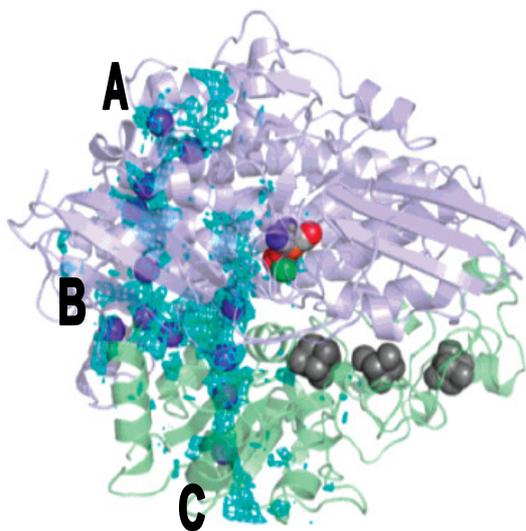


Figura 9 Canais hidrofóbicos na hidrogenase representados pela malha azul preenchidos por átomos de Xe [NiFe] de *D. fructosovorans*. Distinguem-se três canais: A, B e C. Adaptado de Fontecilla-Camps, 2007.

Existem vários estudos que confirmam o papel destes canais ou cavidades na condução dos gases entre o centro activo e superfície. Como a resolução dos métodos

cristalográficos não permite a detecção da molécula de H₂, o primeiro estudo sobre difusão em Hases usou xénon¹⁸. A estrutura de raios X obtida mostra átomos de xénon alojados nas referidas cavidades. O mesmo estudo mostra ainda, através de simulações de dinâmica molecular, que o Xe e o H₂ usam estes canais para circular no interior da proteína. Nestas simulações, as posições do xénon na estrutura de raios X foram usadas como posição inicial para o Xe e o H₂. Esta última técnica foi usada num outro estudo¹⁷ em que as moléculas de H₂ são inicialmente colocadas no exterior da proteína. Este trabalho conclui também que o H₂ difunde para o interior usando os canais identificados pela estrutura de raios X e que estes são a única forma de acesso ao centro activo. Os estudos de cristalografia com Xe foram recentemente aplicados à Hase de *D. vulgaris* Miyazaki com conclusões semelhantes³⁷.

As sequências dos quatro enzimas de *Desulfovibrio* referidas acima apresentam cerca de 64% de homologia, pelo que a conservação dos canais era previsível. A Hase [NiFeSe] de *Dm. baculatum*, a única Hase tolerante ao O₂ com estrutura publicada, só tem 35% de homologia com as anteriores, e no entanto mantém grande parte da rede de canais¹⁵. Embora os resíduos dos canais sejam menos conservados, as substituições acontecem de tal forma que um resíduo mais volumoso é compensado com um menos volumoso, mantendo a configuração geral dos canais, à excepção do canal A na Figura 9. O canal B, bastante conservado nas cinco proteínas, parece ser a principal via de acesso ao centro activo.

Não se sabe ao certo quais os motivos na origem da tolerância da Hase [NiFeSe] de *Dm. baculatum* ao O₂. É muito provável que a selenocisteína tenha influência nesta propriedade, mas as diferenças nos canais deixam em aberto um papel para a difusão, como acontece nas Hases reguladoras de *R. eutropha* e *R. capsulatus*. Pensa-se que o centro activo das Hases [NiFe] reguladoras é igual ao das Hases padrão pelo que não deve ser este o factor responsável pela sua resistência ao O₂. A comparação das sequências indica que os aminoácidos dos canais, mais próximos do centro, conservados nas hidrogenases padrão, estão substituídos por resíduos mais volumosos nestes enzimas¹⁵. Mais concretamente, trata-se de uma valina e uma leucina substituídas

respectivamente por uma isoleucina e uma fenilalanina. Estas observações conduziram à hipótese do crivo molecular segundo a qual o acesso do O₂ ao centro activo é regulado pelo diâmetro dos canais, inversamente dependente do volume dos resíduos que os constituem. Assim, canais mais estreitos reduziram a difusão do O₂. Esta hipótese atribui à difusão um papel importante na resistência ao O₂.

A referida hipótese foi testada primeiro nas hidrogenases reguladoras de *R. eutropha* e *R. capsulatus*, em estudos em que a isoleucina e a fenilalanina foram substituídas pelas correspondentes valina e leucina conservadas nos enzimas do género *Desulfovibrio*. O enzima mutado tornou-se sensível ao O₂ como esperado^{62,63}. Nos estudos de dinâmica molecular de Teixeira e colaboradores¹⁷, foi testada uma outra mutação em *D. gigas* com base no mesmo princípio. Os dados indicam que a mutação da Val67 para Ala, de volume inferior, tornou o enzima mais permeável e aumentou o número de moléculas que atingem as proximidades do centro activo. No entanto, a substituição da Val77 e da Leu125 da MBHase de *R. eutropha* pelas correspondentes isoleucina e fenilalanina na RHase da mesma espécie obteve mutantes mais sensíveis ao O₂ apesar da diminuição na afinidade para o H₂⁶⁴. Recentemente, foram criados os mutantes V67I/L115P e V67M/L115M, usando a Hase de *D. fructosovorans*, ambos caracterizados estruturalmente por cristalografia de raios X⁶⁵. Nos dois mutantes a velocidade de difusão do CO e do H₂ encontra-se reduzida relativamente ao *wild-type*. No entanto, o mutante com canal mais estreito, o V67I/L115P, não é o que apresenta a menor taxa de difusão. Isto demonstra que não existe necessariamente uma relação directa entre o diâmetro dos canais na estrutura de raios X e velocidade de difusão. Para explicar esta observação, foi sugerido que a difusão seja afectada pela dinâmica da proteína não visível na estrutura de raios X. Quando a sensibilidade destes mutantes para o O₂ foi testada⁶⁶, concluiu-se que a mutação V67I/L115P que pretende mimetizar a RHase, não conferia tolerância, mas a mutação V67M/L115M provou conferir resistência a este inibidor. Os autores atribuem este resultado ao efeito protector das metioninas relativamente a espécies de oxigénio reactivas, no qual se inspiraram, aliás, para construir estes mutantes.

A solução ideal passa por reduzir especificamente o acesso do O₂ ao centro activo ou evitar a reacção entre eles sem comprometer a actividade catalítica.

1.5 Hidrogenase [NiFeSe] de *Desulfovibrio baculatum*

Neste trabalho pretendemos estudar a difusão do H₂ na hidrogenase periplasmática de [NiFeSe] de *Dm. baculatum*. As hidrogenases da subclasse [NiFeSe] apresentam um conjunto de características que as tornam particularmente interessantes para aplicações em sistemas de produção de H₂. São mais eficientes na produção de H₂ do que as Hases padrão e registam menor inibição pelo H₂²⁵. São ainda capazes de funcionar na presença de pequenas quantidades de O₂⁶⁷, e apesar de também serem inibidas por este composto, a sua reactivação é consideravelmente mais rápida do que a observada nas hidrogenases [NiFe]. Não se sabe explicar exactamente a origem desta discrepância de desempenho. As principais modificações são a substituição de uma das cisteínas terminais do centro activo por uma selenocisteína, ou seja, a substituição de um dos átomos de enxofre que coordenam o níquel por um átomo de selénio, e a substituição do centro [3Fe4S] medial por um centro [4Fe4S]¹⁶. Conforme isolados, estes enzimas são activos, e não produzem nenhum sinal de EPR, o que significa que o níquel se encontra no estado de oxidação +2, e que os três centros FeS estão oxidados²⁵. Não apresentam sinal Ni-A e Ni-B, mas são detectados estados equivalentes ao Ni-C e Ni-R, mas a caracterização por FTIR não detecta os estados Ni-SI⁶⁸. O *fold*ing geral da Hase [NiFeSe] de *Dm. baculatum* mantém-se, incluindo os dois principais canais por onde se sugere que circulem o H₂ e o O₂. Como explicado anteriormente, é importante estudar os processos de difusão nesta proteína para compreender em que extensão podem influenciar as suas propriedades. Conhecem-se várias hidrogenases [NiFeSe], mas de entre estas só o enzima periplasmático de *Dm. baculatum* tinha estrutura de raios X publicada, o que foi decisivo na escolha da proteína a usar neste trabalho.

A espécie *Desulfomicrobium baculatum* integra o grupo dos organismos redutores de sulfato. Estes organismos são muito abundantes na natureza e despertam grande interesse tanto no nível mais fundamental como no campo das aplicações. Por um lado, as bactérias redutoras de sulfato (BRS) estão envolvidas em processos de corrosão e em algumas patologias, e por outro têm um enorme potencial para biorremediação. As principais fontes de energia, ou dadores de electrões, destes organismos são o H₂, e os

compostos orgânicos como o piruvato, e o lactato⁷. O metabolismo de H₂ é muito importante nas BRS, de onde provém um grande número das hidrogenases conhecidas⁴. Algumas espécies têm mais do que uma hidrogenase, e de diferentes tipos. Em *Dm. baculatum* conhecem-se três Hases [NiFeSe]: uma periplasmática, uma citoplasmática e uma associada à membrana, mas não se sabe de que forma estão envolvidas no metabolismo⁶⁹.

O metabolismo energético destes organismos que respiram sulfato é pouco compreendido quando comparado com a respiração de nitratos ou a metanogénese⁵. A respiração de sulfato tem sido mais estudada no género *Desulfovibrio*, mas os componentes principais existem também em *Dm. baculatum*⁷⁰. A cadeia respiratória (Figura 10) difere consideravelmente dos demais tipos de respiração. Não existem componentes típicos como o complexo I ou o *bc*₁, e, ao contrário do que acontece em muitos organismos, as reductases terminais estão no citoplasma, pelo que não se encontram associadas à translocação de carga através da membrana. A translocação de carga e conseqüente formação de um gradiente electroquímico é central na conservação de energia nos processos de respiração conhecidos. Nas cadeias de respiração de sulfato ainda não foram identificados componentes que acoplam a translocação de prótons à transferência de electrões. O H₂ é oxidado por uma hidrogenase periplasmática. Os prótons resultantes são libertados para o periplasma e os electrões transferidos para um citocromo *c*₃ do tipo I. Os electrões aceites por este são transferidos para complexos de oxidação-redução associados à membrana (Hmc) que os fazem chegar ao lado periplasmático, tornando-os acessíveis, directa ou indirectamente às reductases terminais. O sulfato tem um potencial de redução muito elevado, o que o torna muito estável. As reductases terminais só actuam sobre ele após ter sido previamente modificado. A activação do sulfato, catalisada pela ATP sulfurilase, consiste na conjugação deste com uma molécula de ATP levando à formação de fosfosulfato de adenosina (APS). A APS reductase actua sobre este libertando sulfito e AMP. A sulfito reductase reduz o sulfito a sulfureto de hidrogénio.

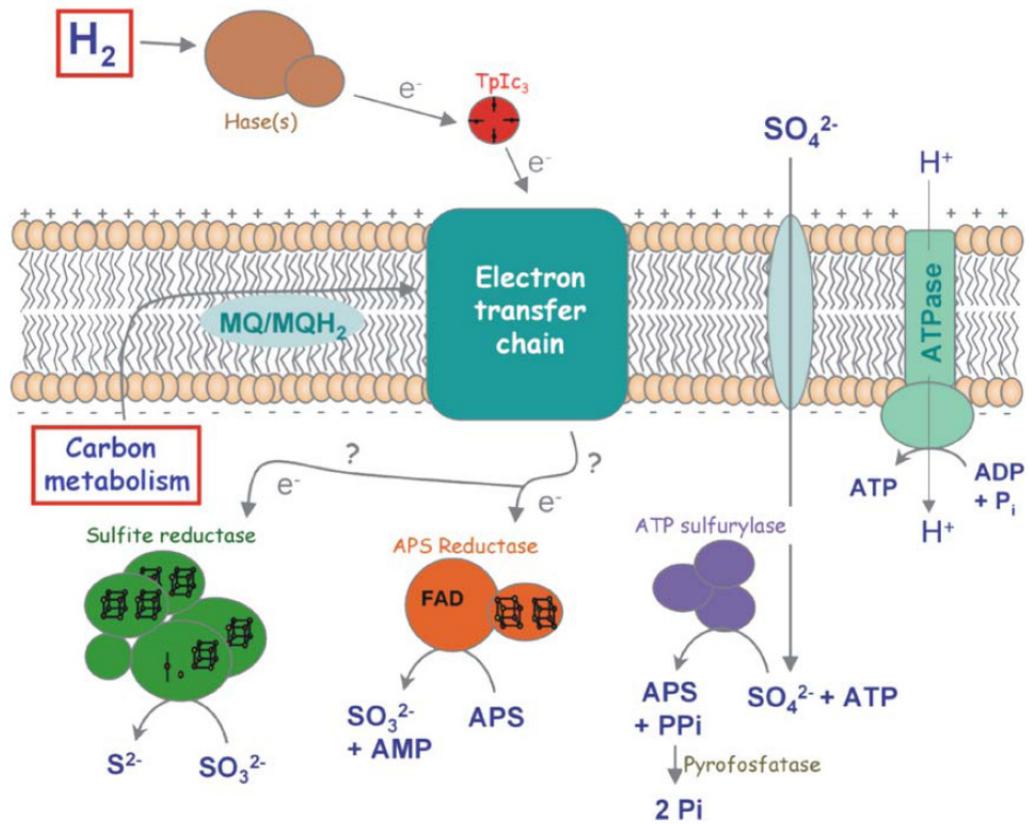


Figura 10 Cadeia respiratória de sulfato nos organismos do género *Desulfovibrio*

2 Modelação molecular

O termo modelação molecular refere-se, de uma forma geral, ao uso de modelos que mimetizem as moléculas com o objectivo de compreender as suas propriedades⁷¹. Um modelo pode ser uma equação matemática ou mesmo um conjunto de esferas de borracha usado para reproduzir o comportamento de líquidos^{71,72}. Antes do advento dos computadores só podiam ser analisados modelos simples com solução analítica⁷², mas a técnicas computacionais permitiram introduzir maior complexidade e realismo nos modelos.

Antes de modelar uma molécula é necessário escolher a complexidade ou nível de detalhe a considerar, o qual deve ser adequado ao problema que queremos estudar⁷³⁻⁷⁵. Os modelos quânticos, onde os electrões são incluídos, são os mais detalhados e os potencialmente mais exactos^{73,74}. No entanto, para a dimensão dos sistemas biomoleculares, como, por exemplo, proteínas, o número graus de liberdade introduzido pela inclusão explícita dos electrões é computacionalmente inabarcável^{71,75,74}, pelo que nestes casos devem ser feitas aproximações. Por exemplo, os graus de liberdade podem restringir-se às posições dos centros de massa dos átomos. Existem modelos ainda mais aproximados, onde os graus de liberdade considerados não são átomos, mas grupos de átomos. A escolha do detalhe é um compromisso entre exactidão e eficiência computacional. Não compensa escolher um modelo muito detalhado se o tempo de cálculo for inviável e a informação aproximada for suficiente. O nível de aproximação do modelo deve ser tal que os graus de liberdade que são essenciais para estimar adequadamente uma quantidade ou propriedade de interesse possam ter amostragem suficiente⁷⁴.

2.1 Mecânica molecular

A mecânica molecular (MM) enquadra-se nos modelos de detalhe atómico e é frequentemente usada para descrever proteínas^{71,76}. Em MM, a molécula é descrita por uma função de energia potencial, a que se dá também o nome de campo de forças, e que descreve as interacções ligantes e não ligantes entre os átomos, representados como massas pontuais^{71,75,74}. As referidas interacções serão descritas em detalhe posteriormente. A energia potencial é dada apenas em função das coordenadas dos núcleos, ignorando os electrões, o que só é possível devido à validade da aproximação de Born-Oppenheimer⁷¹. Embora o campo de forças seja por vezes referido como clássico^{75,74}, este não é exactamente derivado das equações da mecânica clássica⁷⁷. As funções de energia usadas são antes funções empíricas que tentam reproduzir aproximadamente o comportamento do sistema e são usadas em alternativa à mecânica quântica por simplicidade de cálculo^{71,77}.

De uma forma geral, o campo de forças de um sistema molecular com N partículas, o qual inclui termos de energia potencial para as interacções ligantes, e não ligantes como já foi referido, pode ser descrito pela equação 1^{71,75,76}. Nas interacções ligantes incluem-se a vibração da distância de ligação entre dois átomos, a flexão dos ângulos formados por três átomos, os ângulos diedros e os diedros impróprios. Das interacções não ligantes fazem parte as interacções de van der Waals e as interacções electrostáticas de Coulomb.

$$V(r_1, r_2, \dots, r_N) = V^{ligações} + V^{ângulos} + V^{diedros} + V^{impróprios} + V^{van\ der\ Waals} + V^{electrostática} \quad (1)$$

A forma funcional, ou seja o tipo de função que descreve cada tipo interacção, é escolhida não só pela capacidade de mimetizar o comportamento do sistema, mas também pela velocidade de computação e pode variar entre diferentes campos de forças⁷⁵. O campo de forças GROMOS 43A1⁷⁸, usado neste trabalho, inclui as formas funcionais descritas em seguida.

Ligações

A vibração da ligação entre dois átomos (Figura 11) é representada por um potencial do tipo

$$V_l(r_{ij}) = \frac{1}{4} k_{ij}^b (r_{ij}^2 - b_{ij}^2)^2 \quad (2)$$

onde r_{ij} representa a distância ente os dois átomos i e j , b_{ij} representa a distância de equilíbrio e k_{ij}^b representa a constante de força.



Figura 11 Vibração da ligação entre dois átomos

Ângulos

O potencial da flexão dos ângulos (Figura 12) é descrito por um potencial harmónico

$$V_a(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2, \quad (3)$$

onde θ_{ijk} representa o ângulo ente os três átomos i e j , θ_{ijk}^0 representa o ângulo de equilíbrio e k_{ijk}^θ representa a constante de força.

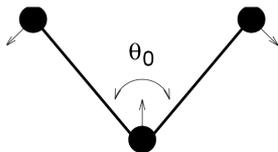


Figura 12 Flexão do ângulo formado por três átomos ligados sequencialmente

Diedros ou ângulos de torção

O potencial de torção dos diedros próprios é sinusoidal, onde os máximos correspondem às conformações em que os átomos na extremidade do diedro estão mais próximos, conformação *cis*, e os mínimos correspondem à conformação onde os átomos da extremidade estão mais afastados, conformação *trans*, ilustrada na Figura 13. Este potencial é dado pela Equação 4, onde k_ϕ representa a constante de força, ϕ representa o ângulo entre os planos (*ijk*) e (*jkl*), e ϕ_s representa o ângulo de equilíbrio.

$$V_d(\phi_{ijk}) = k_\phi(1 + \cos(n\phi - \phi_s)) \quad (4)$$

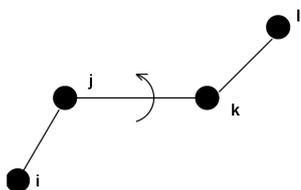


Figura 13 O ângulo diedro é formado pelos planos (*ijk*) e (*jkl*). A imagem representa a conformação *trans*.

Diedros impróprios

Para manter o enantiómero pretendido em carbonos quirais ou para manter um grupo de quatro átomos num determinado plano é usado um diedro impróprio cujo potencial é descrito pela seguinte função

$$V_{di}(\xi_{ijkl}) = \frac{1}{2}k_\xi(\xi_{ijkl} - \xi_0)^2, \quad (5)$$

onde k_ξ representa a constante de força, ξ_{ijkl} representa o ângulo entre os planos (*ijk*) e (*jkl*), e ξ_0 representa o ângulo de equilíbrio

Equação 2

Interações de Lennard-Jones

As interações de van der Waals entre dois átomos *i, j*, separados por uma distância r_{ij} é descrita por um potencial de Lennard-Jones (Equação 2), onde os parâmetros $C_{ij}^{(12)}$ e

$C_{ij}^{(6)}$ dependem dos átomos i, j . O termo $C_{ij}^{(12)}$ reflecte a parte repulsiva da interacção e o termo $C_{ij}^{(6)}$ reflecte a componente atractiva. Para os átomos que distam entre si menos de quatro ligações não são consideradas as interacções não ligantes. Para os átomos que distam entre si três ligações é usado um termo de repulsão $C_{ij}^{(6)}$ menor.

$$V_L(r_{ij}) = \frac{C_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^6} - \frac{C_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} \quad (6)$$

Interacções electrostáticas de Coulomb

As interacções electrostáticas de Coulomb são descritas pela equação 7, onde q_i e q_j representam a carga dos átomos i, j , ϵ_0 representa a permissividade eléctrica no vácuo e ϵ_r a permissividade relativa do meio.

$$V_C(r_{ij}) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{\epsilon_r r_{ij}} \quad (7)$$

Devido a razões técnicas, as interacções não ligantes são tratadas de forma especial nos processos de simulação. O cálculo das interacções não ligantes para todos os pares de átomos do sistema, à excepção daqueles que se encontram separados entre si por menos de quatro ligações, é um processo que consome muito tempo de cálculo^{71,75}. Para aliviar o esforço computacional, para cada átomo i , só são calculadas as interacções de van der Waals e de Coulomb que este estabelece com átomos que se encontram numa zona esférica centrada no átomo i ⁷¹. O raio da referida esfera é designado por *cut-off*. Uma vez que os átomos alteram as suas posições durante a simulação, a lista de átomos que se situam no interior da esfera é actualizada periodicamente. No método *twin-range*⁷³ são definidos dois valores de *cut-off*. As interacções entre o átomo i e os átomos no interior da esfera mais pequena são calculadas usando as novas posições dos átomos em todos os passos da integração. As interacções entre o átomo i as partículas na camada exterior são mantidas constantes durante vários passos de integração, ou seja, só

periodicamente as interações são actualizadas para reflectir as novas posições dos átomos. A influência das interações electrostáticas para além do *cut-off* não pode, no entanto, ser desprezada. Numa das formas de lidar com estas, a que se dá o nome de *reaction field*⁷⁹, considera-se que o meio para além do *cut-off* é um dieléctrico contínuo com uma permissividade ϵ_r e às interações electrostáticas do átomo i é adicionado um termo que representa a sua interacção com o meio para além do *cut-off*.

Restrições dos movimentos dos átomos

À função de energia potencial descrita podem ser adicionados termos para restringir por exemplo, as posições dos átomos⁷¹. Estas restrições são aplicadas com o objectivo de reduzir a mobilidade das partículas a que são aplicadas, e não para as manter fixas numa determinada posição.

2.2 Simulações de dinâmica molecular

A superfície de energia potencial do sistema é complexa^{75,71}. Existem vários métodos para fazer a amostragem do espaço conformacional associado a estas superfícies. Os métodos de minimização de energia são uma das ferramentas usadas na sua análise. No entanto estas superfícies são demasiado complexas e com muitos mínimos locais para que possam ser exploradas por métodos de minimização. Existem outras formas de fazer a amostragem do espaço conformacional, como por exemplo os métodos de Monte Carlo, que exploram a superfície de energia através da geração aleatória de conformações. As simulações de dinâmica molecular (MD) podem ser vistas como um método de amostragem do espaço conformacional, com a particularidade de gerar um conjunto de conformações relacionadas temporalmente entre si⁷¹. Os métodos de MD simulam o movimento dos átomos de um sistema molecular usando as leis da mecânica clássica⁷¹. Esta é a única fase do processo em que a mecânica clássica é usada, não sendo a função de energia potencial clássica. A partir da função de energia potencial V , é possível calcular a força F_i exercida sobre o átomo i (Equação 8). As equações do movimento de Newton dão a relação entre a força e a alteração das posições dos átomos (Equação 9). O resultado final é a trajectória descrita pelos átomos do sistema.

$$F_i = -\frac{\partial V}{\partial r_i} \quad (8)$$

$$\frac{F_i}{m_i} = \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (9)$$

Estas equações são integradas por um método numérico, a escolha do qual tem uma grande influência na estabilidade do sistema e na eficiência das simulações. Uma forma de melhorar a eficiência é aplicar os chamados *constrangimentos* nos movimentos com frequências mais elevadas como as vibrações das ligações ou mesmo a flexão dos ângulos^{71,74}. O intervalo de tempo mínimo que pode ser usado na integração está limitado pelos movimentos de maior frequência. Eliminando estes movimentos é possível aumentar o intervalo de tempo usado na integração das equações de Newton, reduzindo assim o custo computacional. Existem vários algoritmos para implementar estes *constrangimentos*, isto é, para manter as distâncias de ligação. Neste trabalho foi usado o LINCS⁸⁰, um dos métodos mais rápidos, e mais exactos para este fim. Numa descrição breve deste algoritmo, as novas posições são primeiro calculadas por um passo de integração normal e as distâncias de ligação iniciais são depois restabelecidas antes do próximo passo de integração.

Em simulações de dinâmica molecular podem ficar presas em determinadas zonas da superfície de energia potencial se a barreira energética para sair dessa zona for muito alta. Para aumentar a eficiência da amostragem é frequente fazerem-se réplicas das simulações. As diferentes réplicas são obtidas alterando as velocidades que, no início de cada simulação, são atribuídas aleatoriamente a cada átomo com base numa distribuição de Boltzmann à temperatura em questão.

2.2.1 Sistema simulado

O sistema simulado é normalmente limitado por uma caixa de simulação, a qual, contém a molécula de interesse e moléculas de solvente, no caso de ser usado solvente explícito. O solvente pode não estar representado explicitamente, e o seu efeito ser contabilizado na função de energia potencial. As simulações também podem ser efectuadas em vácuo. A quantidade de átomos nos sistemas simulados, cerca de 10^5 ou 10^6 átomos é significativamente mais pequena que o número de Avogadro⁷⁵. Nestas dimensões microscópicas, as superfícies na fronteira do sistema têm uma enorme influência nos resultados⁷¹. Para minimizar estes efeitos, usam-se condições periódicas de fronteira (Figura 14). As condições periódicas de fronteira são uma abstracção que supõem que o sistema está rodeado por cópias de si próprio. Nesta abstracção, se uma partícula sair da caixa de simulação, volta a entrar no lado oposto. Os efeitos do contacto com o exterior são evitados, mas à custa da introdução de artefactos de periodicidade⁷⁵. O raio de *cut-off* das interações não ligantes é escolhido de modo a que cada partícula só interaja com uma das suas imagens criadas pelas condições periódicas de fronteira. No caso da simulação de proteínas com solvente explícito, esta regra vai mais longe: uma molécula de solvente não deve sentir o efeito da proteína mais do que uma vez⁷¹.

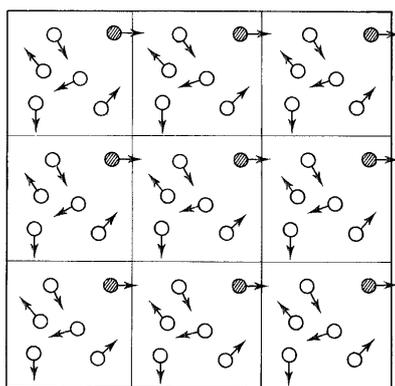


Figura 14 Condições periódicas de fronteira

2.2.2 Simulações a temperatura e pressão constantes

Os processos que se pretende modelar ocorrem normalmente em sistemas abertos a temperatura e pressão constantes. Nos sistemas simulados utilizando apenas as equações descritas anteriormente a energia é mantida constante. No início da simulação a temperatura é definida pelas velocidades atribuídas aos átomos. Durante as simulações a temperatura varia devido à interconversão da energia potencial em energia cinética. Existem, no entanto, vários métodos que permitem mimetizar condições de temperatura e pressão constantes⁷³. Neste trabalho são usados os algoritmos de *weak-coupling* de Berendsen⁸¹ para manter a temperatura e pressão constantes. O princípio é ajustar as velocidades do átomos, que estão relacionadas com a energia e temperatura cinética segundo a equação 10, onde k_B é a constante de Boltzmann, m_i e v_i a massa e a velocidade do átomo i , e N_{df} é o número total de graus de liberdade.

$$E_{cinética}(t) = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} m_i v_i^2(t) = \frac{1}{2} N_{df} k_B T(t) \quad (10)$$

A temperatura T do sistema, obtida a cada passo integração das equações de Newton, é forçada a tender para a temperatura T_0 , a que se pretende que o sistema se mantenha. Esta tendência é efectuada com uma cinética de primeira ordem, dada pela equação

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau}, \quad (11)$$

onde a constante τ é designada por constante de acoplamento. Resolvendo esta equação, o factor de escalamento das velocidades λ , a aplicar a cada passo de integração (Δt) relaciona-se com a constante de acoplamento segundo a equação

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\Delta t}{\tau} \left(\frac{T_0}{T} - 1 \right). \quad (12)$$

O *weak-coupling* de Berendsen para a pressão segue um princípio semelhante. Neste caso a pressão é mantida constante por alteração do volume do sistema. Para o efeito, as coordenadas dos átomos são corrigidas por um factor χ , dado pela equação

$$\chi^3 = 1 - (\beta_T) \frac{\Delta t}{\tau_p} (P_0 - P), \quad (13)$$

onde $\beta_T = -(1/V)\partial V/\partial P$, de modo a que a pressão P tenda para o valor P_0 pretendido com uma cinética de primeira ordem

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{\tau_p} (P_0 - P). \quad (14)$$

3 Métodos

Preparação da estrutura

Como ponte de partida para as simulações foi usada estrutura de raios X da hidrogenase [NiFeSe] de *Dm.baculatus*¹⁶ cujo código de identificação no repositório *Protein Data Bank* é 1CC1. Esta estrutura foi obtida a partir de uma forma reduzida da hidrogenase e com uma resolução de 2.15Å. Os três resíduos e as várias cadeias laterais em falta na estrutura foram modeladas com o software de modelação MODELLER⁸². As águas na estrutura de raios X foram incluídas nas simulações.

Escolha do estado de oxidação da proteína

Durante o ciclo catalítico o centro activo e os centros FeS passam por vários estados de oxidação⁸. Para calcular as cargas parciais foi necessário escolher o estado de oxidação em que o enzima seria simulado. Foi escolhido o estado de oxidação em que o enzima se encontra, quando isolado, o qual é diamagnético²⁵ e tem capacidade de reagir com o H₂. Neste estado o ferro e o níquel têm carga +2 e *spin* S=0. Os três centros [4Fe4S] foram simulados no estado oxidado com carga global +2 e *spin*=0²⁵.

Parametrização das cargas parciais dos centros

As cargas de centro [NiFeSe], do centro [4Fe4S] médio e do centro de magnésio foram parametrizadas neste trabalho. Para os centros [4Fe4S] distal e proximal foram usados os parâmetros determinados no trabalho de *Teixeira et al.*¹⁷. Por razões computacionais, as estruturas dos centros usadas nestes cálculos foram retiradas da estrutura cristalográfica sem optimização da geometria. No caso dos centros [NiFeSe] e FeS as cadeias laterais das cisteínas e da histidina até ao carbono-β inclusive foram incluídas nos cálculos. No centro de magnésio foram incluídas as três moléculas de água que coordenam este metal, as cadeias laterais da histidina e do glutamato até ao carbono-β, o carbono e o oxigénio do carbonilo da isoleucina, assim como o carbono-α desta última, e o carbono-α, o azoto, e correspondente protão da valina que precede a isoleucina. Os parâmetros ligantes foram retirados ou adaptados do campo de forças GROMOS

43A1⁷⁸. O software GAUSSIAN 03⁸³ foi usado para calcular o potencial electrostático quântico no espaço, sendo as cargas parciais nos átomos optimizadas para reflectir este potencial utilizando o método RESP. Os cálculos quânticos foram feitos com o funcional híbrido B3LYP e a base 6-31G(d) para os átomos orgânicos. Para os metais foi utilizada a base 6-31G(2df). O centro activo foi tratado como diamagnético com Ni(II) e Fe(II) e com uma carga total de -2^{84,85} (cargas parciais finais em anexo). Para os três centros [4Fe4S] foi usada uma carga total de -2 e *spin*=0²⁵, e para o centro de magnésio uma carga +1. Os parâmetros de Lennard-Jones para o ferro, para o níquel e para o selénio foram retirados do campo de forças *Universal Force Field*⁸⁶.

Parametrização de H₂

O modelo de H₂ usado foi criado por Hunter *et al.*⁸⁷ Neste modelo, o H₂ é composto por três partículas dispostas linearmente. Apenas as duas partículas da ponta têm massa e só a partícula central tem parâmetros de Lennard-Jones. De forma a simular o quadrupólo a partícula central tem carga -0.950 e as outras duas têm carga 0.475 perfazendo uma carga total de zero. A distância de ligação é de 0.7Å.

Estados de protonação dos grupos ionizáveis da proteína

Para estabelecer o estado de protonação dos resíduos ionizáveis foi simulada a sua curva de titulação na proteína usando métodos teóricos. O equilíbrio ácido-base foi simulado usando métodos de Poisson-Boltzmann (PB) e Monte Carlo (MC)^{88,89}. Os cálculos de PB foram efectuados com o programa MEAD^{90,91} v2.2.0 usando as cargas calculadas nos centros metálicas e as cargas do campo de forças GROMOS 43A1⁹² nos restantes. Nos cálculos de PB foi usada uma grelha inicial de 100x100x100Å e uma constante dieléctrica de 20 para a proteína e 80 para o solvente^{93,88,89}. A amostragem dos estados de protonação pelo método de MC foi efectuada com o programa PETIT^{94,88} a pH 7.0. Os terminais amina não foram titulados devido aos resíduos em falta no princípio de cada subunidade.

Simulações de dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular foram efectuadas com o programa GROMACS versão 4.0.4^{95,96}. Foi usado o campo de forças GROMOS 43A1^{97,78} modificado para incluir a parametrização dos centros metálicos. A proteína foi solvatada em água numa caixa de simulação dodecaédrica cujas paredes distam da proteína pelo menos 8Å. Para a água foi usado o modelo SPC⁹⁸. 100 moléculas de H₂ foram colocadas na caixa fora da proteína. Esta concentração é muito superior à solubilidade do H₂ em água, mas é necessária para uma amostragem suficiente e parece não afectar as propriedades estruturais da proteína. As moléculas de água inseridas pelo programa GROMACS nos canais detectados na estrutura de raios X foram eliminadas, para evitar que estas obstruíssem a passagem das moléculas de H₂. O sistema final tinha 18563 moléculas de água e um total de 63552 átomos.

A energia do sistema foi minimizada com o método *steepest-descent*, para optimização das posições dos átomos de hidrogénio. Foi usada uma constante de força de 10⁵ kJ/(mol nm²) na restrição das posições dos restantes átomos.

As simulações de dinâmica molecular foram efectuadas com acoplamento a um banho de temperatura⁸¹ de 300K, com acoplamento de temperatura separados para o solvente, para o H₂ e para a proteína, todos com uma constante de acoplamento de 0.1ps. As vibrações de todas as ligações foram restringidas através do algoritmo LINCS⁸⁰. As equações de movimento foram integradas com um intervalo de tempo de 2fs. As interacções não ligantes foram tratadas com um método *twin-range*⁷³, usando *cut-off's* de 8 e 14Å, actualizado a cada 5 passos. As forças electrostáticas truncadas foram corrigidas com *reaction-field*⁷⁹, usando uma constante dieléctrica de 54⁹⁹, a constante dieléctrica da água SPC nestas circunstâncias¹⁰⁰.

A inicialização de cada simulação de MD foi feita em três passos. No primeiro passo, com 50ps, as posições de todos os átomos da proteína, à excepção dos átomos de hidrogénio, estavam restringidas com uma constante de força de 105kJ/(mol nm²). As velocidades iniciais foram retiradas de uma distribuição de Boltzmann a 300K. Foi usada uma constante de acoplamento de temperatura de 0.021ps e não foi usado acoplamento de pressão. No segundo passo, também com 50ps, estavam restringidas as posições dos mesmos átomos. Foi usada uma constante de acoplamento de temperatura de 0.021ps e uma constante de acoplamento de pressão de 0.5ps. No terceiro passo, com

a mesma duração, só as posições dos carbonos- α foram restringidas. Foi mantida a constante de acoplamento de pressão do passo anterior. Para a temperatura foi usada uma constante de acoplamento de 0.1ps. Depois desta inicialização todas as simulações foram executadas sem restrições nas posições dos átomos. As conformações para análise foram guardadas a cada picosegundo. Foram simuladas dez réplicas com H₂ e um réplica de controlo sem H₂.

4 Resultados

4.1 Estabilidade do modelo de simulação

A viabilidade do modelo construído para estudar a difusão de H₂ na Hase de *Dm. baculatum* deve ser averiguada. Neste modelo existem dois factores que requerem especial atenção. É necessário analisar em particular a estabilidade dos centros metálicos parametrizados no presente trabalho, para além da análise geral da proteína. E é ainda necessário garantir que a quantidade extremamente elevada de H₂, cerca de 370 vezes superior à solubilidade em água, não afecta a estrutura e dinâmicas normais da proteína. Para o efeito foi construída uma réplica de controlo sem H₂.

As simulações de dinâmica molecular usam como ponto de partida a estrutura de raios X que representa uma média espacial e temporal das conformações num cristal. No período inicial das simulações, designado equilíbrio ou relaxação, as conformações da proteína vão-se alterar de modo a adaptar-se à solução aquosa até se atingir um equilíbrio, fase em que a média das conformações não varia muito ao longo do tempo. Para avaliar a estabilidade dos centros metálicos e para poder comparar o comportamento da proteína na presença e ausência de H₂ é necessário que as propriedades estruturais estejam em equilíbrio. Para, definir o período em que as simulações atingiram o equilíbrio é comum usar-se o desvio quadrado médio (RMSD) relativo à estrutura de raios X. O RMSD é uma medida do afastamento de uma dada estrutura em relação a uma outra estrutura de referência e quando calculado para várias conformações de uma proteína ao longo do tempo é dado pela equação

$$RMSD(t) = \left[\frac{1}{M} \sum m_i \|r_i(t) - r_{i_{ref}}\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (15)$$

Onde M representa a massa total do sistema, $r_i(t)$, as coordenadas da partícula i no instante t e $r_{i_{ref}}$ as coordenadas na partícula i na estrutura de referência e m_i a massa da partícula i .

O gráficos do RMSD dos carbonos- α relativo à estrutura de raios X calculado para cada uma das réplicas, incluindo a réplica de controlo, estão representados na Figura 15, onde se inclui também uma média das réplicas com H₂. Embora em algumas das réplicas seja claro que o RMSD tenha estabilizado, existem várias para as quais esta propriedade parece estável. Considerou-se que as propriedades estruturais do nosso sistema estão estáveis a partir dos 10ns.

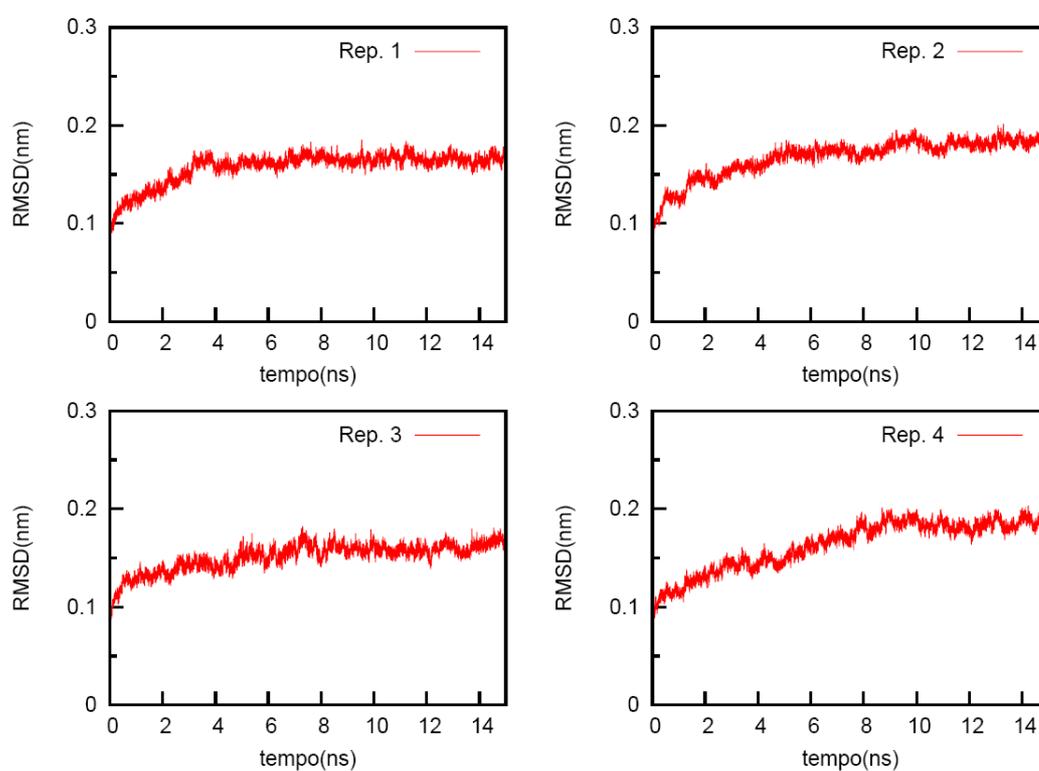


Figura 15 RMSD dos carbonos- α relativamente à estrutura de raios X.

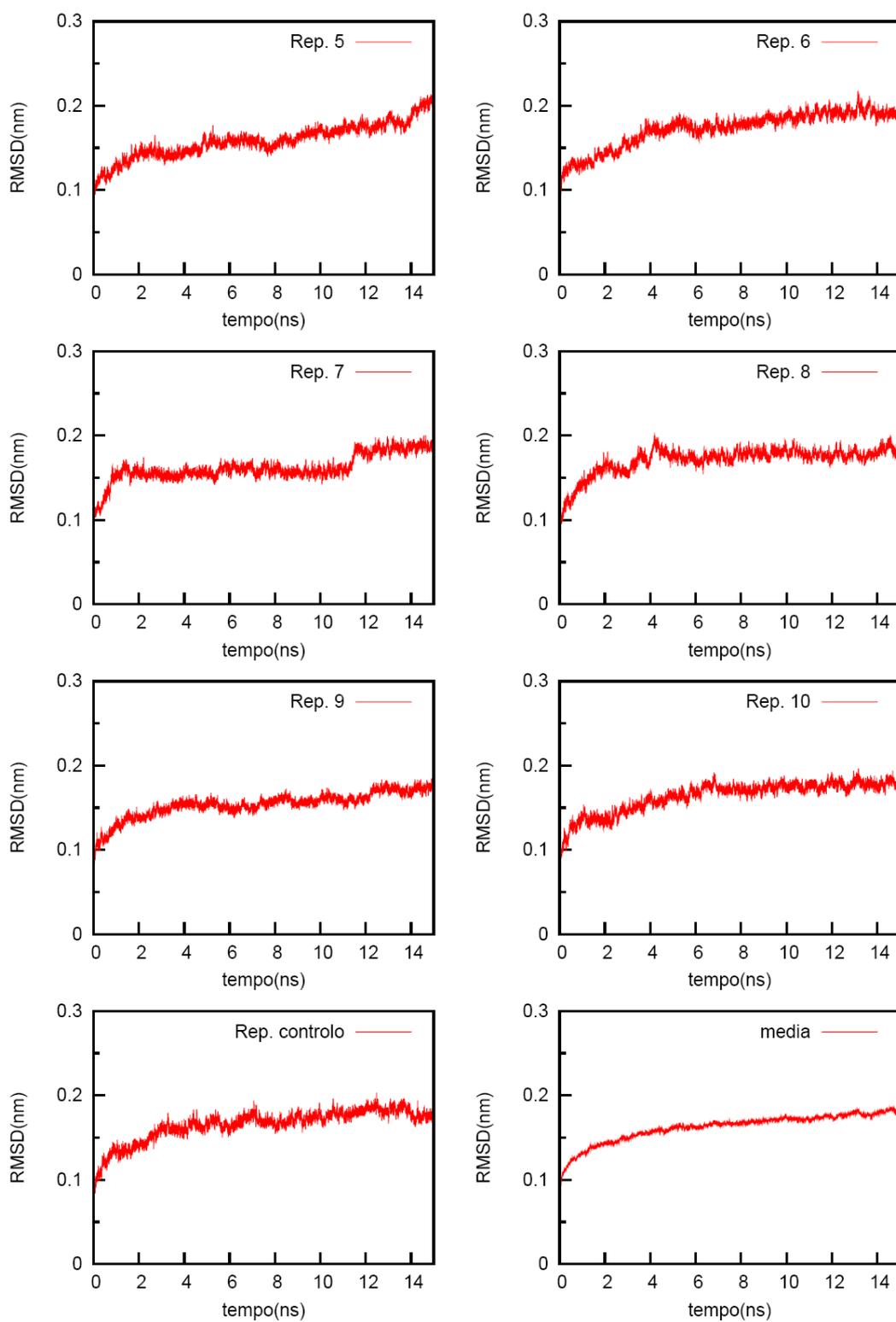


Figura 15 Continuação.

Tendo definido a zona estável vamos analisar o comportamento dos centros metálicos neste intervalo de tempo. O RMSD de cada centro relativamente à sua estrutura de raios X é uma forma de medir os desvios relativos à conformação original de cada centro. No gráfico da Figura 16 é possível verificar que o RMSD dos cinco centros metálicos é relativamente pequeno quando comparado com o desvio dos carbonos- α . O centro de magnésio é o que se desviou mais relativamente à estrutura de raios X, o que seria expectável, tendo em conta que é coordenado por três águas, o que implica maior flexibilidade. O centro [NiFe] e o centro distal são os que mantiveram uma estrutura mais semelhante à estrutura de raios X. O centro distal é o que mostra mais oscilações na estrutura o que se deve provavelmente ao facto de estar numa zona mais exterior da proteína e como tal mais flexível. No entanto, a partir dos 10ns a conformação de cada centro apresenta-se estável. A Figura 17 mostra que os centros mantiveram as suas posições relativas na proteína. Os centros mais exteriores são os que mais se desviam da sua posição original.

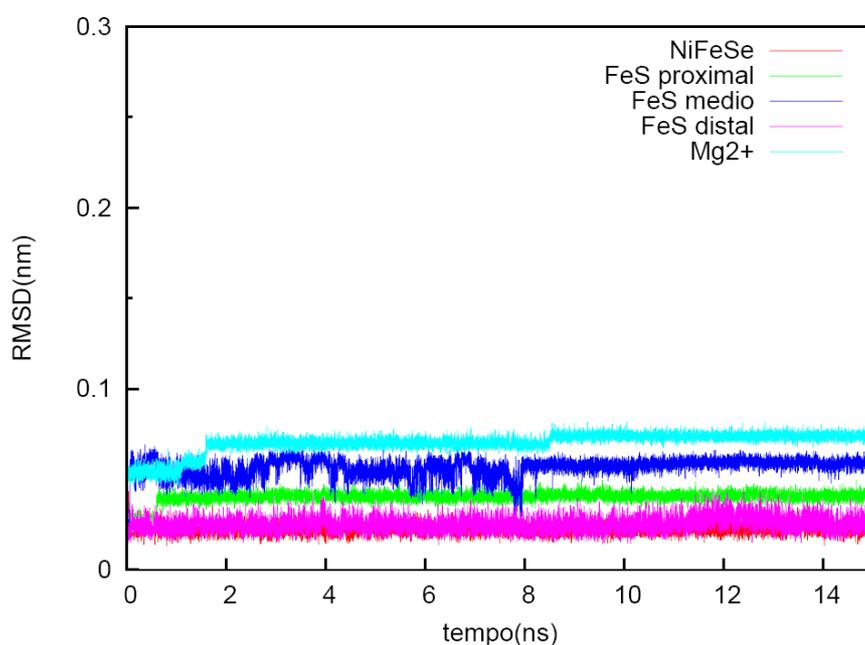


Figura 16 RMSD dos centros [NiFeSe], [FeS] proximal, [FeS] distal e centro de magnésio relativamente à estrutura sua estrutura de raios X.

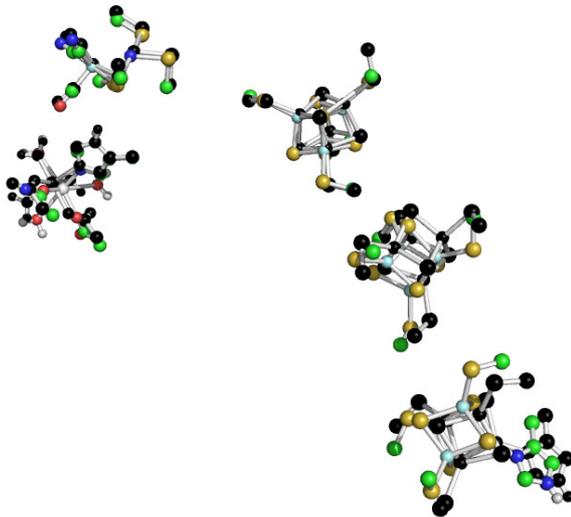


Figura 17 Comparação das posições dos centros metálicos na estrutura média da réplica de controlo e na estrutura de raios X. Os átomos da estrutura de raios X estão representados a preto.

O outro aspecto do modelo que merece especial atenção é o efeito da concentração de H₂ usada sobre as propriedades estruturais da proteína. Os desvios médios em relação à estrutura de raios X são semelhantes nas réplicas com H₂ e na réplica de controlo, mas é necessário analisar se a origem das divergências estruturais é semelhante em ambos os casos. Para o efeito foi calculado o RMSD das réplicas com H₂ relativamente à estrutura média da réplica de controlo. As estruturas médias incluem apenas os últimos 5ns, o período considerado estável. O gráfico da Figura 18 mostra que existem zonas divergentes nas estruturas. No entanto, estas zonas correspondem às zonas onde as flutuações na estrutura da proteína são maiores (Figura 19), ou seja, as divergências devem-se apenas às flutuações e não a um efeito específico do H₂. Quando se comparam as estruturas médias com e sem H₂ não há diferenças significativas (Figura 19 B e C).

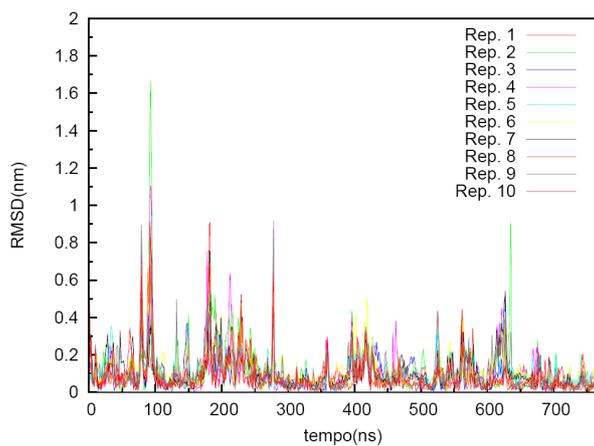


Figura 18 RMSD dos carabonos- α das réplicas de controlo relativamente á estrutura média da réplica de controlo

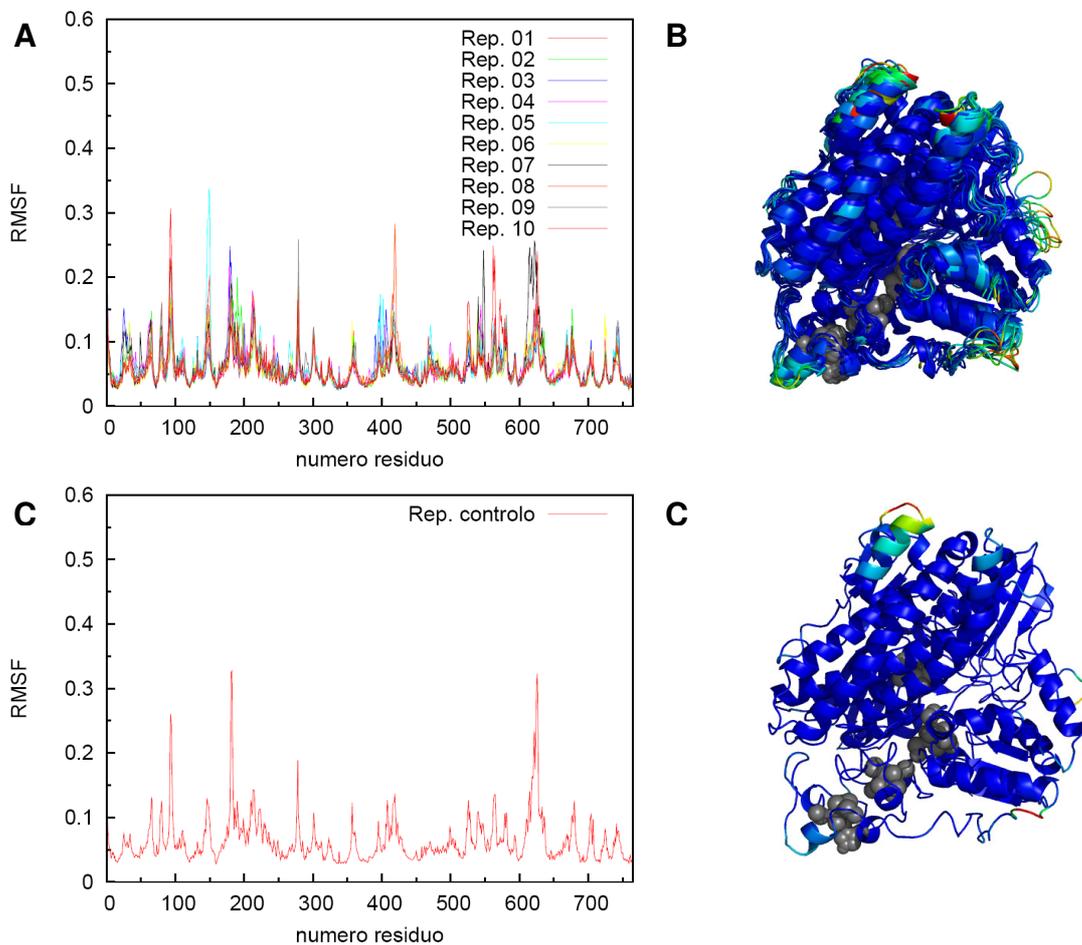


Figura 19 Flutuações da estrutura da proteína nas réplicas com H₂ (A) e na réplica de controlo (C) calculadas para cada resíduo. A figuras à direita ilustram as estruturas médias das réplicas com H₂ (B) e da réplica de controlo (D). O código de cores usada na estrutura reflecte o valor das flutuações: o azul representa os valores mais baixos e o vermelho os valores mais altos.

4.2 Quantidade de H₂ interiorizado

Numa primeira abordagem ao estudo da difusão do H₂, foi caracterizada a forma como as moléculas deste gás, inicialmente colocadas no exterior da proteína, se distribuem entre o interior da proteína e o solvente, neste caso, água.

Para quantificar as moléculas interiorizadas é necessário um critério objectivo que permita fazer a distinção entre as moléculas de H₂ no exterior e no interior da proteína. Neste trabalho, foi usado o critério do estudo anterior¹⁷ que caracterizou a difusão do H₂ na Hase de *D. gigas*. Segundo este, é calculada uma função de internalização para cada molécula de H₂. A função de internalização é dada pela equação 16, onde r_i representa a distância entre o centro geométrico da molécula de H₂ e o átomo i da proteína. A molécula é considerada no interior se $f > f_{\max}$ e no exterior se $f < f_{\min}$, onde $f_{\min}=16.5$ e $f_{\max}=21.5$. Quando, para uma molécula de H₂, $f_{\min} < f < f_{\max}$, a função de internalização é calculada para doze pontos criados em torno da molécula de H₂. Os pontos são colocados ao longo dos eixos x , y , z , seis dos quais a 3Å da molécula de H₂ e os restantes seis a 6Å. Se pelo menos sete dos pontos tiverem $f > f_{\max}$ a molécula é considerada no interior.

$$f = \sum_{i=1}^N e^{(-r_i/20)} \quad (16)$$

Equação 3

Fazendo uso deste critério, obteve-se o gráfico da Figura 20, o qual ilustra a evolução da quantidade de H₂ no interior da Hase ao longo dos 15ns de simulação. Os dados podem ser comparados com os anteriormente obtidos para *Desulfovibrio gigas*¹⁷.

As simulações de *Dm. baculatum* foram prolongadas durante mais 6ns relativamente às simulações de *D. gigas*, porque aos 9ns nem o RMSD nem a quantidade de H₂ estava

estabilizada na proteína de *Dm. baculatum*, condições necessárias para proceder à análise dos resultados.

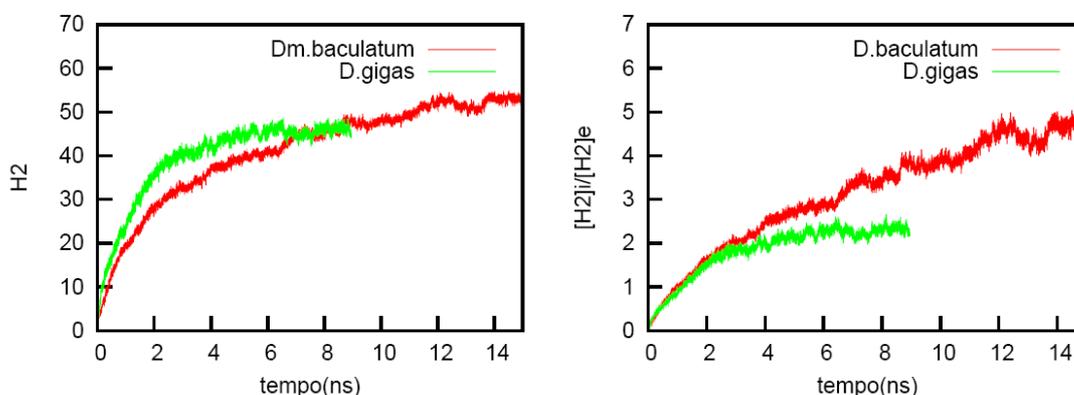


Figura 20 Evolução da quantidade de H₂ internalizada ao longo da simulação, no gráfico da esquerda, e razão entre as concentrações de H₂ no interior e exterior da proteína, no gráfico da direita.

Para ambas as proteínas, o número de moléculas de H₂ no interior, que no instante inicial é zero, aumenta rapidamente numa primeira fase e depois de forma progressivamente mais lenta até atingir um patamar em que estabiliza. A estabilização ocorreu mais rapidamente em *D. gigas*. O patamar é menos evidente em *Dm. baculatum*, que em média mostra uma tendência geral de subida, embora em muitas das réplicas já tenha estabilizado. Consideramos que a zona em que a quantidade de H₂ internalizada se encontra estável são os últimos 4ns em *D. gigas* e os últimos 5ns em *Dm. baculatum*. Na presente amostragem o número de moléculas no interior é em média 55.2 para *Dm. baculatum* e 44.6 para *D. gigas*.

Para discutir estes resultados é útil ter presente que a hidrogenase de *D. gigas* com um volume médio de 164.0nm³, está numa caixa de simulação de 598.9nm³, enquanto que a hidrogenase de *D. baculatum* com um volume de 132.0nm³ está numa caixa de 676.2nm³. O número de moléculas de H₂ colocado na caixa é igual para ambas as proteínas, o que perfaz uma concentração global de 0.1669 moléculas/nm³, no caso de

D. gigas e de 0.1478 moléculas/nm³ para *Dm. baculatum*. Em suma, a hidrogenase de *Dm. baculatum* com um volume menor, está numa caixa de simulação maior e exposta a uma concentração de H₂ inferior. Estas diferenças podem ser a razão que torna o processo de estabilização mais demorado em *Dm. baculatum*. A estabilização da RMSD também foi mais demorada em *Dm. baculatum*, e esse factor também poderá ter alguma influência.

O valor máximo de H₂ observado é superior em *Dm. baculatum*. Uma vez que as concentrações de H₂ ultrapassam largamente a solubilidade do H₂ em água, é bastante provável que a proteína esteja saturada, e que estes valores representem a quantidade máxima de H₂ que a proteína pode acomodar nas nossas simulações, o que não é exactamente extrapolável para a realidade. Estes dados sugerem que a proteína de *Dm. baculatum* tem maior capacidade para acomodar moléculas de H₂ no seu interior.

Sabemos que, das cem moléculas iniciais, entre quarenta a cinquenta está no interior da proteína, mas para uma imagem mais clara da distribuição entre a água e o interior da proteína, podemos ainda calcular a razão entre as concentrações de H₂ nas duas fases. Os resultados mostram que há uma clara preferência do H₂ pelo interior da proteína relativamente ao meio aquoso em ambos os casos. Os dados parecem indicar que esta preferência é mais acentuada no caso de *Dm. baculatum*.

Tabela 1 Volume da caixa, volume da proteína e concentração de H₂ nas simulações das Hases de *D. gigas* e *Dm. baculatum*

	<i>D. gigas</i>	<i>Dm. baculatum</i>
Volume médio da caixa (nm ³)	598.7	676.2
Volume médio da proteína (nm ³)	164.0	132.0
Moléculas de H ₂ (nm ³)	100	100
Concentração de H ₂ (moléculas/nm ³)	0.1669	0.1478

Em conclusão, confirma-se uma preferência do H₂ pelo interior das hidrogenases relativamente ao meio aquoso e a capacidade para acolher H₂ de ambas as proteínas parece semelhante, embora ligeiramente superior em *Dm. baculatum*.

4.3 Distribuição do H₂ no interior da proteína

Em seguida, quisemos estudar como é que as moléculas de H₂ se distribuem no interior da Hase. Numa primeira fase analisamos a distribuição das moléculas de H₂ internalizadas relativamente a cada um dos metais do centro activo, nomeadamente o níquel e o ferro. Para o efeito, calculamos a função de distribuição radial das moléculas de H₂ relativamente aos dois átomos referidos. De uma forma geral, a função de distribuição radial $g(r)$ é o factor que dá o desvio entre a densidade média local de uma partícula à distância r e a densidade global¹⁰¹. Neste trabalho, a função de distribuição radial foi calculada de uma forma discreta, segundo a equação

$$g(r) = \frac{n_r}{\rho(V_r)}, \quad (17)$$

onde n é o número de moléculas de H₂ numa camada esférica centrada no níquel com diâmetro exterior r e uma espessura $\Delta r=0.01\text{nm}$, ρ representa a densidade total do H₂ na caixa de simulação e V_r é o volume da camada, o qual é dado pela expressão

$$V_r = \frac{4\pi(r^3 - (r - \Delta r)^3)}{3}. \quad (18)$$

As funções de distribuição radial relativas aos dois metais foram calculadas para *Dm. baculatum* e *D. gigas* e estão representadas no gráfico da Figura 21. As funções foram calculadas para o intervalo em que a quantidade de H₂ internalizado foi considerada estável. Este pedido corresponde aos últimos 4ns em *D. gigas* e últimos 5ns em *Dm. baculatum*.

Mais uma vez, os resultados da Figura 21 confirmam que a concentração de moléculas de H₂ na proteína é superior à sua concentração no solvente. O mais surpreendente foi constatar que a quantidade de H₂ não diminui necessariamente com a proximidade ao centro. Em ambas as proteínas verificam-se picos de densidade de H₂ próximos quer do

ferro, quer do níquel. As moléculas de H₂ aproximam-se até cerca de 0.2nm do níquel e 0.3nm do ferro. E não só se aproximam a estas distâncias, como apresentam inclusive picos de densidade a cerca de 0.3nm do níquel tanto na Hase de *Dm. baculatum* com na Hase de *D. gigas*. No entanto, em *D. gigas* não se observa um pico junto ao ferro. O dados indicam que as moléculas se aproximam mais do níquel e que a acumulação é maior junto a este metal, o que parece sugerir que o níquel esteja mais exposto ao H₂ que o ferro. Estas observações apoiam os dados que consideram que o níquel liga o H₂^{53,54}.

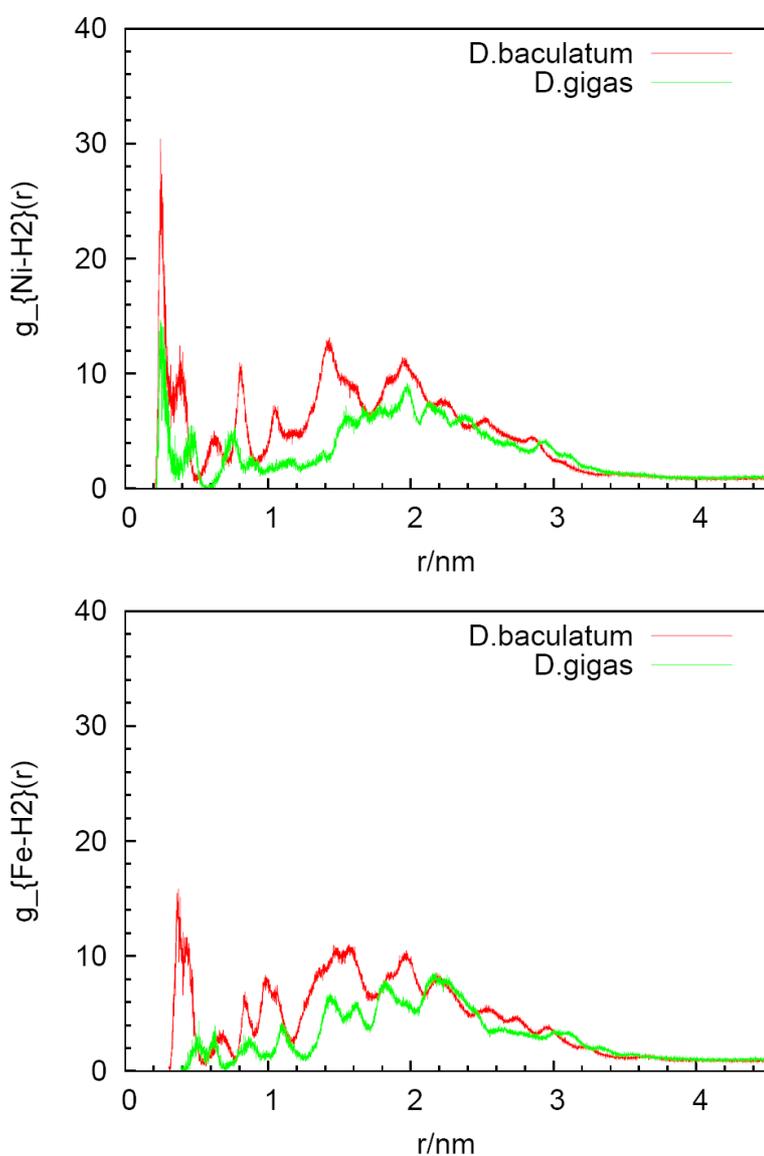


Figura 21 Função de distribuição radial do H₂ em relação ao níquel (em cima) e ao ferro (em baixo) para a Hase de *Dm. baculatum* e para a Hase de *D. gigas*.

Concentrando a análise na função de distribuição radial do níquel é possível observar que, para na zona superficial de ambas as proteínas, ou seja, a zona que fica entre 2 a 1.5nm, a densidade do H₂ é elevada. A densidade a cerca de 0.3nm do níquel é ainda mais elevada que na zona superficial. Entre a região mais superficial e a zona em torno do centro a densidade baixa consideravelmente. Estes resultados são muito interessantes, pois mostram uma certa capacidade da proteína para acumular H₂ numa zona em torno do centro, bastante acessível aos metais.

No trabalho de Teixeira e colaboradores¹⁷, foi sugerido que o tempo de simulação podia não ser suficiente para que as moléculas de H₂ pudessem atingir as proximidades do centro. Para averiguar se as quantidades de H₂ nas imediações do centro se encontram estáveis no período considerado nas análises, representou-se a evolução da quantidade de H₂ nas proximidades do centro ao longo da simulação sob a forma de histogramas. Os histogramas da Figura 22, representam a quantidade de H₂ a uma distância do níquel inferior a 0.4nm em intervalos de 0.5ns. Os dados não sugerem que a quantidade de H₂ esteja a aumentar durante os últimos 5ns das simulações de *Dm. baculatum*, ou nos últimos 4ns de *D. gigas*.

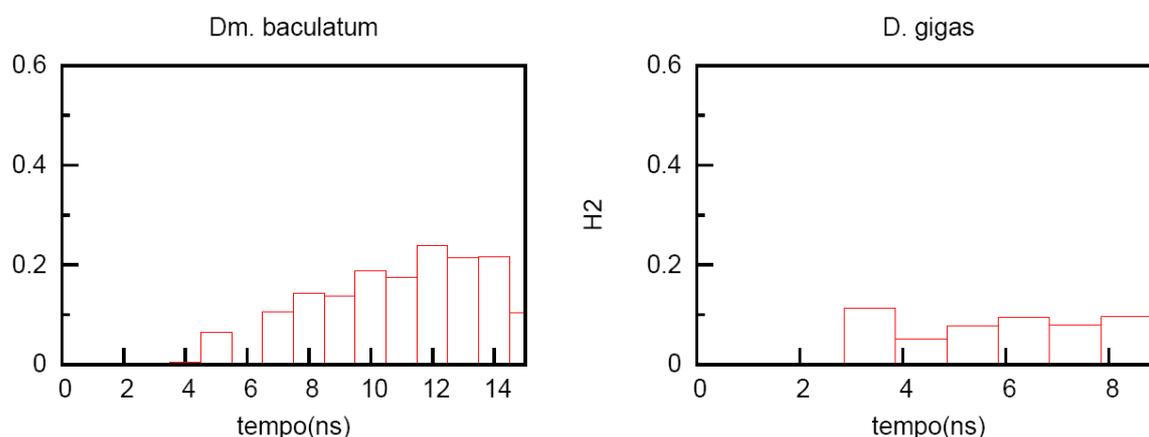


Figura 22 Evolução da quantidade de H₂ que se encontra a uma distância de 0.4nm do centro activo ao longo dos 15ns de simulação para *Dm. baculatum* e dos 9ns de simulação para *D. gigas*.

A análise das Figuras 21 e 22, sugere que a hidrogenase *Dm. baculatum* concentra mais o H₂ em zonas próximas do centro activo, nomeadamente nas proximidades do níquel.

4.4 Canais e cavidades para percolação de H₂

A análise anterior caracteriza a distribuição do H₂ relativamente a uma só dimensão – a distância a cada um dos metais do centro activo. No entanto, a distribuição do H₂ não é isotrópica em torno no níquel ou do ferro. Para identificar tridimensionalmente quais as zonas da proteína mais povoadas por moléculas de H₂ foram calculados mapas de densidade de probabilidade¹⁰². Os dados resultantes podem ser comparados com as estruturas de raios X, de modo a averiguar se os canais nestas descritos coincidem com as zonas onde há maior probabilidade de encontrar H₂. A literatura^{9,15} sugere que a rede composta de canais hidrofóbicos, detectada nas estruturas de raios X, com a forma da letra N, seja usada pelo H₂ para aceder ao centro activo. Distinguem-se três canais, o A, o B e C, identificados na Figura 23 A. Estes canais estão conservados nas estruturas de várias Hases, incluindo *D. gigas*. O canal A assinalado na Figura 23 A parece menos conservado em *Dm. baculatum*. Segundo os estudo de Teixeira et al.¹⁷, em *D. gigas*, as zonas onde a probabilidade de encontrar H₂ é maior coincidem com os referidos canais. Os mapas de densidade de probabilidade de *Dm. baculatum* (Figura 23 B e C) mostram pequenas manchas de densidade um pouco por toda a superfície da proteína, tal como a proteína de *D. gigas*. São também visíveis troços de densidade que ligam o centro à superfície que coincidem aproximadamente com os três canais, inclusive com a zona do canal A. Para além das zonas que coincidem com os canais da estrutura cristalográfica, observa-se ainda outra zona que faz a ligação entre o centro e a superfície, num plano aproximadamente perpendicular ao dos canais (Figura 23 C). A densidade em *Dm. baculatum* parece aumentada de um modo geral. Existem mais manchas de densidade de probabilidade junto do centro, o que parece estar de acordo com o observado na função de distribuição radial. A diferença entre as duas proteínas é mais acentuada na zona do canal C, onde a densidade de probabilidade parece bastante aumentada em *Dm. baculatum* quando comparadas com *D. gigas*.

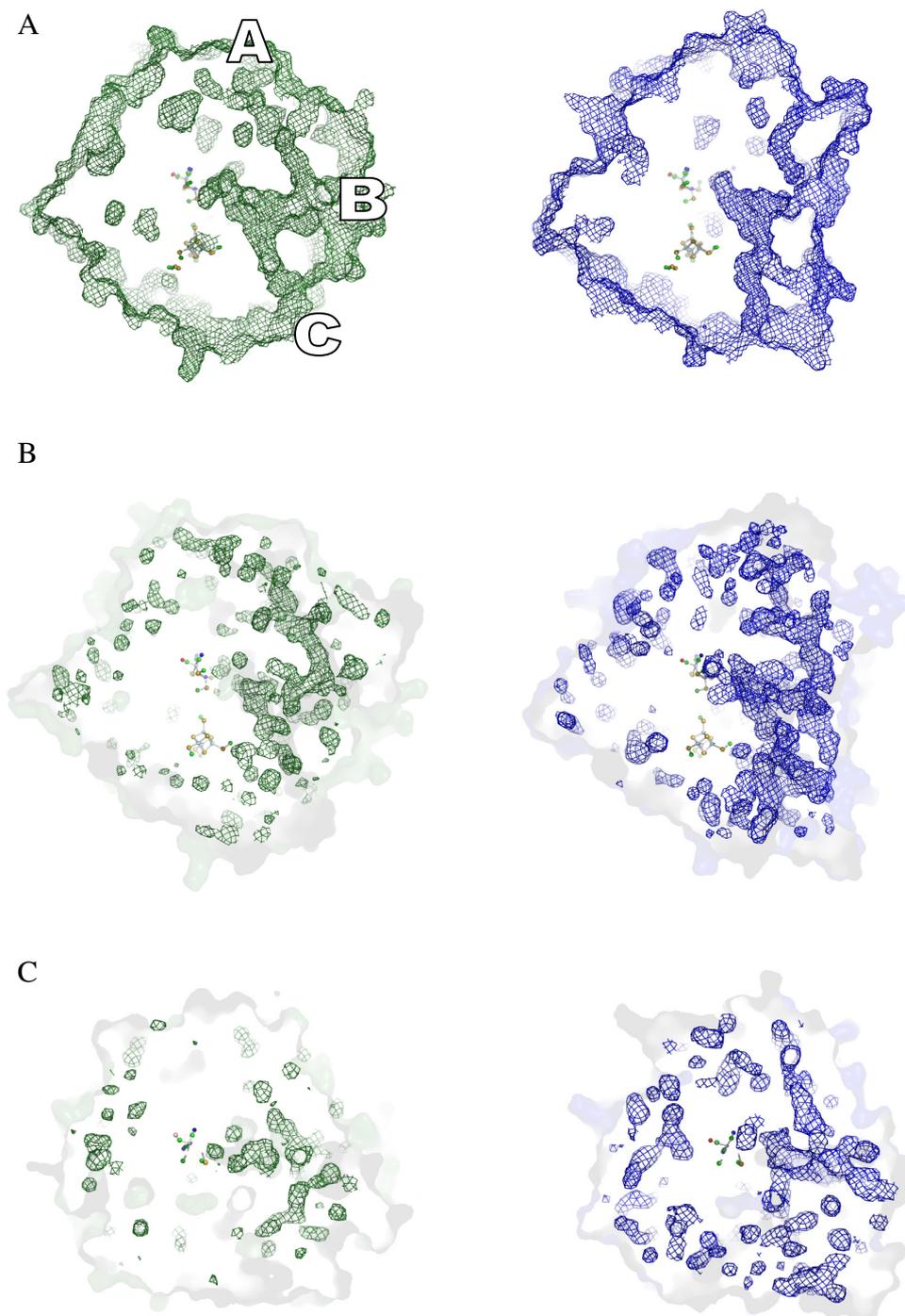


Figura 23 Canais usados pelas moléculas de H₂ para circular no interior da Hase de *D. gigas* (à esquerda) e na Hase de *Dm. baculatum* (à direita). (A) Canais da estrutura cristalográfica. (B) Mapas de densidade de probabilidade no plano dos canais. (C) Mapa de densidade de probabilidade num plano perpendicular aos canais.

Outra forma usada para identificar as zonas da proteína nas quais o H₂ circula foi a contabilização das colisões das moléculas de H₂ com cada um dos átomos da proteína. De cada vez que uma molécula de H₂ se aproxima de um átomo a uma distância inferior à soma dos raios de van der Waals do H₂ e do átomo em causa é contabilizada uma colisão. Os resultados representados na Figura 24, indicam que em *D. gigas* a zona do canal A é favorecida, enquanto que em *Dm. baculatum* é mais favorecida a região do canal C. A hélice assinalada com uma seta na estrutura de *D. gigas* (Figura 24), que se localiza na zona do canal A sofre menos colisões na Hase de *Dm. baculatum*, enquanto que a hélice assinalada por uma outra seta na estrutura de *Dm. baculatum*, na zona do canal C, sofre mais colisões nesta proteína. A zona terminal dos canais B e C, junto ao centro activo (destacada por rectângulo amarelo), regista mais colisões em *Dm. baculatum*. Estes resultados parecem confirmar que em *Dm. baculatum*, há mais moléculas a usar o canal C relativamente a *D. gigas*. A contabilização do número de moléculas presente em cada canal na Hase de *Dm. baculatum* (Tabela 2) indica que o canal A é o menos frequentado, o que já acontecia com *D. gigas*. A observação das trajectórias das moléculas indica que estas circundam as zonas hidrofóbicas da superfície da proteína até conseguirem entrar num dos canais. As que entram podem percorrer parte dos canais e voltar a sair. Por vezes ficam alguns nanossegundos retidas em cavidades. As trajectórias das três moléculas que mais de aproximaram do níquel é ilustrada na Figura 25. Estas três moléculas acederam ao centro através dos canais B e C, os canais mais usados nesta proteína. A imagem do plano perpendicular aos canais mostra a existência de uma cavidade paralela ao canal B, usada pelas moléculas para aceder ao centro. O gráfico da distância ao centro em função do tempo mostra que estas ficam aprisionadas durante algum tempo na cavidade junto ao centro.

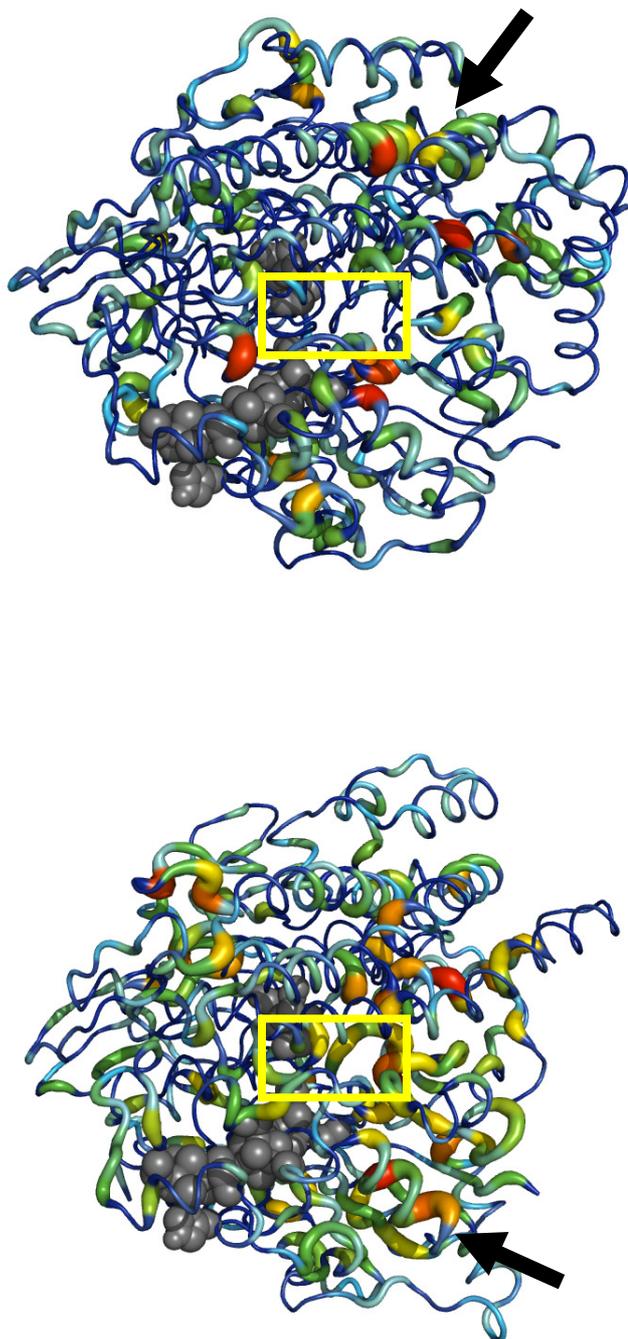


Figura 24 Representação das colisões entre as moléculas de H_2 e os átomos da Hase de *D. gigas* (em cima) e da Hase de *Dm. baculatum*. A espessura dos “tubos” utilizados para representar a cadeia principal da proteína é proporcional às colisões com moléculas de H_2 .

Tabela 2 Número de moléculas registado em cada canal na Hase de *Dm. baculatum*

	Canal A	Canal B	Canal C	Canal perpendicular
# moléculas	191	192	161	5

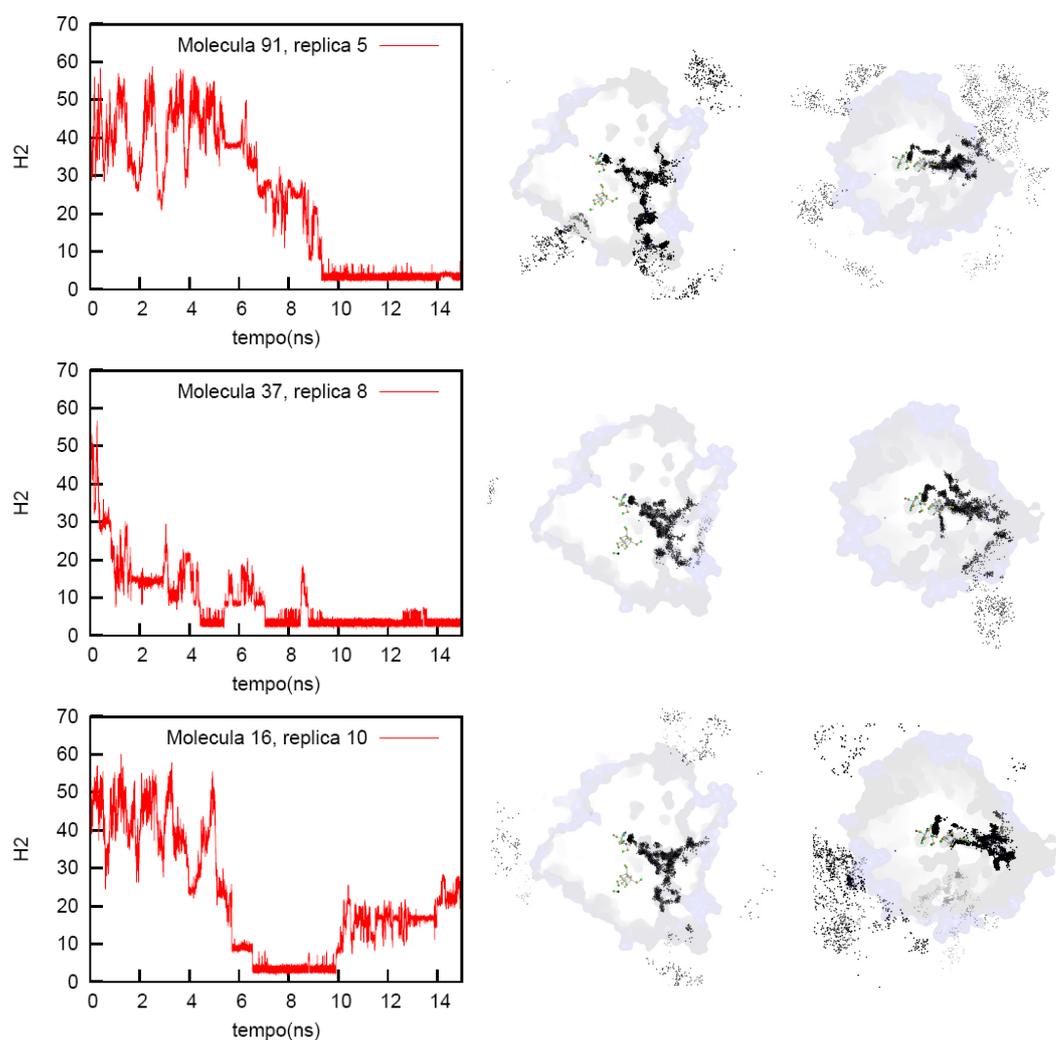


Figura 25 Trajectória das três moléculas que mais se aproximam do níquel nas simulações de *Dm. baculatum*. O gráfico reporta a distância entre estas moléculas e o níquel ao longo da simulação e as figuras ilustram a trajectória da respectiva molécula.

5 Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo indicam que em *Dm. baculatum* o número de moléculas interiorizado é maior, assim como a densidade de H₂ observada junto ao centro. Em *Dm. baculatum*, a zona do designado canal C está mais receptiva às moléculas de H₂, enquanto parecem existir menos moléculas a percorrer a zona do canal A relativamente a *D. gigas*. Uma breve comparação das estruturas revela algumas características que podem estar na origem das diferenças observadas na difusão do H₂. Em *D. gigas* existem duas hélices extra na zona da entrada do canal B (assinaladas com duas setas na estrutura de *D. gigas* na Figura 26), o que provavelmente torna mais difícil o acesso a este canal, para além de aumentar a distância que a moléculas têm de percorrer para aceder ao centro activo. Em *Dm. baculatum*, uma pequena hélice está ligeiramente deslocada (iniciada por uma seta na Figura 26) para uma posição em que parece obstruir a entrada do canal A. Na zona do canal C as proteínas são muito semelhantes em termos de estrutura secundária, embora a comparação das estruturas de raios X revele duas entradas para o canal C em *Dm. baculatum*, ao contrário do que acontece em *D. gigas*, pelo que as principais diferenças devem ter origem das cadeias laterais dos aminoácidos substituídos.

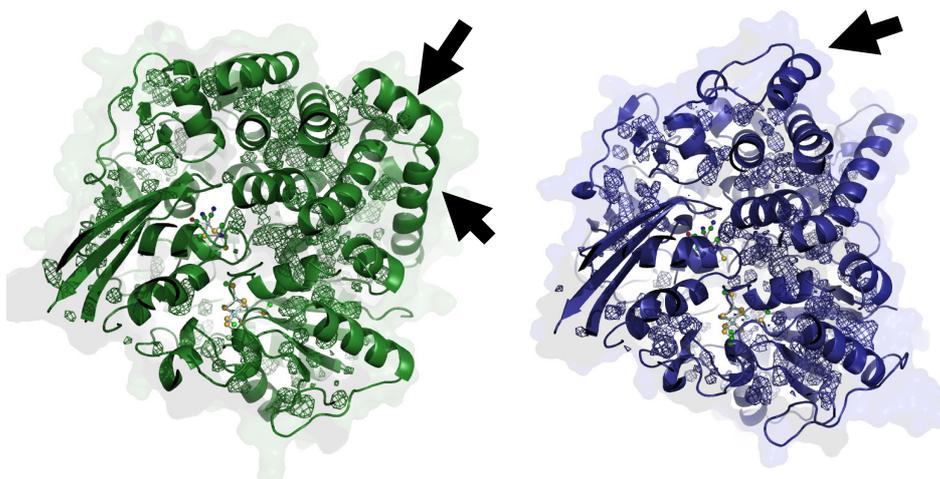


Figura 26 Comparação das estruturas médias das Hases de *D. gigas* (à esquerda) e *Dm. baculatum* (à direita).

Será interessante aprofundar, em trabalhos futuros, as razões estruturais na origem das diferenças nos padrões de difusão. Igualmente interessante será estudar a difusão relativa de moléculas de O₂, em ambas as proteínas para averiguar se a hipotética difusão diferencial desta espécie pode explicar as diferentes sensibilidades ao O₂, observada nas suas proteínas.

Anexos

Tabela 3 Cargas parciais dos átomos que constituem os centros metálicos

[NiFeSe]		FeS proximal		FeS médio		FeS distal		Mg ²⁺	
NI	0.366	FE1	0.455	FE1	0.640	FE1	00.491	MG	1.395
FE	0.620	FE2	0.424	FE2	0.520	FE2	00.506	AO	-0.92
CN1	-0.021	FE3	0.515	FE3	0.509	FE3	00.555	HA1	0.479
N1	-0.551	FE4	0.618	FE4	0.517	FE4	00.571	HA2	0.479
CN2	-0.073	S1	-0.535	S1	-0.554	S1	-0.500	OB	-0.979
N2	-0.612	S2	-0.408	S2	-0.460	S2	-0.537	HB1	0.502
CO	0.076	S3	-0.510	S3	-0.536	S3	-0.460	HB2	0.502
O	-0.259	S4	-0.411	S4	-0.5117	S4	-0.552	OC	-0.820
CB1	0.110	CB1	0.116	CB1	0.097	CB1	0.141	HC1	0.421
SG1	-0.620	SG1	-0.624	SG1	-0.618	SG1	0.585	HC2	0.421
CB2	0.119	CB2	0.122	CB2	0.087	CB2	0.141	CA	0.098
SG2	-0.529	SG2	0.708	SG2	-0.640	SG2	0.558	C	0.362
CB4	0.141	CB3	0.100	CB3	0.104	CB3	0.153	O	-0.459
SG4	-0.478	SG3	-0.585	SG3	-0.620	SG3	0.479	N	-0.460
CBE	0.049	CB4	0.090	CB4	0.085	CB	0.129	H	0.336
SE	-0.485	SG4	-0.659	SG4	-0.618	CG	0.120	CA	0.246
						ND1	0.409		
						CD2	0.214		
						CE1	0.44		
						NE2	0.486		
						HE2	0.345		

Bibliografia

1. Stephenson, M. & Stickland, L.H. Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme. *Biochem. J* **25**, 205-214 (1931).
2. Fisher, H.F., Krasna, A.I. & Rittenberg, D. The interaction of hydrogenase with oxygen. *J. Biol. Chem* **209**, 569-578 (1954).
3. Erbes, D.L., Burris, R.H. & Orme-Johnson, W.H. On the iron-sulfur cluster in hydrogenase from *Clostridium pasteurianum* W5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **72**, 4795-4799 (1975).
4. Vignais, P.M. & Billoud, B. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem. Rev* **107**, 4206-4272 (2007).
5. Matias, P.M., Pereira, I.A.C., Soares, C.M. & Carrondo, M.A. Sulphate respiration from hydrogen in *Desulfovibrio* bacteria: a structural biology overview. *Prog. Biophys. Mol. Biol* **89**, 292-329 (2005).
1. Odom, J.M. & Peck, H.D. Hydrogenase, electron-transfer proteins, and energy coupling in the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio*. *Annu. Rev. Microbiol* **38**, 551-592 (1984).
7. Martinko, M.T.M. & J.M. *Brock Biology of Microorganisms*. (Prentice Hall: 2006).
1. De Lacey, A.L., Fernandez, V.M., Rousset, M. & Cammack, R. Activation and inactivation of hydrogenase function and the catalytic cycle: spectroelectrochemical studies. *Chem. Rev* **107**, 4304-4330 (2007).
1. Fontecilla-Camps, J.C., Volbeda, A., Cavazza, C. & Nicolet, Y. Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases. *Chem. Rev* **107**, 4273-4303 (2007).
10. Enzyme Nomenclature. em <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>
11. Vignais, P.M., Billoud, B. & Meyer, J. Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev* **25**, 455-501 (2001).
12. Volbeda, A. et al. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* **373**, 580-587 (1995).
13. Dole, F. et al. Nature and electronic structure of the Ni-X dinuclear center of

- Desulfovibrio gigas hydrogenase. Implications for the enzymatic mechanism. *Biochemistry* **36**, 7847-7854 (1997).
14. Pierik, A.J., Roseboom, W., Happe, R.P., Bagley, K.A. & Albracht, S.P. Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. NiFe(CN)₂CO, Biology's way to activate H₂. *J. Biol. Chem* **274**, 3331-3337 (1999).
 15. Volbeda, A., Montet, Y., Vernède, X., Hatchikian, E.C. & Fontecilla-Camps, J.C. High-resolution crystallographic analysis of Desulfovibrio fructosovorans [NiFe] hydrogenase. *International Journal of Hydrogen Energy* **27**, 1449-1461
 16. Garcin, E. et al. The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure* **7**, 557-566 (1999).
 17. Teixeira, V.H., Baptista, A.M. & Soares, C.M. Pathways of H₂ toward the active site of [NiFe]-hydrogenase. *Biophys. J* **91**, 2035-2045 (2006).
 18. Montet, Y. et al. Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. *Nat. Struct. Biol* **4**, 523-526 (1997).
 19. Teixeira, V.H., Soares, C.M. & Baptista, A.M. Proton pathways in a [NiFe]-hydrogenase: A theoretical study. *Proteins* **70**, 1010-1022 (2008).
 20. Fdez Galván, I., Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J.C. & Field, M.J. A QM/MM study of proton transport pathways in a [NiFe] hydrogenase. *Proteins* **73**, 195-203 (2008).
 21. He, S.H. et al. EPR studies with ⁷⁷Se-enriched (NiFeSe) hydrogenase of Desulfovibrio baculatus. Evidence for a selenium ligand to the active site nickel. *J. Biol. Chem* **264**, 2678-2682 (1989).
 22. Eidsness, M.K. et al. Evidence for selenocysteine coordination to the active site nickel in the [NiFeSe]hydrogenases from Desulfovibrio baculatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **86**, 147-151 (1989).
 23. Voordouw, G. et al. Analysis and comparison of nucleotide sequences encoding the genes for [NiFe] and [NiFeSe] hydrogenases from Desulfovibrio gigas and Desulfovibrio baculatus. *J. Bacteriol* **171**, 2894-2899 (1989).
 24. Van der Linden, E. et al. The soluble [NiFe]-hydrogenase from Ralstonia eutropha contains four cyanides in its active site, one of which is responsible for the

- insensitivity towards oxygen. *J. Biol. Inorg. Chem* **9**, 616-626 (2004).
25. Valente, F.M.A. et al. Hydrogenases in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: structural and physiologic characterisation of the membrane-bound [NiFeSe] hydrogenase. *J. Biol. Inorg. Chem* **10**, 667-682 (2005).
 26. Fauque, G. et al. The three classes of hydrogenases from sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio*. *FEMS Microbiol. Rev* **4**, 299-344 (1988).
 27. Vincent, K.A. et al. Electrochemical definitions of O₂ sensitivity and oxidative inactivation in hydrogenases. *J. Am. Chem. Soc* **127**, 18179-18189 (2005).
 28. Mertens, R. & Liese, A. Biotechnological applications of hydrogenases. *Curr. Opin. Biotechnol* **15**, 343-348 (2004).
 29. Edwards, P.P., Kuznetsov, V.L. & David, W.I.F. Hydrogen energy. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* **365**, 1043-1056 (2007).
 30. Jones, A.K., Sillery, E., Albracht, S.P.J. & Armstrong, F.A. Direct comparison of the electrocatalytic oxidation of hydrogen by an enzyme and a platinum catalyst. *Chem. Commun. (Camb.)* 866-867 (2002).
 31. Reisner, E., Fontecilla-Camps, J.C. & Armstrong, F.A. Catalytic electrochemistry of a [NiFeSe]-hydrogenase on TiO₂ and demonstration of its suitability for visible-light driven H₂ production. *Chem. Commun. (Camb.)* 550-552 (2009).doi:10.1039/b817371k
 32. Gloaguen, F. & Rauchfuss, T.B. Small molecule mimics of hydrogenases: hydrides and redox. *Chem Soc Rev* **38**, 100-108 (2009).
 33. Joklik, W.K. The hydrogenase of *E. coli* in the cell-free state. I. Concentration, properties and activation. *Aust J Exp Biol Med Sci* **28**, 320-329 (1950).
 34. Joklik, W.K. The hydrogenase of *E. coli* in the cell-free state. II. The effect of certain inhibitors on hydrogenase. *Aust J Exp Biol Med Sci* **28**, 331-338 (1950).
 35. Gitlitz, P.H. & Krasna, A.I. Structural and catalytic properties of hydrogenase from *Chromatium*. *Biochemistry* **14**, 2561-2568 (1975).
 36. Lubitz, W., Reijerse, E. & van Gestel, M. [NiFe] and [FeFe] hydrogenases studied by advanced magnetic resonance techniques. *Chem. Rev* **107**, 4331-4365 (2007).
 37. Ogata, H., Lubitz, W. & Higuchi, Y. [NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism. *Dalton Trans* 7577-7587

- (2009).doi:10.1039/b903840j
38. Teixeira, M. et al. Desulfovibrio Gigas hydrogenase: redox properties of the nickel and iron-sulfur centers. *Eur. J. Biochem* **130**, 481-484 (1983).
 39. Moura, J.J. et al. Unambiguous identification of the nickel EPR signal in ⁶¹Ni-enriched Desulfovibrio gigas hydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **108**, 1388-1393 (1982).
 40. Albracht, S.P., Graf, E.G. & Thauer, R.K. The EPR properties of nickel in hydrogenase from Methanobacterium. *FEBS Lett* **140**, 311-313 (1982).
 1. LeGall, J. et al. The presence of redox-sensitive nickel in the periplasmic hydrogenase from Desulfovibrio gigas. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **106**, 610-616 (1982).
 42. Fernandez, V.M., Rao, K.K., Fernandez, M.A. & Cammack, R. Activation and deactivation of the membrane-bound hydrogenase from Desulfovibrio desulfuricans, Norway strain. *Biochimie* **68**, 43-48 (1986).
 43. Kurkin, S., George, S.J., Thorneley, R.N.F. & Albracht, S.P.J. Hydrogen-induced activation of the [NiFe]-hydrogenase from Allochromatium vinosum as studied by stopped-flow infrared spectroscopy. *Biochemistry* **43**, 6820-6831 (2004).
 44. Bagley, K.A., Duin, E.C., Roseboom, W., Albracht, S.P. & Woodruff, W.H. Infrared-detectable groups sense changes in charge density on the nickel center in hydrogenase from Chromatium vinosum. *Biochemistry* **34**, 5527-5535 (1995).
 45. Huyett, J.E. et al. ⁵⁷Fe Q-Band Pulsed ENDOR of the Hetero-Dinuclear Site of Nickel Hydrogenase: Comparison of the NiA, NiB, and NiC States. *Journal of the American Chemical Society* **119**, 9291-9292 (1997).
 46. Lai, C. et al. Responses of the Fe(CN)₂(CO) Unit to Electronic Changes as Related to Its Role in [NiFe]Hydrogenase. *Journal of the American Chemical Society* **120**, 10103-10114 (1998).
 47. Pandelia, M., Ogata, H., Currell, L., Flores, M. & Lubitz, W. Probing intermediates in the activation cycle of [NiFe] hydrogenase by infrared spectroscopy: the Ni-SI(r) state and its light sensitivity. *J. Biol. Inorg. Chem* (2009).doi:10.1007/s00775-009-0566-9
 48. Volbeda, A. et al. Structural differences between the ready and unready oxidized

- states of [NiFe] hydrogenases. *J. Biol. Inorg. Chem* **10**, 239-249 (2005).
49. Bleijlevens, B. et al. The activation of the [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum*. An infrared spectro-electrochemical study. *J. Biol. Inorg. Chem* **9**, 743-752 (2004).
 50. George, S.J., Kurkin, S., Thorneley, R.N.F. & Albracht, S.P.J. Reactions of H₂, CO, and O₂ with active [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum*. A stopped-flow infrared study. *Biochemistry* **43**, 6808-6819 (2004).
 51. Jones, A.K. et al. Enzyme electrokinetics: electrochemical studies of the anaerobic interconversions between active and inactive states of *Allochromatium vinosum* [NiFe]-hydrogenase. *J. Am. Chem. Soc* **125**, 8505-8514 (2003).
 52. Armstrong, F.A. & Albracht, S.P.J. [NiFe]-hydrogenases: spectroscopic and electrochemical definition of reactions and intermediates. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* **363**, 937-954; discussion 1035-1040 (2005).
 53. Brecht, M., van Gastel, M., Buhrke, T., Friedrich, B. & Lubitz, W. Direct detection of a hydrogen ligand in the [NiFe] center of the regulatory H₂-sensing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* in its reduced state by HYSCORE and ENDOR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc* **125**, 13075-13083 (2003).
 54. Lill, S.O.N. & Siegbahn, P.E.M. An autocatalytic mechanism for NiFe-hydrogenase: reduction to Ni(I) followed by oxidative addition. *Biochemistry* **48**, 1056-1066 (2009).
 55. Coremans, J.M., van Garderen, C.J. & Albracht, S.P. On the redox equilibrium between H₂ and hydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **1119**, 148-156 (1992).
 56. Zampella, G., Bruschi, M., Fantucci, P. & De Gioia, L. DFT Investigation of H₂ activation by [M(NHPnPr₃)('S₃')] (M = Ni, Pd). Insight into key factors relevant to the design of hydrogenase functional models. *J. Am. Chem. Soc* **127**, 13180-13189 (2005).
 57. Siegbahn, P.E.M., Tye, J.W. & Hall, M.B. Computational studies of [NiFe] and [FeFe] hydrogenases. *Chem. Rev* **107**, 4414-4435 (2007).
 58. Ogata, H. et al. Structural studies of the carbon monoxide complex of [NiFe]hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F: suggestion for the initial activation site for dihydrogen. *J. Am. Chem. Soc* **124**, 11628-11635 (2002).

59. Pershad, H.R. et al. Catalytic electron transport in *Chromatium vinosum* [NiFe]-hydrogenase: application of voltammetry in detecting redox-active centers and establishing that hydrogen oxidation is very fast even at potentials close to the reversible H⁺/H₂ value. *Biochemistry* **38**, 8992-8999 (1999).
60. Matias, P.M. et al. [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774: gene sequencing, three-dimensional structure determination and refinement at 1.8 Å and modelling studies of its interaction with the tetrahaem cytochrome c₃. *J. Biol. Inorg. Chem* **6**, 63-81 (2001).
61. Higuchi, Y., Yagi, T. & Yasuoka, N. Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure* **5**, 1671-1680 (1997).
62. Gebler, A. et al. Impact of alterations near the [NiFe] active site on the function of the H(2) sensor from *Ralstonia eutropha*. *FEBS J* **274**, 74-85 (2007).
63. Duché, O., Elsen, S., Cournac, L. & Colbeau, A. Enlarging the gas access channel to the active site renders the regulatory hydrogenase HupUV of *Rhodobacter capsulatus* O₂ sensitive without affecting its transducing activity. *FEBS J* **272**, 3899-3908 (2005).
64. Ludwig, M., Cracknell, J.A., Vincent, K.A., Armstrong, F.A. & Lenz, O. Oxygen-tolerant H₂ oxidation by membrane-bound [NiFe] hydrogenases of *Ralstonia* species. Coping with low level H₂ in air. *J. Biol. Chem* **284**, 465-477 (2009).
65. Leroux, F. et al. Experimental approaches to kinetics of gas diffusion in hydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**, 11188-11193 (2008).
66. Dementin, S. et al. Introduction of methionines in the gas channel makes [NiFe] hydrogenase aero-tolerant. *J. Am. Chem. Soc* **131**, 10156-10164 (2009).
67. Parkin, A., Goldet, G., Cavazza, C., Fontecilla-Camps, J.C. & Armstrong, F.A. The difference a Se makes? Oxygen-tolerant hydrogen production by the [NiFeSe]-hydrogenase from *Desulfomicrobium baculatum*. *J. Am. Chem. Soc* **130**, 13410-13416 (2008).
68. De Lacey, A., Gutiérrez-Sánchez, C., Fernández, V., Pacheco, I. & Pereira, I. FTIR spectroelectrochemical characterization of the Ni-Fe-Se hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*

- 13**, 1315-1320 (2008).
69. Teixeira, M. et al. Nickel-[iron-sulfur]-selenium-containing hydrogenases from *Desulfovibrio baculatus* (DSM 1743). Redox centers and catalytic properties. *Eur. J. Biochem* **167**, 47-58 (1987).
70. Pereira, A. Characterization of Representative Enzymes from a Sulfate Reducing Bacterium Implicated in the Corrosion of Steel. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **221**, 414-421 (1996).
71. Leach, A. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. (Prentice Hall: 2001).
72. Allen, M.P. & Tildesley, D.J. *Computer Simulation of Liquids*. (Oxford University Press, USA: 1989).
73. W. F. van Gunsteren & H. J. C. Berendsen Computer Simulations of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives. *Angewandte Chemie International Edition* **29**, 992-1023 (1990).
74. Berendsen, H.J.C. *Simulating the Physical World: Hierarchical Modeling from Quantum Mechanics to Fluid Dynamics*. (Cambridge University Press: 2007).
75. Hünenberger, P.H. et al. Biomolecular Modeling: Goals, Problems, Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 4064-4092 (2006).
76. Adcock, S.A. & McCammon, J.A. Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins. *Chem. Rev.* **106**, 1589-1615 (2006).
77. S. Lifson & A. Warshel Consistent Force Field for Calculations of Conformations, Vibrational Spectra, and Enthalpies of Cycloalkane and n-Alkane Molecules. *The Journal of Chemical Physics* **49**, 5116-5129 (1968).
78. Scott, W.R.P. et al. The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package. *J. Phys. Chem. A* **103**, 3596-3607 (1999).
79. Tironi, I., Sperb, R., Smith, P. & van Gunsteren, W. A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations. *The Journal of Chemical Physics* **102**, 5459, 5451 (1995).
80. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J.C. & Fraaije, J.G.E.M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry* **18**, 1463-1472 (1997).

81. Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., van Gunsteren, W.F., DiNola, A. & Haak, J.R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684 (1984).
82. Eswar, N. et al. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 2**, Unit 2.9 (2007).
83. M. J. Frisch et al. *Gaussian 03*. (Gaussian, Inc.: Wallingford CT,).
84. Niu, S. & Hall, M.B. Modeling the active sites in metalloenzymes 5. The heterolytic bond cleavage of H(2) in the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio gigas* by a nucleophilic addition mechanism. *Inorg Chem* **40**, 6201-6203 (2001).
85. Niu, S., Thomson, L.M. & Hall, M.B. Theoretical Characterization of the Reaction Intermediates in a Model of the Nickel–Iron Hydrogenase of *Desulfovibrio gigas*. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 4000-4007 (1999).
86. Rappe, A.K., Casewit, C.J., Colwell, K.S., Goddard Iii, W.A. & Skiff, W.M. UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society* **114**, 10024–10035 (1992).
87. Hunter, J.E., Taylor, D.G. & Strauss, H.L. Calculation of the rotational Raman spectrum of H₂ dissolved in water. *J. Chem. Phys.* **97**, 50 (1992).
88. Baptista, A.M. & Soares, C.M. Some Theoretical and Computational Aspects of the Inclusion of Proton Isomerism in the Protonation Equilibrium of Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B* **105**, 293-309 (2001).
89. Teixeira, V.H., Soares, C.M. & Baptista, A.M. Studies of the reduction and protonation behavior of tetraheme cytochromes using atomic detail. *J. Biol. Inorg. Chem* **7**, 200-216 (2002).
90. Bashford, D. An object-oriented programming suite for electrostatic effects in biological molecules An experience report on the MEAD project. *Scientific Computing in Object-Oriented Parallel Environments* 233-240 (1997).em <http://dx.doi.org/10.1007/3-540-63827-X_66>
91. Bashford, D. & Gerwert, K. Electrostatic calculations of the pK_a values of ionizable groups in bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol* **224**, 473-486 (1992).
92. Christen, M. et al. The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05. *J Comput Chem* **26**, 1719-1751 (2005).

93. Teixeira, V.H. et al. On the Use of Different Dielectric Constants for Computing Individual and Pairwise Terms in Poisson–Boltzmann Studies of Protein Ionization Equilibrium. *The Journal of Physical Chemistry B* **109**, 14691-14706 (2005).
94. Baptista, A.M., Martel, P.J. & Soares, C.M. Simulation of electron-proton coupling with a Monte Carlo method: application to cytochrome c3 using continuum electrostatics. *Biophys. J* **76**, 2978-2998 (1999).
95. Van Der Spoel, D. et al. GROMACS: Fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* **26**, 1701-1718 (2005).
96. Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D. & Lindahl, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation* **4**, 435-447 (2008).
97. W. F. van Gunsteren et al. *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*. (vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich and BIOMOS: Zürich, Groningen, 1996).em <<http://www.vdf.ethz.ch/top.html>>
98. Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., Van Gunsteren, W.F. & Hermans, J. Interaction models for water in relation to protein hydration. *Intermolecular forces* **331**, (1981).
99. Smith, P.E. & van Gunsteren, W.F. Consistent dielectric properties of the simple point charge and extended simple point charge water models at 277 and 300 K. *J. Chem. Phys.* **100**, 3169 (1994).
100. BERENDSEN, H.J. & VAN, W.F. A Consistent Empirical Potential for Water-Protein Interactions. *Biopolymers* **23**, 151S1518 (1984).
101. Hill, T.L. *An Introduction to Statistical Thermodynamics*. (Dover Publications: 1987).
102. Victor, B.L., Baptista, A.M. & Soares, C.M. Dioxygen and nitric oxide pathways and affinity to the catalytic site of rubredoxin:oxygen oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas*. *J. Biol. Inorg. Chem* **14**, 853-862 (2009).