

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



**Estudio químico-computacional de las rutas de transferencia de
electrones en hidrogenasa [Ni-Fe] de *Salmonella Typhimurium***

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE

BIOINGENIERO

PRESENTA:

Paulina Tafoya Romo

DIRECTORES:

Dr. SERGIO A. ÁGUILA PUENTES

Dra. DORA LUZ FLORES GUTIÉRREZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. MAYO DEL 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

ESTUDIO QUÍMICO-COMPUTACIONAL DE LAS RUTAS DE TRANSFERENCIA DE
ELECTRONES EN HIDROGENASA [Ni-Fe] DE *Salmonella Typhimurium*

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOINGENIERO

PRESENTA:

PAULINA TAFOYA ROMO

Aprobada por:



Dr. Sergio A. Aguila Puentes
Director



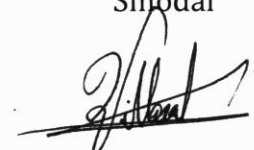
Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez
Codirectora



Dr. David Cervantes Vásquez
Sinodal



Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez
Sinodal



Dr. Rubén Cesar Villarreal Sánchez
Sinodal

RESUMEN

El hidrógeno es fuente de energía limpia por lo que su producción en masa representaría una fuente alternativa para la generación de energía. Una forma de producir H_2 es por medio de las hidrogenasas que son enzimas capaces de producir H_2 de manera reversible. Por esta razón, este estudio teórico considera analizar las rutas de transferencia de electrones, con el fin de desplazar el equilibrio químico de la reacción hacia la producción de H_2 .

Se caracterizaron las rutas de transferencia de electrones de la enzima hidrogenasa [Ni-Fe] de *Salmonella Typhimurium*, mediante estudios químico-computacionales utilizando metodologías híbridas de mecánica cuántica/mecánica molecular (QM/MM). Se generó una dinámica molecular para observar las distintas conformaciones que puede adoptar la enzima a través del tiempo y obtener la conformación con mayor frecuencia. Se observó que los cofactores que participan en la transferencia electrónica están inmersos en zonas rígidas de la proteína. Se determinaron los residuos que participan en la transferencia electrónica, lo cual dio pauta para generar las rutas más probables de transferencia de electrones.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto SCI5-1-IG-51 de supercómputo de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Quiero agradecer a mi Director de tesis Dr. Sergio Águila Puentes por introducirme a este tema de investigación tan fascinante y crear un ambiente de trabajo gobernado por la confianza, optimismo y curiosidad científica. También quiero agradecer a mi co-directora de tesis Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez por depositar su confianza en mí.

A mis compañeros y amigos del grupo de Bionanotecnología (CNyN-UNAM) por su asesoramiento.

A mi familia por su apoyo y paciencia.

A Dayra.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	1
1.1 Hidrógeno como fuente de energía.	2
1.2 Hidrogenasas	4
1.3 Química computacional y sistemas biológicos.....	8
1.3.1 Mecánica molecular y mecánica cuántica	11
1.3.2 Métodos QM/MM	15
1.4 Transferencia de electrones en péptidos.....	16
1.4.1 Modelo de tunelaje (Superexchange model).	16
1.4.2 Modelo de salto (Hopping model).	18
2. HIPÓTESIS.....	24
3. OBJETIVO GENERAL.	24
3.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
4. METODOLOGÍA.....	25
4.1 Preparación de la enzima.....	25
4.2 Dinámica molecular.....	26
4.3 Cálculos QM/MM para vías de transferencia de electrones.	28
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y MATEMÁTICO PROPUESTO.....	30
5.1 Raíz cuadrada media de la desviación (RMSD)	30
5.2 Raíz cuadrada media de la fluctuación (RMSF)	31
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
6.1 Determinación de los estados de protonación de la proteína al pH de trabajo.....	32
6.2 Estudio de los posibles cambios conformacionales de la proteína a través de Dinámica Molecular.....	32
6.3 Determinar las rutas individuales de transferencia de electrones a través del estudio híbrido QM/MM.....	40
6.3.1 Región analizada entre una agrupación y el sitio [Ni-Fe].....	45
6.3.2 Región analizada entre la agrupación 6 y el 5.....	48
6.3.3 Región analizada entre el clúster 2 y 1.....	51
7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Distancias medias entre las agrupaciones de Fe-S.....	40
Tabla II: Residuos pertenecientes a las rutas de transferencia electrónica.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Procesos para convertir la biomasa a hidrógeno.	3
Figura 2: Sub estados del sitio activo de hidrogenasas [Ni-Fe]..	8
Figura 3: Diagrama de energía para la transferencia secuencial de electrones entre grupos R de residuos.	19
Figura 4: Residuos aromáticos que posiblemente participan en la transferencia electrónica entre R1 y R2. Se observa que la distancia entre Y731 en R1 y W48 en R2 es de 25 Å.	21
Figura 5: Metodología QM/MM Et-pathway, para la caracterización de rutas de transferencia electrónica.	30
Figura 6: Hidrogenasa [Ni-Fe] solvatada en una caja de agua de 10 Å (en todas las direcciones).	33
Figura 7: Energía total (Kcal/mol) de la hidrogenasa [Ni-Fe] a través de la simulación.	34
Figura 8: RMSD de los carbonos alfa de hidrogenasa [Ni-Fe] vs el Tiempo de simulación.	36
Figura 9: RMSF de los carbonos alfa de la Hidrogenasa [Ni-Fe] en Angstroms.	37
Figura 10: Representación del RMSF de la hidrogenasa [Ni-Fe].	38
Figura 11: Cambios en la distancia entre agrupaciones de Fe-S en hidrogenasa [Ni-Fe] durante 20ns.	39
Figura 12: Agrupaciones (clusters) Fe-S enumerados dentro de la matriz proteica de la enzima hidrogenasa [Ni-Fe] de Salmonella Thyphimurium.	43
Figura 13: Ruta 1 de la region cl7c, estudiada por QM/MM Et-pathway.	46
Figura 14: Ruta 2 de la región cl7c, estudiada por QM/MM Et-pathway.	47
Figura 15: Ruta 1 de la región cl65 estudiada por QM/MM et-pathway.	49
Figura 16: Ruta 2 de la región cl65 estudiada por QM/MM et-pathway.	50
Figura 17: Ruta 1 de la región cl21 estudiada por QM/MM et-pathway.	52
Figura 18: Ruta 2 de la región cl21 estudiada por QM/MM et-pathway.	53

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

Uno de los mayores retos de esta primera mitad de siglo XXI en adelante es proveer de energía segura, ambientalmente sustentable y a un precio razonable a la población mundial. Se predice que la población mundial va a incrementar en un porcentaje de 36% con una población de 8.9 billones de personas para 2050, y el consumo primario global de energía se proyecta que va a incrementar un 56% para los años de 2010 a 2040. El uso de energía global aumentará de 524 cuatrillones de BTU en 2010 a 630 cuatrillones de BTU en 2020 y a 820 cuatrillones de BTU en 2040 (EIA, 2013).

Se sabe que en 2010 las emisiones de dióxido de carbono, provenientes de actividades industriales, fueron de 31 mil millones de toneladas métricas y se espera que para el 2040 aumente a 45 mil millones de toneladas métricas, lo cual representa un incremento del 46%. La energía de fuentes renovables y nucleares son las que tienen mayor crecimiento a nivel mundial, con una tasa de crecimiento anual promedio de 2.5%. Las preocupaciones acerca de la seguridad energética, el impacto ambiental de emisiones provenientes de la quema de combustibles fósiles y el crecimiento sostenido en los precios de estos, ha alentado el uso de energía proveniente de fuentes renovables (EIA, 2013).

Existen diferentes fuentes de energía renovables, entre las cuales están el viento, la biomasa, la geotérmica, el biogás, las celdas solares, la solar térmica,

la hidroeléctrica, el biocombustible líquido y el movimiento de las olas (mareomotriz) (Delucchi & Jacobson, 2011).

En este sentido, el mundo se está inclinando a la utilización de nuevas tecnologías para la producción de energía, cabe mencionar que, en el 2008 la electricidad producida de fuentes renovables fue del 18% del total de la energía producida a nivel global (Delucchi & Jacobson, 2011).

Los principales beneficios de la energía alternativa son: la disminución de la contaminación ambiental y la reducción de dependencia a los combustibles fósiles, por lo tanto, es necesario idear tecnologías que permitan obtener combustibles alternos, por ejemplo, el hidrógeno.

1.1 Hidrógeno como fuente de energía.

El hidrógeno puede ser producido por una variedad de fuentes entre las cuales están: fuentes fósiles, en la cual hay una producción de CO_2 como subproducto y es necesario capturarlo para asegurar un proceso ambientalmente sustentable. Otra manera de obtener H_2 es a partir de la electrólisis del agua se descompone en hidrógeno y oxígeno molecular a través de la aplicación de corriente eléctrica. Otro sistema que puede ser utilizado para la producción de este combustible es por fotoelectrólisis, a través de sistemas fotovoltaicos acoplados con electrolizadores. La salida de este sistema puede ser electricidad de las celdas fotovoltaicas o puede ser hidrógeno del electrolizador. Por lo

general se utiliza el agua como electrolizador (Agency, 2006).

La biomasa es una buena alternativa para producir combustible, en este proceso se produce un gas que contiene hidrógeno de una manera similar a la gasificación del carbón. Existen procesos térmicos, biológicos y químicos para convertir la biomasa a hidrógeno, tal como se muestra en la Figura 1. Dentro de los procesos térmicos está la gasificación y la pirólisis para poder obtener gases combustibles y líquidos y de esa manera extraer el hidrógeno. Dentro de los procesos biológicos está el uso de microorganismos anaerobios para fermentar materia orgánica con la consecuente producción de metano y etanol. La fermentación anaerobia de material orgánico a biohidrógeno, es producido por diversos grupos de bacterias. Esta ocurre en biorreactores a través del día y la noche. La fotofermentación se genera en presencia de luz y puede ser utilizada por ejemplo para convertir ácidos grasos a hidrógeno (Agency, 2006).

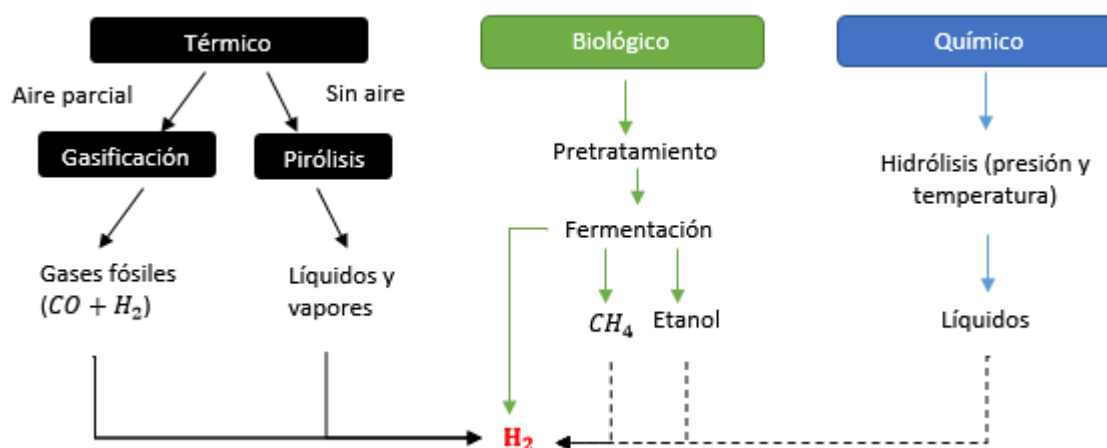


Figura 1: Procesos para la producción de hidrógeno a partir de biomasa.

También existe la biofotólisis, la cual se basa en dos pasos: la fotosíntesis y luego la producción de hidrógeno por presencia de hidrogenasas en algas y cianobacterias (Agency, 2006).

1.2 Hidrogenasas

Las hidrogenasas son enzimas que catalizan la oxidación del hidrógeno molecular como se muestra en la ecuación (Ec.1).



Esta reacción es reversible, y su dirección depende del potencial redox de los componentes que pueden interactuar con la enzima. En la presencia de H_2 y un aceptor de electrones, la hidrogenasa actuará oxidando al H_2 . Por otro lado, en la presencia de un donador de electrones de bajo potencial, puede utilizar los protones del agua como aceptor de electrones y liberar H_2 (Vignais & Billoud, 2007). Este último es el proceso más deseable gracias a que el agua y la luz están disponibles casi ilimitadamente y además solo se produce hidrógeno molecular, y de esta manera se evita la producción de gases tipo invernadero.

Se han encontrado tres diferentes formas de hidrogenasas, de acuerdo al contenido metálico que está en su sitio activo. Las de un solo hierro [Fe], dos hierros [Fe-Fe] y níquel con hierro [Ni-Fe] siendo estas últimas las de mayor presencia en este tipo de enzimas (Nicolet, Piras, Legrand, Hatchikian, &

Fontecilla-Camps, 1999). Todas las hidrogenasas tienen sitios activos con cofactores de al menos un hierro coordinado por varias cisteínas mediante sus grupos tioles y una molécula de monóxido de carbono.

Las hidrogenasas [Fe-Fe] preferentemente catalizan la síntesis de H_2 a altos recambios ($k_{cat} > 10,000 \text{ s}^{-1}$) para liberar el exceso de equivalentes reductores en condiciones estrictamente anaerobias. Sus características catalíticas se correlacionan con una alta sensibilidad intrínseca al O_2 , el cual provoca daños estructurales y usualmente inactiva de manera irreversible a la enzima (Stripp et al., 2009). Las hidrogenasas del tipo [Ni-Fe] tienen un metabolismo flexible el cual les permite estar en condiciones anaerobias y aerobias. Sin embargo, estas enzimas desarrollan la oxidación de H_2 , predominantemente. Este tipo de hidrogenasas son abundantes en comunidades procariotas y generalmente tienen un número de recambio de H_2 menor que las hidrogenasas [Fe-Fe] para la síntesis de H_2 , pero son menos sensibles al O_2 (Schwartz & Friedrich, 2006).

El hecho que existan microorganismos que en condiciones aerobias utilicen el H_2 como su única fuente de energía, indica que algunas hidrogenasas [NiFe] tienen una protección específica a la inactivación por O_2 . Esto se ha comprobado en diversos grupos de procariotas incluyendo *Bradyrhizobium japonicum* la cual es una bacteria fijadora de nitrógeno (Kaneko et al., 2002), la fototrofa *Rhodobacter capsulatus* (Haselkorn et al., 2001), y la ampliamente estudiada proteobacteria *Ralstonia aetrophila* que contiene hasta tres hidrogenasas nativas tolerantes al O_2 (Lenz et al., 2010).

La evidencia más convincente de que existen hidrogenasas [Ni-Fe] que toleran el O_2 proviene de experimentos electroquímicos demostrando que las reacciones con O_2 varían entre las hidrogenasas. Por ejemplo la hidrogenasa [Fe-Fe] de la bacteria anaeróbica reductora de sulfato *Desulfovibrio desulfuricans* (Goldet et al., 2009) es dañada irreversiblemente por el O_2 , la hidrogenasa [Ni-Fe] de la anoxigénica fotótrofa *Allochromatium vinosum* es reversiblemente inactivada por O_2 (Jones et al., 2003), mientras que la hidrogenasa [Ni-Fe] unida a membrana de *R. eutropha* reacciona reversiblemente con O_2 , incluso durante el proceso del ciclo de H_2 (Vincent, Parkin, & Armstrong, 2007).

Está establecido experimentalmente que las hidrogenasas tolerantes al O_2 son capaces de sintetizar H_2 en la presencia de O_2 cuando son adsorbidas a un electrodo de grafito con un sobre potencial mínimo. Sin embargo, esta actividad es bastante baja ($k_{cat} \sim 70 \text{ s}^{-1}$) y su inhibición por el producto es tan alta que solo podría ser sostenida si el producto es removido continuamente (Goldet et al., 2008).

El sitio activo de las hidrogenasas [Ni-Fe] es un ambiente rico en electrones propenso naturalmente a ser atacado por el O_2 . Se han desarrollado intentos para convertir las hidrogenasas sensibles al O_2 a unas tolerantes por medio del intercambio de residuos cercanos al sitio activo. Esto es a raíz del descubrimiento de cavidades hidrófobas que son interpretadas como canales gaseosos los cuales conectan el solvente con el sitio activo de la proteína

(Montet et al., 1997).

Dichos canales fueron estudiados, realizando mutaciones sitiodirigidas en la hidrogenasa [Ni-Fe] tolerante al O_2 de residuos “voluminosos” a la salida del canal gaseoso por residuos más pequeños en *R. eutropha* haciéndola más sensible al O_2 (Buhrke, Lenz, Krauss, & Friedrich, 2005). Posteriormente se reemplazaron los residuos en hidrogenasa [Ni-Fe] sensible al O_2 , por residuos más voluminosos restringiendo de esta manera la entrada de O_2 y CO_2 al sitio activo (Liebgott et al., 2010).

Comparando las variantes con las hidrogenasas [Ni-Fe] nativas tolerantes al O_2 , no sostienen la actividad catalítica bajo condiciones aerobias, sugiriendo que los mecanismos moleculares que posibilitan la sobrevivencia a ciertas hidrogenasas son más complejas que las originalmente previstas.

En las hidrogenasas bimetálicas el cofactor del sitio activo esta acoplado electrónicamente con las agrupaciones de hierro con azufre [FeS] que direccionan los electrones del sitio activo a la superficie de la proteína y viceversa. La deficiencia de electrones durante ataques con O_2 comúnmente conlleva a una forma inactiva del sitio catalítico de hidrogenasas [Ni-Fe] sensibles a O_2 , (Figura 2A) y se puede reactivar bajo condiciones reductoras durante intervalos de tiempo largos (Ogata, Lubitz, & Higuchi, 2009).

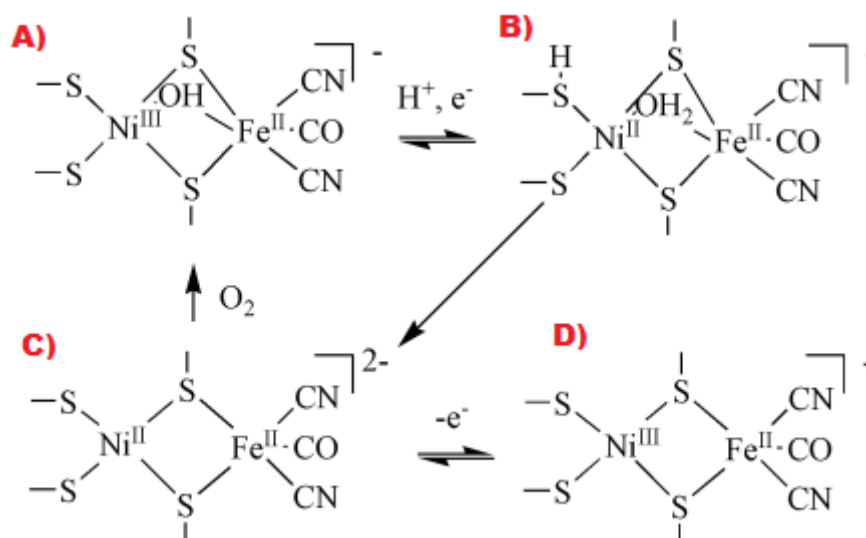


Figura 2: Sub estados del sitio activo de hidrogenasas [Ni-Fe]. La forma inactiva bajo condiciones aerobias (A) en hidrogenasas intolerantes al O_2 , las cuales pueden reactivarse bajo condiciones reductoras por largos periodos de tiempo (B). El sitio activo en hidrogenasas tolerantes al O_2 (D) la cual es rápidamente activada por reducción inicial el ciclo catalítico (C).

Es por ello que la utilización de hidrogenasas para producir hidrógeno a gran escala necesita del entendimiento de sus características electrónicas y estructurales las cuales gobiernan la biosíntesis del H_2 , lo cual puede conducir al diseño de catalizadores de H_2 altamente eficientes. De tal manera que, es necesario conocer las rutas de transferencias de electrones que mantiene la enzima.

1.3 Química computacional y sistemas biológicos.

Las simulaciones moleculares son una disciplina que permite investigar átomos, moléculas y macromoléculas mediante computadoras.

Una estructura cristalina de una proteína es generalmente insuficiente para clarificar los mecanismos de reacción catalítica de una enzima, ya que típicamente un ciclo catalítico envuelve una serie de intermediarios y estados de transición, que para la mayoría de ellos no hay información detallada disponible. La posición de los hidrógenos y moléculas de agua es una característica crítica del mecanismo y estas posiciones en muchos casos no están disponibles para datos de cristalografía (Friesner & Guallar, 2005).

La química computacional emplea una amplia gama de métodos matemáticos los cuales pueden englobarse en dos categorías, mecánica molecular y mecánica cuántica.

La mecánica molecular hace referencia a la aplicación de leyes de la física clásica al átomo sin considerar los electrones, explícitamente. En la dinámica molecular, se generan configuraciones del sistema integrando las leyes de movimiento de Newton (Leach, A., 2001).

El resultado es una trayectoria que especifica como las posiciones y las velocidades de las partículas del sistema varían con el tiempo. Las leyes de movimiento de Newton pueden ser declaradas de la siguiente manera:

1. Un cuerpo permanece en reposo o movimiento uniforme y rectilíneo a no ser que sea obligado a cambiar su estado por fuerzas impresas sobre él.
2. La fuerza es igual a la velocidad de cambio de movimiento.

3. Para cada acción hay una reacción igual y opuesta.

La trayectoria es obtenida resolviendo las ecuaciones diferenciales representadas en la segunda ley de Newton ($F = ma$) (Ec. 2).

$$\frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F_{xi}}{m_i} \quad (2)$$

La ecuación describe el movimiento de una partícula de masa m_i a lo largo de una coordenada (x_i), donde F_{xi} es la fuerza de la partícula en esa dirección (Leach, A., 2001).

Por otro lado, la mecánica cuántica se basa en la ecuación de Schrödinger (Ec. 3) para describir una molécula en función de su estructura electrónica construyendo de esta manera su función de onda. Para el cálculo cuántico del presente trabajo se utiliza la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo:

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V(r) \right\} \Psi(r) = E\Psi(r) \quad (3)$$

Donde $\hbar$ es la constante de Planck, m es la masa de la partícula. Para funciones de onda en tres dimensiones se utiliza el operador diferencial ∇ . $V(r)$ es la energía potencial donde r significa que es una función de onda dependiente de las tres variables espaciales (x, y, z). $\Psi(r)$ expresa que es una función de onda que solamente depende de las coordenadas tridimensionales. De esta manera se puede conocer la energía total del sistema ($E\Psi(r)$) el cual es representado por una función de onda en tres dimensiones (Blinder, S.,

2004).

1.3.1 Mecánica molecular y mecánica cuántica

La mecánica molecular (MM) es usada para modelar a la enzima y al solvente que la envuelve donde no hay ruptura ni formación de enlace. En los cálculos de MM, las interacciones entre los átomos son descritas usando una función de energía potencial a la cual se le denomina “campo de fuerza” (van der Kamp & Mulholland, 2008). Los campos de fuerza más comunes para el modelado biomolecular son CHARMM 22/27, AMBER y OPLS/AA. Estos campos de fuerza construyen una expresión para la energía potencial que es función de sus posiciones atómicas $V(x,y,z)$. De manera que estos métodos analizan las contribuciones a la energía potencial de las moléculas debidas a: Alargamiento de enlace (Ev_{enlace}), deformación del ángulo de enlace (Ev_{angulo}), rotación alrededor de un enlace ($Ev_{dihedrico}$), interacciones no enlazantes como son las electrostáticas (Ev_{elec}), Van der Waals (Ev_{vdW}) y enlace de hidrógeno (Ev_{enl-H}) (van der Kamp & Mulholland, 2008).

La suma de estas contribuciones produce la energía potencial total (Ev_{total}) para una conectividad y conformación determinada, la cual tiene la forma funcional de la ecuación 4.

$$Ev_{total} = Ev_{enlace} + Ev_{angulo} + Ev_{dihedrico} + Ev_{elec} + Ev_{vdW} + Ev_{enl-H} \quad (4)$$

Estas funciones de energía potencial posibilitan los cálculos computacionales de manera eficiente, pero no es posible aplicar al modelo procesos como rompimiento, formación de enlace o reorganización electrónica, procesos que ocurren durante las reacciones químicas (van der Kamp & Mulholland, 2008).

La mecánica molecular permite dar una buena percepción de energías conformacionales (energía potencial dependiente del acomodo de los átomos) e interacciones no enlazantes de una proteína. El método a elegir depende de la naturaleza de la molécula con la que se va a trabajar, el tipo de información que se necesita, disponibilidad para poder aplicar parámetros experimentales determinados y recursos de computación (Friesner & Guallar, 2005).

La mecánica cuántica puede predecir estructura electrónica y reactividad, esto es de particular importancia para compuestos con metales de transición, en los cuales la unión entre el metal y el ligando es extremadamente compleja, ya que tiene estructuras electrónicas, estabilidades y reactividades que son mucho más variadas y menos predecibles que para la mayoría de los compuestos (Harvey, Bathelt, & Mulholland, 2006).

El tamaño del modelo puede ser un factor limitante para un método en particular, de manera que el número límite de átomos en una molécula se incrementa aproximadamente en dos órdenes de magnitud o más entre métodos distintos desde el *ab initio* a los de mecánica molecular (Beltran et. al., 2000). Se da este

nombre a los cálculos computacionales derivados de principios teóricos (como la ecuación de Schrodinger) sin incluir datos experimentales. Así, el método *ab initio* (“a partir de primeros principios”) está limitado a decenas de átomos, los semiempíricos a cientos y los métodos mecánico-moleculares a miles. En cuanto a recursos de cómputo, las necesidades de cálculo aumentan con relación al tamaño del modelo según el método que se elija. En el caso de *ab initio*, el tiempo requerido para realizar los cálculos aumenta en el orden de N^4 , donde N es el número de átomos del modelo.

En el caso de los métodos semiempíricos, el tiempo de cómputo se eleva según la relación N^3 o N^2 , y en el caso de los métodos de mecánica molecular tiene una relación N^2 . Por consiguiente los cálculos de mecánica cuántica requieren mayor poder de cómputo que los métodos de mecánica molecular (Beltran et. al., 2000).

La conjunción de ambos métodos contiene los elementos necesarios para describir apropiadamente energías potenciales relevantes de la química enzimática, esto porque la mecánica molecular nos permite modelar el sistema enzimático y de esta manera conocer las diferentes conformaciones que puede adoptar dicha enzima como producto de la dinámica molecular; la mecánica cuántica nos permite conocer los aminoácidos que permiten (en este caso) la transferencia de electrones, la cual es una propiedad importante de conocer si se desea aumentar la productividad de la enzima.

Los programas que se utilizan en química computacional están basados en la

teoría de mecánica cuántica, ya que resuelven la ecuación de Schrödinger, la cual está relacionada con el hamiltoniano electrónico (función relacionada con la energía de un sistema cuántico), y de esta manera conocer la energía total del sistema. La ecuación de Schrödinger exacta solo se puede resolver para el átomo de hidrógeno y He^+ , puesto que éstos solo contienen un electrón. La ecuación de Schrödinger no describe cómo es que los electrones interactúan entre sí (termino de correlación e intercambio), por lo tanto hay que utilizar métodos que contengan dicho término para un sistema con N electrones, como en este caso es la enzima hidrogenasa [Ni-Fe] de *Salmonella Typhimurium*.

Uno de los métodos que se utilizan para describir sistemas multiatómicos del tipo *ab initio* es el método de Hartree-Fock, el cual determina la función de onda por medio de la combinación lineal de orbitales atómicos. A medida que se incrementa el número de átomos en la región a tratar por mecánica cuántica, hay un incremento en el número de términos en la ecuación, en consecuencia hay un incremento en el tiempo computacional en el cálculo de la energía del sistema. Por otro lado, la teoría de funcionales de la densidad (DFT), ha demostrado que es un modelo teórico poderoso para predecir y racionalizar las propiedades de compuestos organometálicos y de coordinación (Harvey et al., 2006). Este método es alternativo a la solución de la ecuación de Schrödinger, y funciona minimizando el funcional de la energía electrónica con respecto a la densidad electrónica. De manera tal que, el número de términos en la ecuación disminuye considerablemente y esto se traduce a un cálculo más rápido de la

energía total del sistema (Blinder, S., 2004).

La región reactiva puede ser tratada con una metodología *ab initio* y así mismo delimitar regiones con suficiente espacio para no dejar pasar eventos electrónicos relevantes (Friesner & Guallar, 2005). Para este trabajo las regiones fueron delimitadas en base a la cercanía que tienen ciertos aminoácidos a las agrupaciones de Fe-S, las cuales se sabe que participan en la transferencia electrónica. Es importante delimitar las regiones a tratar por métodos cuánticos (*ab initio*) ya que mientras mayor sea la región más costoso es el cálculo computacional. Es por ello que para este trabajo es necesario realizar dinámica molecular antes de los cálculos cuánticos (*ab initio*), ya que como resultado de la dinámica se pueden conocer las regiones con menor fluctuación donde se sabe que pudiesen estar las rutas de transferencia de electrones, de esta manera, una vez conocidas dichas regiones, el espacio a tratar con métodos cuánticos se reduce considerablemente. Estos métodos combinados son llamados métodos híbridos QM/MM.

1.3.2 Métodos QM/MM

La integración de metodologías QM/MM surge a partir de la necesidad de conocer las reacciones químicas del sitio activo, fenómenos de difusión de sustrato, acceso al solvente y cambios conformacionales, es decir, el papel de la matriz proteica durante la catálisis (van der Kamp & Mulholland, 2008).

La importancia de dichas metodologías y la creciente aplicación de las mismas han sido impulsadas por el Premio Nobel de Química 2013 otorgado a los desarrolladores de las metodologías QM/MM (Karplus, Lewitt y Warchell), ya que ellos han demostrado la importancia de la implementación de este tipo de herramientas en ciencias experimentales.

1.4 Transferencia de electrones en péptidos.

Las características de la matriz proteica que separa al donador (D) del aceptor (A) de electrones son de gran importancia para un proceso de transferencia electrónica eficiente entre el D y el A. Los electrones pueden ser transferidos a través de enzimas activas a una distancia de 20 Å (o más) a una tasa en el orden de milisegundos (Gray & Winkler, 2009), esto demuestra que la matriz proteica puede soportar el transporte de electrones entre pares rédox distales de una manera altamente eficiente. Se han estudiado dos modelos para explicar las propiedades de la transferencia electrónica en péptidos: tunelaje y modelo de salto.

1.4.1 Modelo de tunelaje (Superexchange model).

Este fenómeno se relaciona con la solución de la ecuación de Schrödinger para una partícula que incide sobre una barrera de potencial finita. Desde un punto de vista clásico, si la energía de la partícula que incide sobre la barrera de

potencial es menor que la de dicha barrera, la partícula no podrá pasar y ésta se va a reflejar en su totalidad. Mientras que si la energía de la partícula es mayor que la de la barrera ésta siempre pasará. El comportamiento cuántico es distinto, ya que existe una probabilidad de que la partícula se transmita y siga viajando, inclusive si la energía de ésta es menor que la de la barrera de potencial. Para este trabajo el efecto de tunelaje podría ser ejemplificando si el electrón tuviera que viajar entre las agrupaciones de Fe-S los cuales están a más de 10 Å de distancia unos de otros y donde no existiera la participación de aminoácidos como peldaños para la transferencia electrónica.

El traslape de los orbitales del donador y el aceptor que controla la tasa de la transferencia electrónica (K_{TE}) depende exponencialmente de la distancia (r_{DA}) entre los sitios rédox de manera exponencial. La ecuación (Ec. 5) contiene un factor (β), el cual disminuye con la distancia, de esta manera se representa la influencia que tiene la distancia que separa el donador del aceptor de electrones y describe la transferencia electrónica por tunelaje en una reacción de un solo paso (Hopfield, 1974).

$$K_{TE} \propto e^{-\beta r_{DA}} \quad (5)$$

Ese decaimiento exponencial está íntimamente relacionado con la distancia, mientras más alejados estén el donador del aceptor de electrones, menor probabilidad hay que se transfiera el electrón.

1.4.2 Modelo de salto (*Hopping model*).

Está basado en la difusión de la carga vía intermediarios oxidados (o reducidos), y describe a la transferencia de electrones (TE) como un proceso multipaso. De tal suerte que la carga migra (salta) a través de la proteína usando ciertos residuos como peldaños para llegar hasta el aceptor final de electrones. Para el proceso de salto de carga la variable K_{ET} depende del número de saltos N (Ec. (6)) con x entre 1 y 2 lo que denota si los pasos son reversibles o irreversibles (Jortner, Bixon, Langenbacher, & Michel-Beyerle, 1998).

$$K_{TE} \propto N^x \quad (6)$$

El modelo de salto para la transferencia de electrones fue desarrollado primeramente para estudiar el ADN. Esto nació a partir de que se observó que el ADN es un acarreador de carga eficiente, y que esta eficiencia escala con el número de pares base de guanina (Núñez & Barton, 2000).

Las pares de base de guanina con su bajo potencial de oxidación ofrecen la posibilidad de formar intermediarios químicos oxidados en el proceso de transferencia electrónica. La transferencia electrónica entre donador y aceptor puede suceder en un proceso multipaso donde las bases del ADN sirven como peldaños lo que da lugar a distancias cortas (altas tasas de transferencia) para cada paso. La tasa de transferencia escala algebraicamente con la distancia y

está en función de los pares base involucrados (Bixon & Jortner, 2001; Jortner et al., 1998).

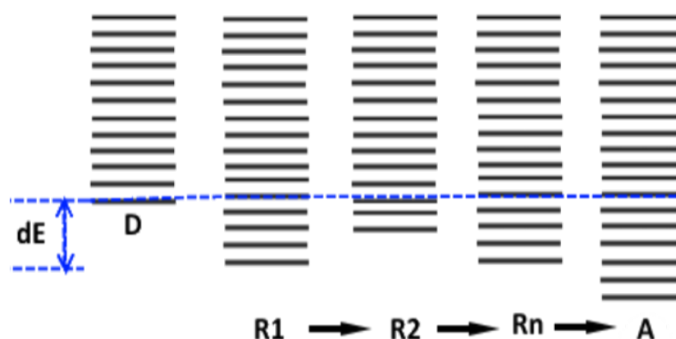


Figura 3: Diagrama de energía para la transferencia secuencial de electrones entre grupos *R* de residuos. En el modelo de salto la transferencia de electrones entre los aminoácidos puede ser endergónica, la diferencia energética se ilustra como dE .

En la Figura 3 se observa que el modelo de salto posibilita los pasos de transferencia de electrones de forma endergónica (Page, Moser, Chen, & Dutton, 1999).

Se han propuesto cadenas de transferencia similares con cofactores redox actuando como peldaños. Un ejemplo de ello es en la enzima fumarato reductasa en *E. coli*, donde presuntamente las agrupaciones de Fe-S actúan como cadenas transportadoras de electrones a más de 30 Å (Hudson et al., 2005).

Se ha encontrado en diversas proteínas que los electrones son transferidos a través de grandes distancias sin la ayuda de cofactores redox. Una enzima muy

estudiada es la ribonucleótido reductasa clase I (RNR), la cual es la encargada de catalizar la conversión de nucleótidos en desoxinucleótidos en todos los organismos y de esta manera provee un conglomerado balanceado de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) requeridos para la replicación y reparación del ADN (Jordan & Reichard, 1998).

En esta enzima, un electrón es transferido entre subunidades homodiméricas a través de una distancia mayor a 35 Å, desde un residuo de cisteína (Cys439) en el sitio activo de la subunidad R1 a un cofactor radical dihierro-tirosil (Tyr122) en la subunidad R2, y de esta manera se genera un radical tiol responsable de la actividad catalítica de la RNR (Figura 4) (Stubbe et al., 2003).

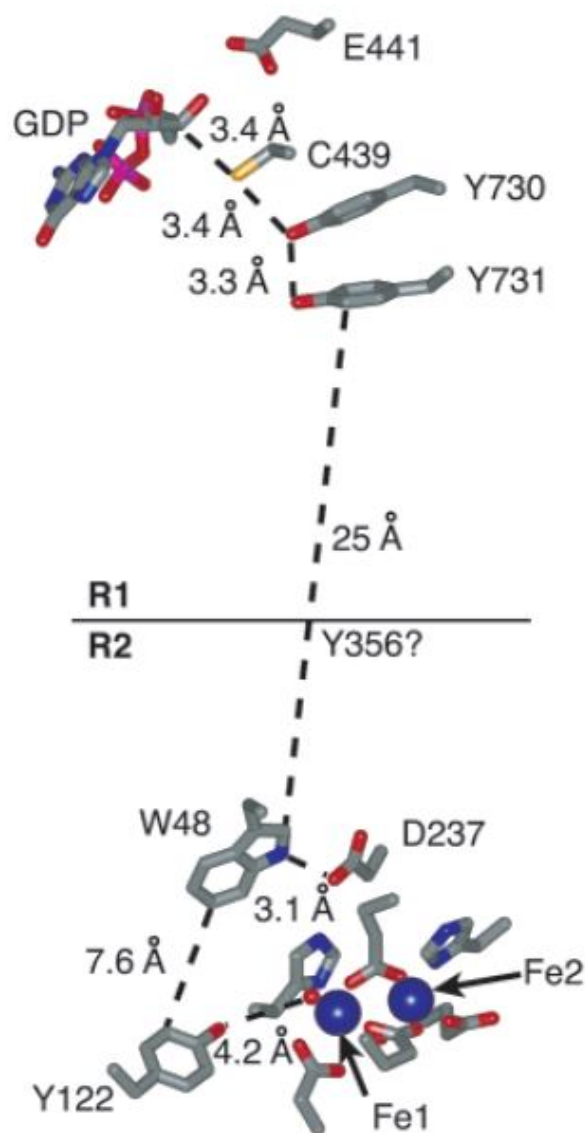


Figura 4: Residuos aromáticos que posiblemente participan en la transferencia electrónica entre R1 y R2. Se observa que la distancia entre Y731 en R1 y W48 en R2 es de 25 Å.

La transferencia electrónica por el mecanismo de tunelaje puede ser excluido, puesto que la transferencia sería lenta y limitaría la tasa de conversión de nucleótidos a $10^{-4} - 10^{-9} \text{ s}^{-1}$, mientras que el número de recambio (K_{cat}) observado para las RNRs clase I es de $2-10 \text{ s}^{-1}$ (Stubbe et al., 2003). Se propuso que la transferencia de electrones en esta enzima está mediada por residuos aromáticos (Ekberg et al., 1998; Rova, Adrait, Pötsch, Gräslund, & Thelander, 1999).

Estudios de mutagénesis *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los residuos aromáticos predichos en la Figura 4 son esenciales para la función enzimática (Chang, Yee, Nocera, & Stubbe, 2004). La sustitución de Tyr356 por residuos de tirosina fluoradas de una mayor potencial de oxidación, dan lugar a una pérdida de función enzimática (Seyedsayamdost, Yee, Reece, Nocera, & Stubbe, 2006). Estas pruebas demostraron que la energía necesaria para formar aminoácidos oxidables en el modelo de salto es el factor principal para que exista una transferencia electrónica.

Con base en lo anterior se puede decir que la transferencia de electrones a través de las proteínas puede ser explicada por el modelo de tunelaje en un solo paso o por un proceso multipaso de salto electrónico. La transferencia de electrones exhibe una dependencia lineal muy baja a la distancia y es altamente dependiente de los potenciales de oxidación de las unidades puente (peldaños). Los pasos endergónicos son posibles en transferencia de electrones secuencial (modelo de salto). El viaje del electrón es posible entre sitios rédox enlazados o

sin enlazar. Los cofactores metálicos son conocidos por asistir en la transferencia electrónica dentro de la matriz proteica. Sin embargo se ha visto que la TE es posible en ausencia de estos cofactores al utilizar a los residuos aromáticos como peldaños.

El objeto de estudio es la hidrogenasa [Ni-Fe] tolerante al O₂ de *Salmonella Typhimurium*, dicha estructura se obtuvo del banco de datos proteicos (PDB:4C3O). Con esta investigación se busca estudiar mediante métodos híbridos QM/MM a esta enzima para conocer las rutas de transferencia electrónica y mejorar la estabilidad catalítica y, por consiguiente, lograr un aumento en la síntesis de hidrógeno en condiciones aerobias. Por tanto, es de vital importancia estudiar la transferencia de electrones dentro de la hidrogenasa [Ni-Fe] ya que se relaciona directamente con la actividad catalítica en condiciones oxidantes.

2. HIPÓTESIS.

El estudio químico-computacional de las rutas de transferencia de electrones en la hidrogenasa [Ni-Fe] tolerante al O₂ de *Salmonella* Typhimurium por medio de métodos híbridos QM/MM ayudará a encontrar una mayor actividad catalítica y por consiguiente, un aumento en la síntesis de hidrógeno en condiciones aerobias.

3. OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar las rutas de transferencia de electrones en hidrogenasa [Ni-Fe] de *Salmonella* Typhimurium (PDB: 4C3O) mediante el estudio teórico por métodos QM/MM.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar los estados de protonación de la proteína al pH de trabajo mediante el algoritmo propka.
- Estudiar los posibles cambios conformacionales de la proteína a través de dinámica molecular.
- Medir la Raíz cuadrada media de la fluctuación (RMSF) y la Raíz cuadrada media de la desviación (RMSD) de la estructura proteica.

-Determinar las rutas individuales de transferencia de electrones a través del estudio híbrido de mecánica cuántica con mecánica molecular (QM/MM).

4. METODOLOGÍA.

4.1 Preparación de la enzima

Las coordenadas iniciales de la proteína fueron tomadas de la estructura cristalina de la hidrogenasa [Ni-Fe] tolerante el O₂ de *S. enterica* obtenida del banco de datos proteicos (PDB: 4C3O).

La proteína fue preparada con la subrutina “*protein preparation wizard*” incluida en el paquete Maestro v9.5. Esta subrutina se encarga de buscar defectos en la estructura, es decir, busca cadenas laterales incompletas, impedimento estérico, átomos no reportados, y de manera particular, ayuda en la asignación del pKa con la implementación del algoritmo de *propKa* (Li, Robertson, & Jensen, 2005). El algoritmo *propka* predice automáticamente los valores de pKa de los aminoácidos ionizables dentro de la matriz proteica, toma en cuenta los efectos de solvatación e interacciones intra-proteicas las cuales causan variaciones en los valores de pKa.

Posteriormente, la proteína se incluyó en un cubo de moléculas de agua tipo SPC (Simple Point Charge model) las cuales son moléculas de agua modeladas como tres centros de carga concentrada: carga positiva perteneciente a los

hidrógenos y una negativa del oxígeno. Las dimensiones de la caja de solvatación fueron de 10 Å por lado, y se neutralizó el sistema adicionando 54 iones sodio. Es importante neutralizar el sistema ya que si dejamos los iones podríamos causar una sobre-expresión en la energía electrostática de la dinámica, lo que provoca resultados erróneos.

4.2 Dinámica molecular

Se realizaron cálculos de recalentado simulado (*Simulated annealing*) en la herramienta computacional llamada Desmond y los análisis con Maestro (Maestro-Desmond Intercomperability Tools, Schrodinger, NY). Este estudio de temperatura se utilizó para relajar a la proteína antes de la dinámica de producción, este paso súbito de temperatura (400K) hace que se relaje la proteína y al bajar a 300K tenga la oportunidad de reorganizarse de manera haya una probabilidad de que alcance un mínimo local, o en su defecto un mínimo global energético, a esta etapa se le llama "equilibrado". En este paso se utilizó dinámica newtoniana (integrando las ecuaciones de movimiento de newton) con el objetivo de producir una trayectoria de las coordenadas de las partículas, velocidades y energías.

En las DM se utilizó un campo de fuerza OPLS_2005 (*Optimized Potentials for Liquid Simulations*) especialmente diseñado para simulaciones en líquido o solvente explícito (Banks et al., 2009).

Se emplearon condiciones periódicas de frontera bajo con un colectivo NpT, a presión y temperatura constante (1 atm y 300K respectivamente). Las condiciones periódicas de frontera se utilizan dado que la proteína tiene un movimiento aleatorio (browniano) dentro del fluido, y la superficie proteica es sometida incesantemente a la fuerza de las moléculas del fluido que son agitadas por el tratamiento térmico durante la dinámica molecular. Dicho bombardeo a veces no es uniforme y ocasiona que la enzima tenga movimientos de traslación importantes, los cuales provocan que la proteína salga de la caja de agua. Para evitar errores en el tratamiento estadístico de la dinámica molecular, es necesario repetir esa celda unitaria o caja de simulación en todas las direcciones de manera que funcionen como espejos, para que cuando la enzima pase a través de una cara de la celda, vuelva a aparecer en la cara opuesta con la misma velocidad.

En el cálculo de las interacciones de largo alcance (electrostáticas) se empleó un radio de corte de 12 Å, esta distancia asegura que un átomo no es afectado por otro en términos de energía electrostática.

El protocolo de *Simulated annealing* se llevó a cabo en 6 pasos: el sistema completo se calienta secuencialmente, de 0K a 10K por 30 ps, de 10K a 100K por 100 ps, de 100K a 300K por 200ps, de 300K a 400K por 300 ps, 400K por 500 ps y finalmente temperado a 300K por 1000 ps.

Posteriormente se produjo una simulación de 20 ns con un tiempo de integración de 1 fs. Todos los análisis fueron realizados usando las trayectorias

y energías calculadas cada 1ps, este tiempo de integración es el mínimo que se debe utilizar para no perder información vibracional de los átomos.

4.3 Cálculos QM/MM para vías de transferencia de electrones.

Se adicionó un borde de agua de 6 Å a los átomos del sistema, este parámetro puede variar ya que es solo para evitar cambios conformacionales en la superficie asociadas al vacío. Los cálculos QM/MM se realizaron con el módulo Qsite de Schrödinger (<http://www.schrodinger.com/>). Este módulo permite dividir en dos subsistemas la enzima: el subsistema mecánico cuántico y el subsistema mecánico molecular tratado con métodos de campo de fuerza.

Primeramente, se seleccionaron los residuos que fueron tratados con mecánica cuántica y se agregó un electrón al sistema, se calculó la densidad de espín de dicha región y se obtuvo el residuo que estabilizó mejor al electrón (mayor densidad de espín). La densidad de espín es la probabilidad de encontrar al electrón en cierto átomo de la región tratada con métodos cuánticos, por lo tanto, se suman las probabilidades de cada uno de los átomos pertenecientes a un aminoácido, de esta manera se puede saber en qué aminoácido pasa mayor tiempo el electrón y establecer si dicho aminoácido es parte de la ruta de transferencia de electrones. El resto del sistema fue calculado con mecánica molecular (Figura 5a). Para separar el subsistema tratado con métodos cuánticos del subsistema tratado con mecánica molecular se utilizó el método

de “Link atom”. Este método consiste en romper un enlace covalente para delimitar la región QM de la MM, para que la región QM este electrónicamente completa, esto es, no es posible dejar enlaces desconectados, por lo tanto se adiciona un átomo artificial en la frontera del sistema QM. El átomo artificial que se utiliza es el hidrogeno ya que es práctico y simple.

Para el siguiente ensayo de transferencia electrónica se seleccionó al residuo candidato (el que obtuvo mayor densidad de espín), el cual fue calculado por métodos de mecánica molecular (Figura 5b). Los residuos vecinos unidos covalentemente o en los que se traslapaban sus orbitales con dicho residuo fueron tratados con mecánica cuántica, de esta manera se pudo determinar la densidad de espín de las vías y determinar la más probable. Se puede utilizar el programa Maestro v9.5 para saber si los orbitales se traslapan, por medio de la herramienta que despliega gráficamente el radio de Van der Waals.

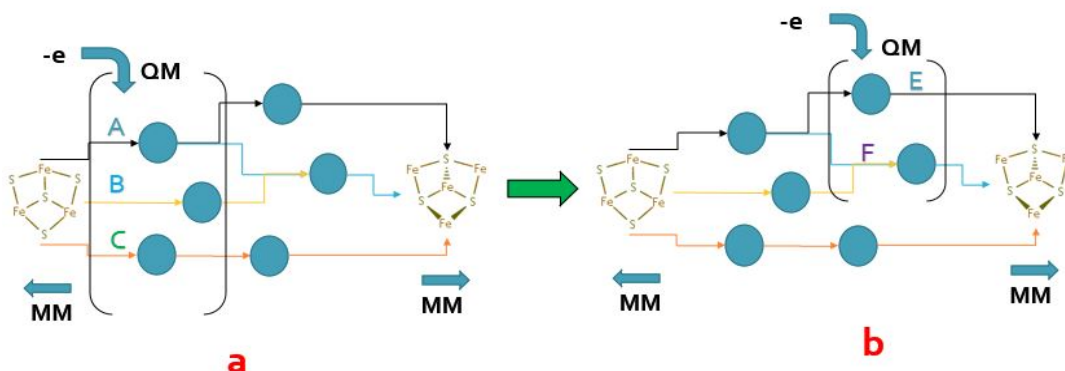


Figura 5: Metodología QM/MM Et-pathway, para la caracterización de rutas de transferencia electrónica.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y MATEMÁTICO PROPUESTO.

Los siguientes métodos son utilizados para tratar estadísticamente los datos obtenidos por la dinámica molecular.

5.1 Raíz cuadrada media de la desviación (RMSD)

El desplazamiento de átomos o grupos de átomos a través de una trayectoria puede ser estimado al calcular la RMSD. Esto se hace a partir de la superposición de una estructura de referencia de la proteína con una estructura a un cierto tiempo de la simulación. Este método indica las divergencias o similitudes entre las coordenadas proteicas y utiliza un algoritmo de ajuste de mínimos cuadrados como se muestra en la ecuación (Ec. (7)).

$$RMSD(t) = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^N |\vec{r}_i(t) - r_i^0|^2}{N}} \quad (7)$$

Donde $|\vec{r}_i(t) - r_i^0|$ es el desplazamiento del átomo i^{th} a un tiempo t de su posición de referencia r_i^0 , dichas coordenadas de referencia son obtenidas del cristal. Un incremento de la RMSD indica que la proteína se mueve a una conformación diferente de la estructura inicial.

5.2 Raíz cuadrada media de la fluctuación (RMSF)

La RMSF es la fluctuación o movimiento que tienen cada uno de los residuos dentro de una proteína a través de un tiempo de simulación molecular y determina el grado de flexibilidad que posee cada residuo. La RMSF es la raíz cuadrada media de la fluctuación de un conjunto de residuos asignados a través de todo el tiempo, después de sobreponer una estructura de referencia. Esto se calcula de acuerdo con la ecuación (Ec. 8).

$$RMSF_i = \sqrt{\langle (\vec{r}_i - \langle \vec{r}_i \rangle)^2 \rangle} \quad (8)$$

Donde $\vec{r}_i$ es la posición del vector del átomo i^{th} (obtenido por dinámica molecular) y los corchetes indican que es por un promedio temporal. Este análisis da una idea de las regiones con mayor movilidad de la proteína.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 Determinación de los estados de protonación de la proteína al pH de trabajo.

Para este objetivo, se preparó la proteína con el asistente de preparación dentro del programa Maestro 9.5, se determinaron los estados de protonación de todos los residuos de la hidrogenasa [Ni-Fe] a un pH 7 mediante el algoritmo *propka*,

6.2 Estudio de los posibles cambios conformacionales de la proteína a través de Dinámica Molecular.

Se solvató a la proteína incluyéndola en una caja de agua de 10 Å ya que esta dimensión es la mínima necesaria para llevar a cabo la simulación dicha representación se muestra en la Figura 6, y se adicionaron 54 iones Na⁺ para que ésta tuviera una carga global de cero. Para la simulación se utilizó un campo de fuerza OPLS_2005 con un colectivo NPT (presión constante de 1 atm y una temperatura constante de 300K), donde todas las interacciones de largo alcance se calcularon con un límite de 12 Å.

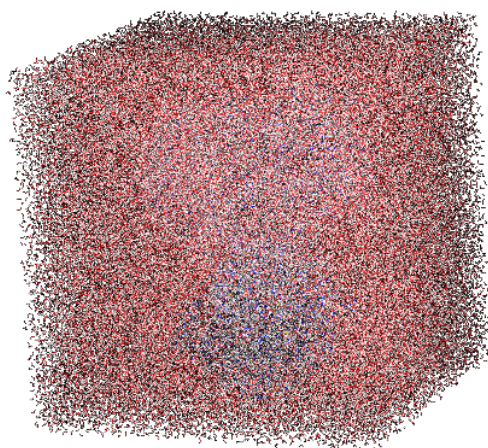


Figura 6: *Hidrogenasa [Ni-Fe] solvatada en una caja de agua de 10 Å (en todas las direcciones).*

Fue necesario dejar a las agrupaciones de hierro y azufre con una constante de fuerza de 1000 Kcal/mol*Å² (inmóviles) ya que en el caso contrario estos tenían un movimiento de translación muy alto, haciendo difícil el análisis estadístico de la dinámica molecular.

El recalentado simulado (*simulated annealing*) se llevó a cabo en los 6 pasos antes mencionados, con un tiempo de integración de 1fs. Se obtuvo una simulación de 20ns. Se obtuvieron datos como las energías potencial, cinética, y total (Figura 7) de cada estructura proteica de la simulación.

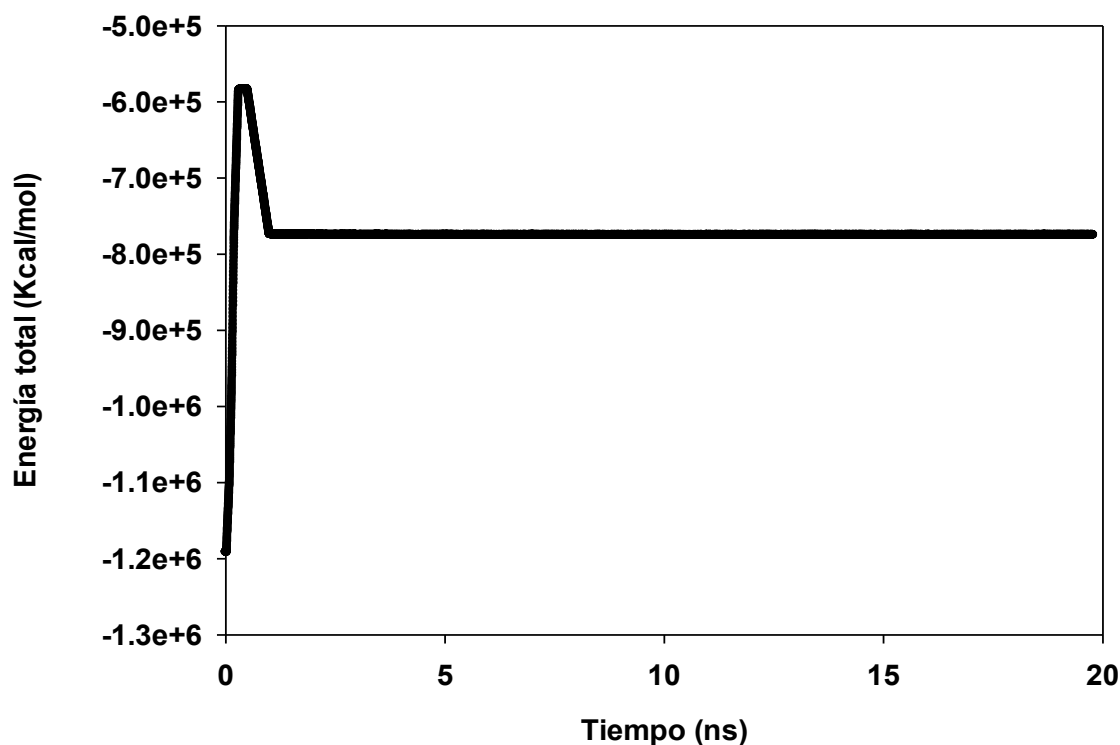


Figura 7: *Energía total (Kcal/mol) de la hidrogenasa [Ni-Fe] a través de la simulación.*

En la Figura 7 se observa un incremento de la energía total de la hidrogenasa [Ni-Fe] entre 200-700ps debido a un incremento de la temperatura de 300K a 400K que luego bajó a 300K en 1000ps y se mantuvo en 300K el resto de la simulación. Esto es como resultado del incremento en la energía cinética de las moléculas con la temperatura, durante la simulación se observa un solo estado conformacional de la proteína ya que la desviación es baja.

Se analizaron las trayectorias durante 20 ns de la simulación calculando la RMSD (Root Mean Square Deviation) de carbonos alfa de la hidrogenasa [Ni-Fe]

como se muestra en la Figura 8.

Al inicio de la trayectoria ($t=0$), la RMSD arrojó un valor de 1.7 Å indicando el movimiento proteico durante periodos de equilibrado térmico.

Se puede observar que a partir de los 2 ns hay un incremento de la desviación hasta un punto máximo a los 8.2 ns, donde se observa una desviación de 2 Å y después baja y se normaliza. A los 14 ns se observó un incremento sostenido de la desviación hasta terminar la simulación ($t=20\text{ns}$).

Este comportamiento indica que no hay movimientos de translación importantes de los carbonos alfa durante toda la simulación. Debido a cambios en la temperatura es posible ver un incremento en la desviación, aquí no se observa un plegamiento de la proteína.

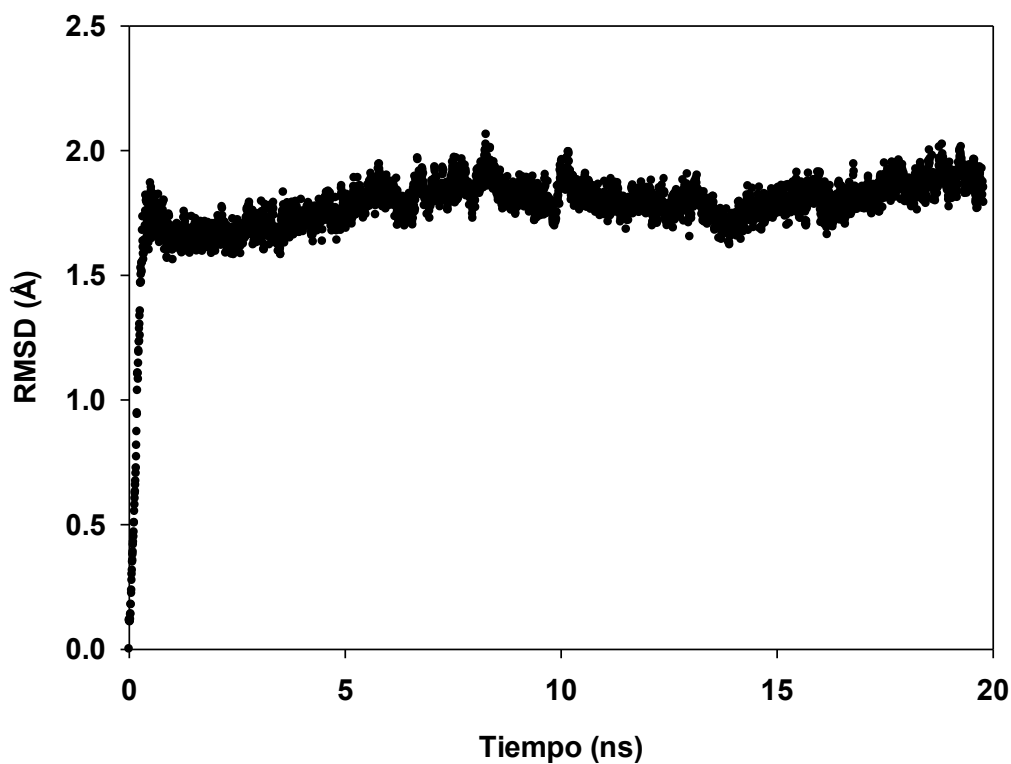


Figura 8: La RMSD de los carbonos alfa de hidrogenasa [Ni-Fe] vs el tiempo de simulación.

Se calculó la RMSF para cada residuo de la hidrogenasa [Ni-Fe], para calcular la flexibilidad de los residuos del sistema durante la trayectoria en función de la temperatura como se observa en la Figura 9.

Se puede observar un incremento en las fluctuaciones entre los residuos 319 – 406, estos son parte de hojas beta que se localizan en la subunidad mayor de la hidrogenasa [Ni-Fe] éstos tienen un índice hidropático muy bajo, lo que indica que es posible que se encuentre al exterior de la proteína en contacto con el solvente acuoso. Asimismo se observan bajas fluctuaciones en los residuos

215-250, los cuales son parte de alfa hélices con un índice hidropático alto, lo cual sugiere que son residuos inmersos en la matriz proteica. Esto toma sentido ya que se ha especulado que los residuos que componen las rutas de transferencia de electrones, presenta conformaciones muy rígidas o de baja movilidad proteica. Bajo esta lógica se pueden considerar los residuos con menor fluctuación como posibles partícipes de la transferencia de electrones a través de la matriz proteica.

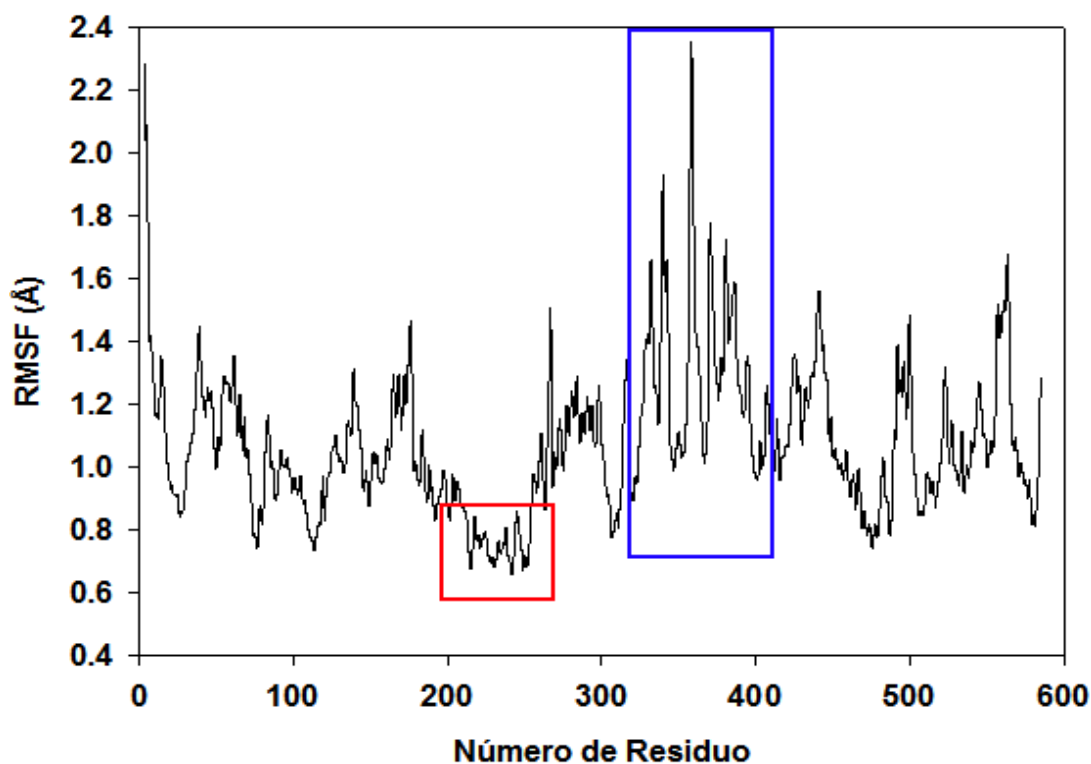


Figura 9: La RMSF de los carbonos alfa de la hidrogenasa [Ni-Fe] en angstroms. En el recuadro de color rojo están los aminoácidos que presentaron menor fluctuación (215-250) y en el recuadro azul los de mayor fluctuación (319-406) durante el tiempo de simulación.

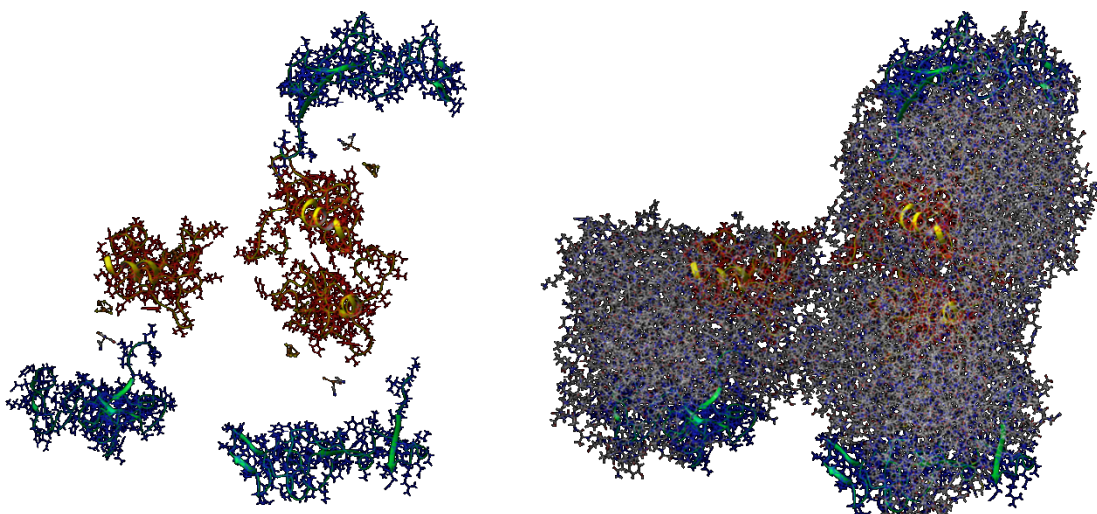


Figura 10: Representación de la RMSF de la hidrogenasa [Ni-Fe] donde las zonas azules representan los residuos de mayor fluctuación (residuos del 319 al 406) y las zonas rojas son los residuos de menor fluctuación (residuos del 215 al 250).

Con el programa Maestro 9.5 se observaron que las regiones de menor fluctuación están próximas o envolventes al sitio activo y a las agrupaciones de Fe-S (Figura 10). Esto reafirma el hecho de que las rutas de transferencia electrónica están bien definidas dentro de la matriz proteica.

Se midieron las distancias entre las agrupaciones de Fe-S para observar la rigidez de la zona en la cual están inmersos.

En la Figura 11 se observan las fluctuaciones en la distancia entre las agrupaciones Fe-S y éstas con el sitio activo. Se comprobó que no varían significativamente y esto es porque dichos cofactores metálicos están inmersos

en regiones de la proteína que son rígidas.

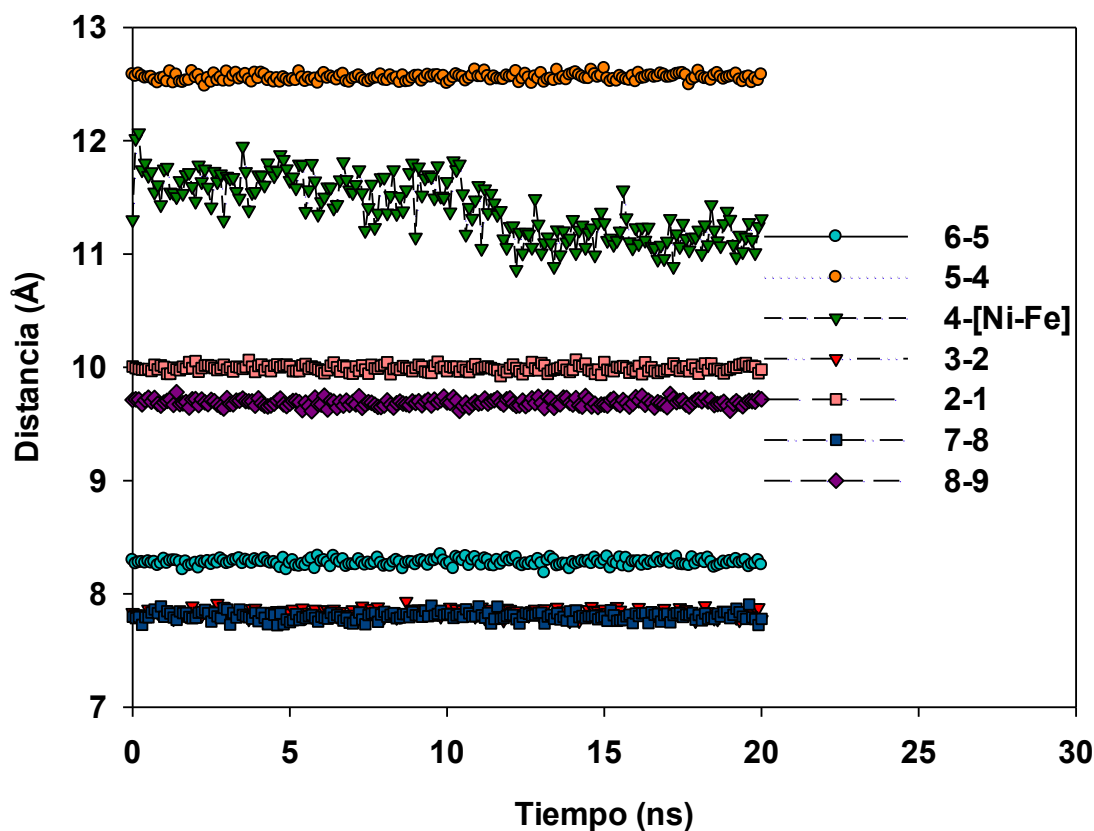


Figura 11: Cambios en la distancia entre agrupaciones de Fe-S en hidrogenasa [Ni-Fe] durante 20ns. Las etiquetas se observan los números de las agrupaciones Fe-S entre los cuales fue medida la distancia.

En la Tabla I se aprecia la distancia media ($\bar{X}$ (Å)) y su desviación estándar (σ (Å)), lo que señala que las distancias entre las agrupaciones Fe-S durante el tiempo de simulación (20ns) están en el intervalo de 7.8 a 11.4 Å. Se presentó una desviación de 0.269 en la distancia entre la agrupación [Fe₄S₃] y el sitio activo [Ni-Fe], esto pudo deberse a que se encontró que los residuos aledaños

al sitio activo son de cadena corta y tienen capacidad de formar enlaces de hidrógeno con el agua lo cual les permite un mayor movimiento en el medio acuoso.

Tabla I: Distancias medias entre las agrupaciones de Fe-S.

Agrupación Fe-S	$\bar{X}$ (Å)	σ (Å)
1-2	8.28	0.026
2-3	12.6	0.028
4-Sitio activo	11.4	0.269
4-5	7.83	0.031
5-6	9.99	0.028
7-8	7.80	0.035
8-9	9.69	0.029

6.3 Determinar las rutas individuales de transferencia de electrones a través del estudio híbrido QM/MM.

Después del muestreo conformacional, se identificaron los residuos potencialmente importantes para la transferencia de electrones. Para este propósito, se utilizó un procedimiento para seguir los residuos con alta afinidad electrónica en el área de transferencia.

La región MM incluyó todos los residuos alrededor de la región QM, usando la aproximación de *link atom* (hydrogen cap) que permite el intercambio de la

información entre las regiones QM y MM sin afectar la distribución de cargas de los residuos. Los cálculos híbridos QM fueron resueltos empleando la aproximación de campo auto consistente (SCF, Self consistent Field por sus siglas en inglés) para resolver la función de onda por métodos *ab initio*. El cual es un proceso iterativo donde se da una función de onda inicial que describe la energía del sistema de manera aproximada.

La minimización de esta energía inicial con respecto a ciertos parámetros que presenta la función de onda permitirá una minimización de la energía que describe el sistema, este proceso iterativo finaliza cuando el campo es "autoconsistente", es decir cuando en dos iteraciones seguidas se obtiene el mismo valor de la energía, dicho procedimiento se realiza para todos los electrones del sistema.

La región cuántica fue tratada con el método DFT con espín no restringido, ya que el sistema es de capa abierta (por la presencia de electrones desapareados o radicales). En un sistema la configuración electrónica puede ser de capa cerrada o capa abierta, para el caso de capa cerrada, cuando tenemos $n/2$ orbitales moleculares ocupados por n electrones, la mitad de ellos tienen espín $+1/2$ y la otra mitad $-1/2$. En el caso de la capa abierta podemos tener un solo valor de espín (sea $+1/2$ o $-1/2$), lo que ejemplifica el caso de un electrón desapareado (Blinder, S., 2004).

Este método DFT empleó el método B3LYP (Becke, three-parameter, Lee-Yang-Parr), con las funciones bases 6-31G (d). Estas funciones base resuelven

la función de onda tomando en cuenta electrones en orbitales *d* combinándolos con los orbitales para corregir los ángulos de enlaces, así como la polarización que ejercen estos electrones. El método DFT es empleado ampliamente en sistemas bio-inorgánicos por describir propiedades electrónicas y atómicas como energías potenciales, distancia de enlace y frecuencias vibracionales con alta precisión.

Los átomos de los elementos químicos C, N, O, S y H fueron tratados con la función base antes mencionada. Todos los cálculos se realizaron para determinar la densidad de espín alrededor de los átomos a través del análisis de poblaciones de Mülliken, el cual fue resuelto mediante la diferencia de la matriz de datos de la densidad de los electrones alfa y la densidad de los electrones beta (Mulliken, 1955).

Dentro de la matriz proteica se encuentran cofactores metálicos de FeS y sitio activo de [Ni-Fe]. En la enzima hidrogenasa [Ni-Fe] se observan tres tipos de configuraciones FeS de acuerdo a la cantidad de iones metálicos que pudieran contener dichos cofactores, los cuales son: Fe₄S₄, Fe₃S₄ y Fe₄S₃. Estos están alineados en forma de peldaños para la transferencia electrónica al sitio activo [Ni-Fe].

Este papel electrónico que toman los cofactores metálicos se ha observado en otras enzimas; un ejemplo de ello es en la enzima fumarato reductasa en *E. coli*, donde presuntamente las agrupaciones de Fe-S actúan como cadenas transportadoras de electrones a más de 30 Å (Hudson et al., 2005).

Se analizaron 9 regiones dentro de la enzima hidrogenasa [Ni-Fe] las cuales están entre los cofactores de Fe-S y éstos con el sitio activo de la enzima. Se les asignó un número a los cofactores metálicos y a las regiones a estudiar para su cálculo, como se muestra en la Figura 12.

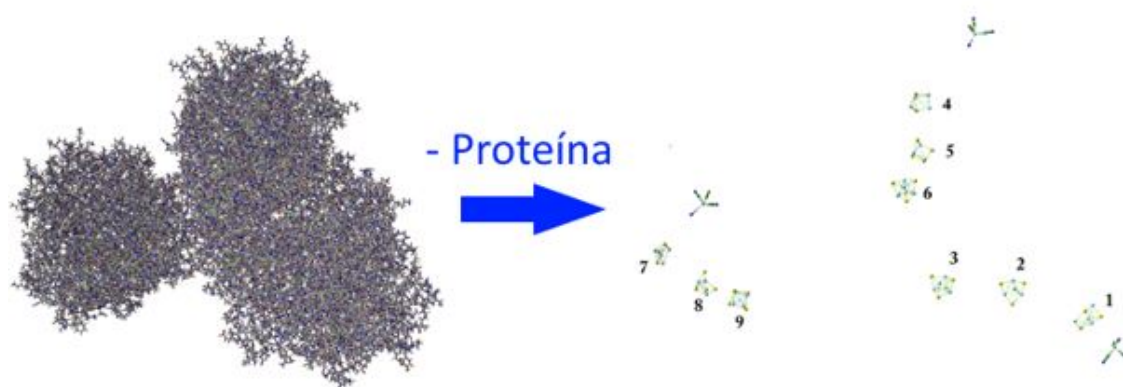


Figura 12: Agrupaciones (clusters) Fe-S enumerados dentro de la matriz proteica de la enzima hidrogenasa [Ni-Fe] de *Salmonella Typhimurium*.

El algoritmo *Et-pathway* permitió identificar aquellos residuos que pueden localizar mayor densidad de espín entre el donador y el aceptor, al incluir en el experimento un electrón extra en su análisis cuántico, es necesario agregar ese electrón al sistema, porque nuestro sistema es en un principio de capa cerrada. Se aumentó la región cuántica inicial de manera progresiva agregando residuos, de este modo se descubrió la ruta que seguiría el electrón, por medio del

cálculo de la densidad de espín.

Al finalizar los experimentos se observó que los residuos que participan entre las agrupaciones Fe_3S_4 y Fe_4S_3 son los mismos, aunque la cadena peptídica circundante a esta área cambie, esto se verificó visualmente en el programa Maestro v9.5.

Lo mismo sucede entre las agrupaciones Fe_4S_4 y Fe_3S_4 , y Fe_3S_4 con el sitio activo [Ni-Fe]. Asimismo dichos cofactores están en zonas rígidas de la proteína como se comprobó en el análisis de la RMSF de la dinámica molecular. Esto sugiere que es posible que las rutas de transferencia sean conservadas, y no presenten cambios significativos como producto de una respuesta a su ambiente.

Debido a este patrón solo se muestran las posibles participaciones de los residuos en tres regiones de la proteína y por consiguiente la caracterización de rutas entre: la agrupación 7 y el sitio activo [Ni-Fe], agrupación 6 y 5 y por último los residuos entre la agrupación 2 y 1 (tomar como referencia la Figura 12).

Como se observa en la Tabla II, los residuos que participan en la transferencia electrónica entre las agrupaciones o clústeres FeS 3-2, 9-8 y 6-5 son los mismos; así como para las agrupaciones FeS 2-1, 5-4 y 8-7, y de la misma forma entre el clúster FeS 7-[Ni-Fe], 1-[Ni-Fe] y 4-[Ni-Fe].

Tabla II: Residuos pertenecientes a las rutas de transferencia electrónica.

Regiones	Ruta 1	Ruta 2
7-[Ni-Fe] 1-[Ni-Fe] 4-[Ni-Fe]	Arg74 → Cys79	His229 → Pro230 → Trp232 → Glh73 → Thr80 → Cys79
2-1 5-4 8-7	Lys226 → Asn227 → His229	Trp235 → Pro150 → Cys149
3-2 9-8 6-5	Pro224 → Thr225 → Tyr227 → Asn228 → Cys230	His187 → Arg185 → Tyr227 → Asn228 → Cys230

6.3.1 Región analizada entre una agrupación y el sitio [Ni-Fe].

De acuerdo a lo anteriormente dicho, se tomó como agrupación ejemplo el clúster contenido por 7-[Ni-Fe] y como primer paso se analizaron los residuos a un radio de 3 Å de la agrupación Fe₄S₃ próximo al sitio [Ni-Fe] de la enzima, los cuales comprendían Arg74, His229 y las cisteínas coordinando con los iones metálicos de la agrupación.

His229 obtuvo una probabilidad de alojar el electrón de 51.6% y Arg74 un 48.4%, por lo tanto se escogieron ambos residuos para continuar con la ruta. En la Ruta 1 la Arg74 se conecta por medio del esqueleto proteico a Cys79 la cual coordina con el ion Fe⁺² del sitio activo [Ni-Fe] como se puede observar en la Figura 13. El electrón llega hasta el sitio activo por un efecto de transferencia de carga.

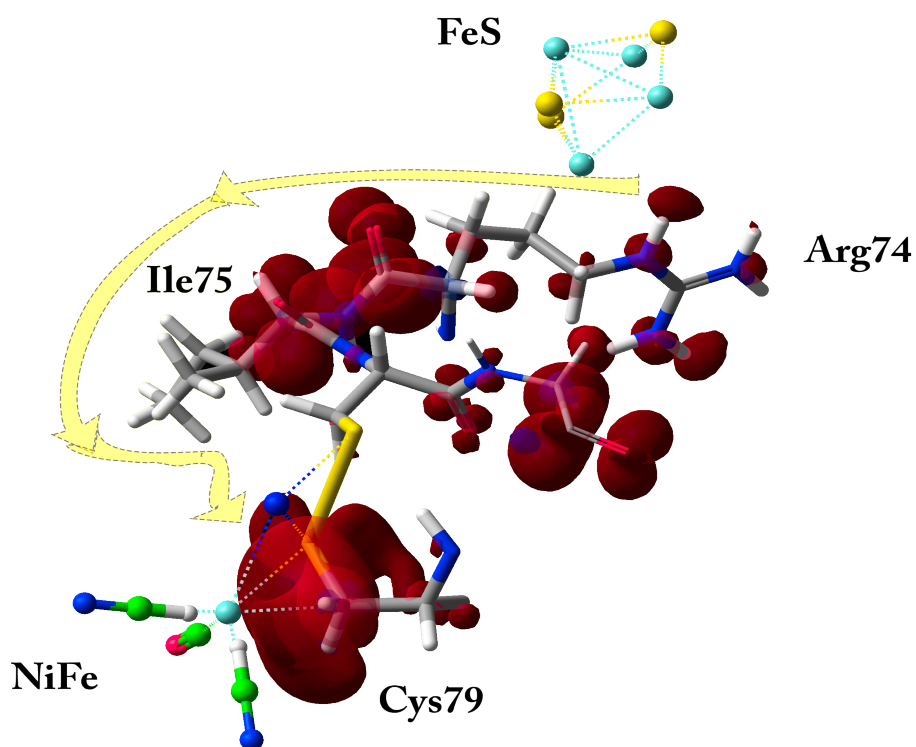


Figura 13: Ruta 1 de la region c17c, estudiada por QM/MM Et-pathway. Las flechas esquematizan los residuos donadores. La densidad de espín se esquematiza en color rojo.

En la Figura 14 se muestra la segunda ruta de transferencia de electrones, la cual considera al residuo His229 como donador inicial, transfiriendo al electrón a Pro230 hasta llegar a Trp232, el cual se sabe que puede alojar la carga, de manera localizada, debido al efecto de resonancia en el anillo aromático. Se considera la posibilidad de transferencia por tunelaje desde Trp232 hasta Glh73 y Thr80, puesto que estos dos últimos están a 2 Å del anillo aromático de Trp232.

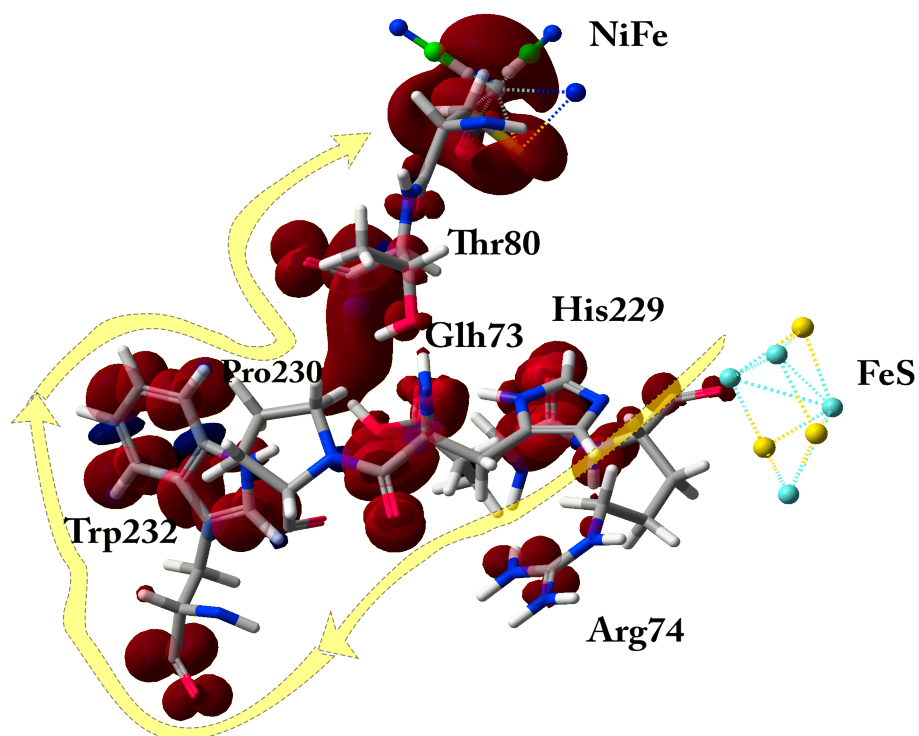


Figura 14: Ruta 2 de la región c17c, estudiada por QM/MM Et-pathway. Las flechas esquematizan los residuos donadores y la dirección de la donación. La densidad de spin se esquematiza en color rojo.

Se calculó una probabilidad de 57.12% para Glh73 y de 42.88% para Thr80, de esta manera se comprueba que el electrón salta entre cadenas laterales de ambos residuos como está descrito en el modelo de salto (hopping) del electrón (Page et al., 1999).

Es posible que de manera directa por el esqueleto proteico la Arg74 done a Glh73. El electrón llega a Cys79 y por medio de transferencia de carga llega al sitio activo [Ni-Fe].

6.3.2 Región analizada entre la agrupación 6 y el 5.

Para iniciar el análisis de la región se realizó un experimento QM/MM de los residuos a 3 Å de la agrupación Fe_4S_4 , los cuales comprendían los residuos Pro224, His187 y cisteínas coordinando al ion Fe^{+2} de la agrupación. Se obtuvo una densidad de espín de 64% para Pro224 y de 36% para His187. Se escogieron ambos residuos para trazar la ruta.

En la Figura 15 se observa la Ruta 1, donde la Pro224 transfiere carga a Thr225 por medio del esqueleto y este último a Thr226 hasta Tyr227, el cual es un fuerte componente resonante o de dobles enlaces conjugados en la ruta. La carga llega hasta Cys230 la cual coordina con un ion de Fe^{+2} en la agrupación Fe_3S_4 por medio de transferencia de carga.

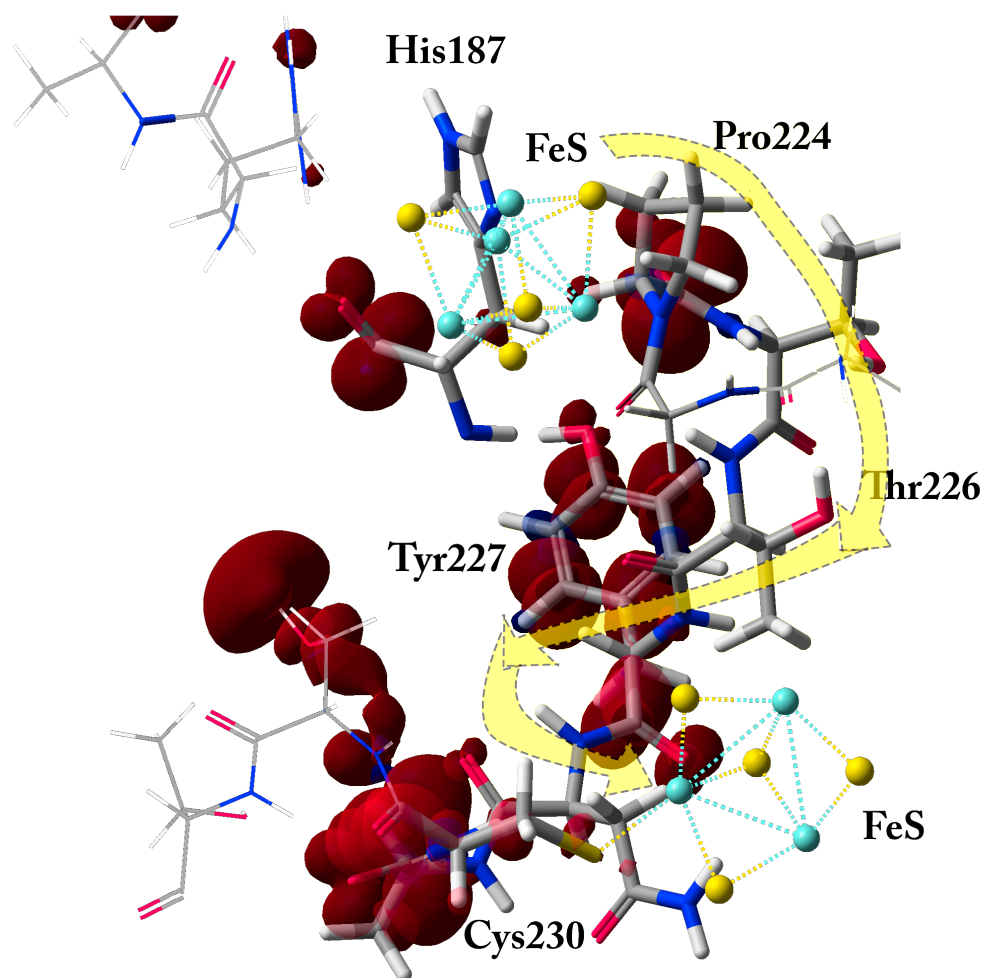


Figura 15: Ruta 1 de la región c165 estudiada por QM/MM et-pathway. Las flechas esquematizan los residuos donadores. La densidad de spin se esquematiza en color rojo.

En la Figura 16 se observa la Ruta 2, donde la His187 dona carga a Arg185 por medio del esqueleto proteico. Se considera la posibilidad de transferencia del electrón por traslape de los orbitales de Arg185 con Tyr227 ya que al momento de desplegar los radios de Van der Waals de dichos aminoácidos, estos se

traslapaban. Dichos aminoácidos promueven la deslocalización de la densidad de espín al residuo Asn228 hasta Cys230 la cual está coordinada con la agrupación Fe_3S_4 . Se observó que los residuos que estaban en medio de las agrupaciones son Isoleucinas o Valinas, los cuales no tienen capacidad de alojar carga y actúan como una resistencia al paso de electrones. Esto fue demostrado, cuando no fue observada densidad de espín en estos residuos.

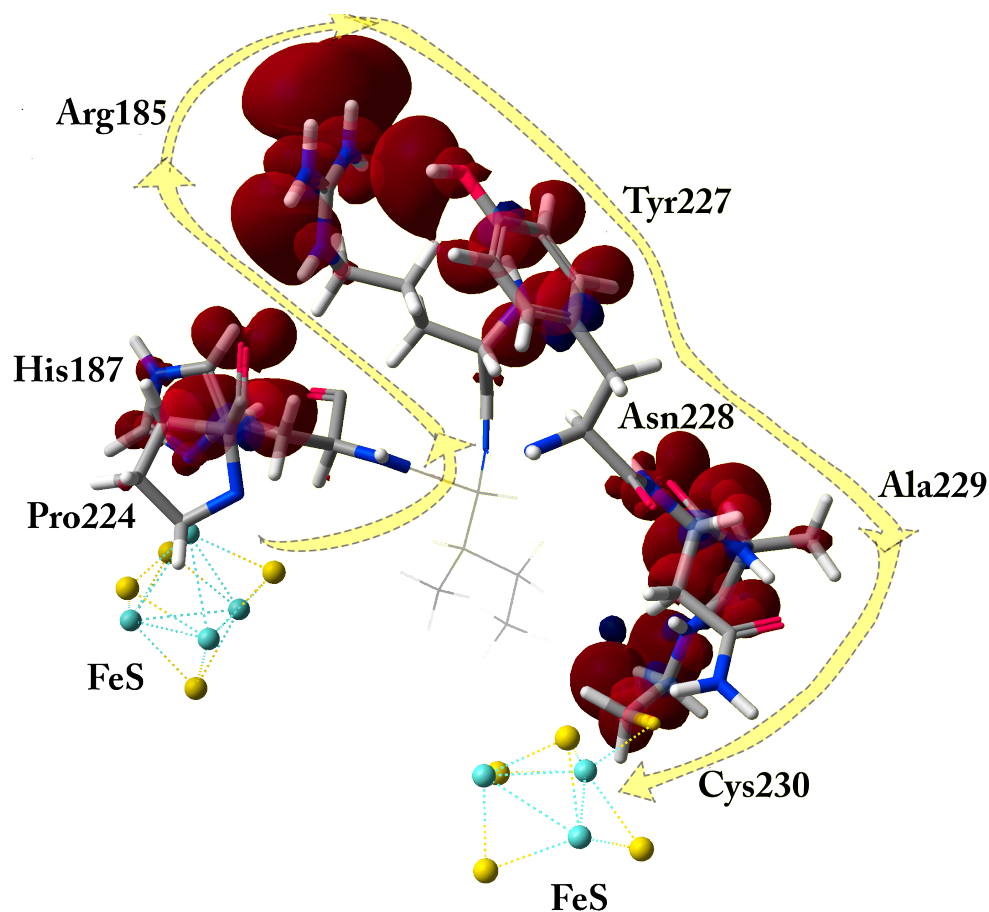


Figura 16: Ruta 2 de la región cl65 estudiada por QM/MM et-pathway. Las flechas esquematizan los residuos donadores. La densidad de spin se esquematiza en color rojo.

6.3.3 Región analizada entre el clúster 2 y 1.

Para iniciar el análisis de la región se realizó un experimento QM/MM de los residuos a 3 Å del clúster Fe_3S_4 , los cuales comprendieron los residuos Trp235, Lys226 y cisteínas coordinando al ion Fe^{+2} del clúster. Se obtuvo una densidad de espín de 54% para Trp235, 31% para Lys226 y Cys252 con 15%. Se escogieron los residuos Trp235 y Lys226 por poseer la mayor probabilidad de alojar el electrón para trazar la ruta.

En la Ruta 1 de la región cl21 (Figura 17) se consideró al residuo Lys226 como primer contribuyente a la ruta de transferencia electrónica, promoviendo la deslocalización de espín a Asn227 como se muestra en la Figura 16, después llega a His 229 donde se estabiliza la carga gracias al efecto de resonancia del anillo aromático, dicho anillo está coordinado con un ion Fe^{+2} del clúster Fe_4S_3 , el cual funge como el aceptor final de electrones.

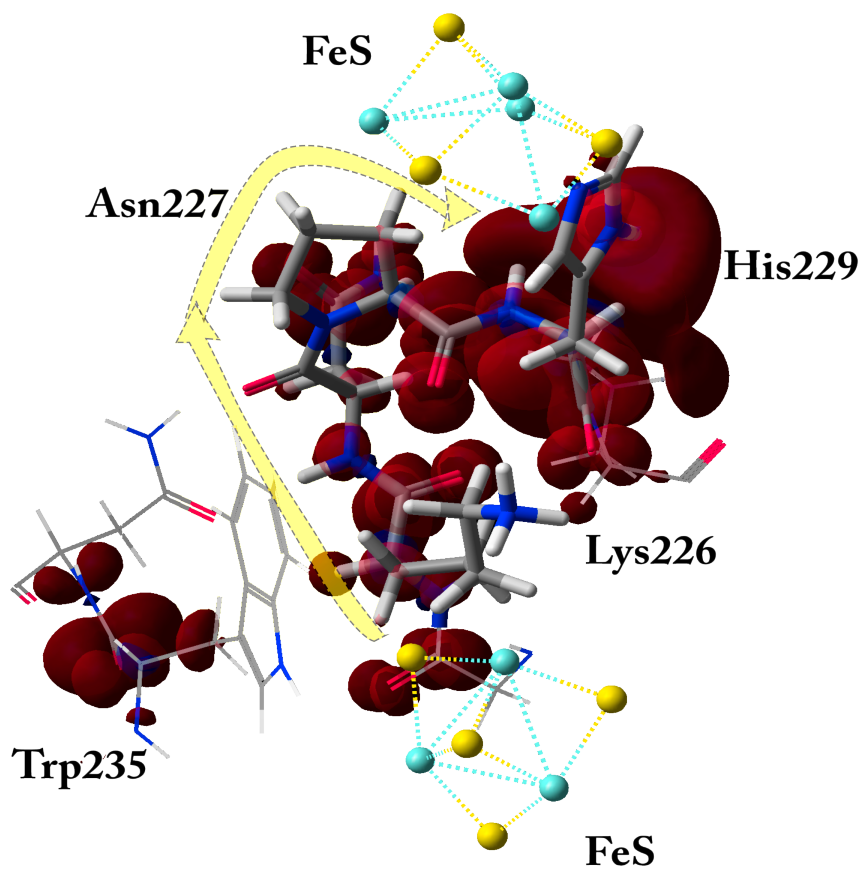


Figura 17: Ruta 1 de la región cl21 estudiada por QM/MM et-pathway. Las flechas esquematizan los residuos donadores. La densidad de spin se esquematiza en color rojo.

En la Figura 18 se observa la Ruta 2, en la cual se toma como residuo donador de carga inicial al Trp235 el cual puede deslocalizar densidad de espín hacia Pro150 que está a 2 Å. La Pro150 transfiere carga a Cys149, la cual coordina con el clúster Fe_4S_3 .

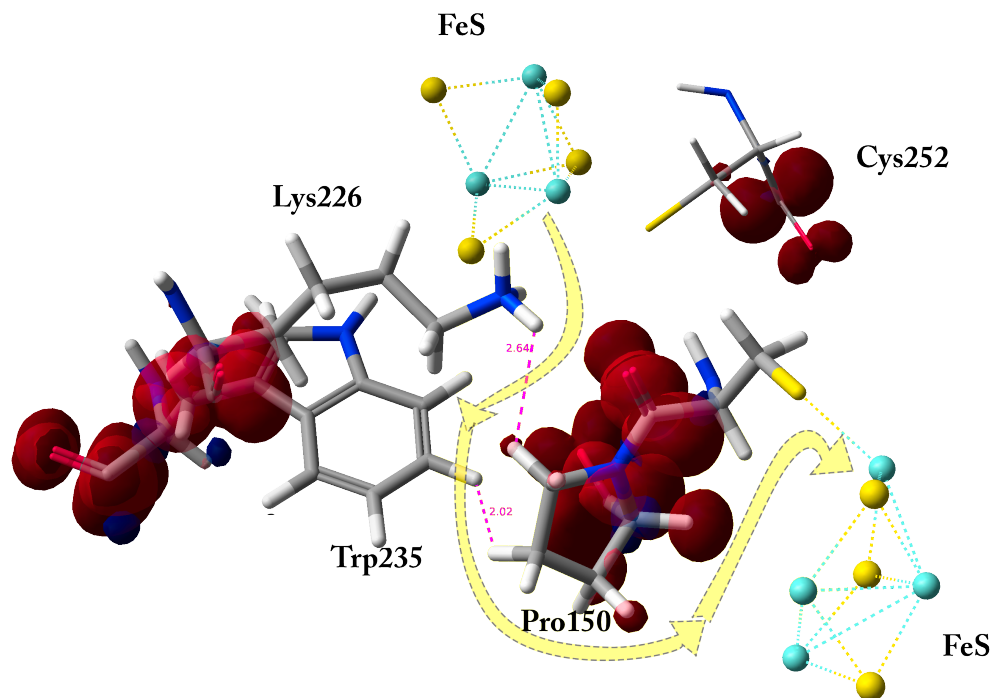


Figura 18: Ruta 2 de la región c121 estudiada por QM/MM et-pathway. Las flechas esquematizan los residuos donadores. La densidad de spin se esquematiza en color rojo.

En la Tabla II se describen las rutas caracterizadas de acuerdo a los residuos que obtuvieron mayor densidad de espín. Se puede observar la participación de residuos que contienen cadenas laterales anilladas como es el caso del Triptófano (Trp), Tirosina (Tyr) e Histidina (His). Se ha observado la participación de este tipo de residuos en la enzima ribonucleótido reductasa clase I (RNR) donde un electrón es transferido entre subunidades homodiméricas a través de una distancia mayor a 35 Å, desde un residuo de cisteína (Cys439) en el sitio activo de la subunidad R1 a un cofactor radical

dihierro-tirosil (Tyr122) en la subunidad R2, y de esta manera se genera un radical tiol responsable de la actividad catalítica de la RNR (Stubbe et al., 2003). Por lo tanto estos residuos participan como intermediarios oxidables que posibilitan la transferencia de electrones entre el donador y el aceptor final de electrones.

7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.

La dinámica molecular permitió conocer las distintas conformaciones que puede adoptar la enzima durante un tiempo de 20ns y obtener los valores de las energías asociadas a dichas conformaciones. Dichas conformaciones son resultado de la integración de las leyes de Newton de movimiento y las interacciones de la enzima con el medio acuoso.

Como producto de la dinámica molecular se determinó que la estructura proteica de la enzima hidrogenasa de *Salmonella Typhimurium* es estable bajo el tiempo de simulación realizado, con una desviación máxima de 2 Å en sus coordenadas.

El estudio de la raíz media de la fluctuación muestra que las zonas con más fluctuación son aquellas que están al exterior de la proteína (en contacto con el solvente) y las de menor fluctuación son aquellas que están en el interior de la proteína, asimismo se descubrió que los cofactores metálicos están en dichas zonas rígidas, lo que nos dio una primera pauta para estudiar la transferencia de electrones en dichas zonas.

La implementación del método híbrido de QM/MM permitió conocer los residuos que pueden participar en la transferencia de electrones y de esta manera caracterizar rutas dentro de la enzima hidrogenasa [Ni-Fe] de *Salmonella Typhimurium*. Se observó que los residuos que participan en la transferencia electrónica entre las agrupaciones o clústeres FeS 3-2, 9-8 y 6-5 son los

mismos. Lo mismo sucede entre las agrupaciones FeS 2-1, 5-4 y 8-7, y por último entre el clúster FeS 7-[Ni-Fe], 1-[Ni-Fe] y 4-[Ni-Fe].

Ya que se logró identificar los residuos que participan en la vías de transferencia electrónica, en un futuro, se podrían modificar por medio de mutaciones genéticas aquellos residuos que no participan de la ruta y que estén aledaños a los cofactores metálicos para que, de esta manera, se genere un mayor flujo de electrones y así aumentar la constante catalítica a favor de la producción de hidrógeno.

Debido a que las unidades monoméricas funcionan de la misma manera como se observó en los cálculos cuánticos, es posible que la enzima utilice solo una unidad y sea funcional. De esta manera por ingeniería genética remover el resto de la enzima y utilizarla para fines biotecnológicos.

Se observó que la base de cada unidad monomérica es rica en residuos aromáticos, esto hace pensar que esta parte se puede adherir a una superficie conductora y ayudaría a mejorar transferencia electrónica. Esto se podría utilizar en aplicaciones en las cuales se requiera una alta sensibilidad electrónica como es el caso de las celdas de combustible y biosensores.

8. REFERENCIAS.

- Agency, I. E. (2006). Hydrogen Production and Storage. *Energy*, 13, 392–392.
- Banks, J. a Y. L., Beard, H. S., Cao, Y., Cho, a R. T. E., Damm, W., Farid, R. Levy, M. (2009). NIH Public Access, 26(16), 1752–1780.
- Bixon, M., & Jortner, J. (2001). Charge transport in DNA via thermally induced hopping. *Journal of the American Chemical Society*, 123(50), 12556–12567.
- Blinder, S.M. (2004). Introduction to quatum mechanics: in chemistry, materials science and biology. Academic Press. p. 26. ISBN 9780121060510.
- Buhrke, T., Lenz, O., Krauss, N., & Friedrich, B. (2005). Oxygen tolerance of the H₂-sensing [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 is based on limited access of oxygen to the active site. *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), 23791–23796.
- Chang, M. C. Y., Yee, C. S., Nocera, D. G., & Stubbe, J. (2004). Site-specific replacement of a conserved tyrosine in ribonucleotide reductase with an aniline amino acid: A mechanistic probe for a redox-active tyrosine. *Journal of the American Chemical Society*, 126(51), 16702–16703.
- Delucchi, M. a., & Jacobson, M. Z. (2011). Providing all global energy with wind, water, and solar power, Part II: Reliability, system and transmission costs, and policies. *Energy Policy*, 39(3), 1170–1190.
- EIA. (2013). International Energy Outlook 2013.
- Ekberg, M., Pötsch, S., Sandin, E., Thunnissen, M., Nordlund, P., Sahlin, M., & Sjöberg, B. M. (1998). Preserved catalytic activity in an engineered ribonucleotide reductase R2 protein with a nonphysiological radical transfer pathway: The importance of hydrogen bond connections between the participating residues. *Journal of Biological Chemistry*, 273(33), 21003–21008.
- Friesner, R. a, & Guallar, V. (2005). Ab initio quantum chemical and mixed quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) methods for studying enzymatic catalysis. *Annual Review of Physical Chemistry*, 56, 389–427.
- Goldet, G., Brandmayr, C., Stripp, S. T., Happe, T., Cavazza, C., Fontecilla-Camps, J. C., & Armstrong, F. a. (2009). Electrochemical kinetic investigations of the reactions of [FeFe]-hydrogenases with carbon monoxide and oxygen:

Comparing the importance of gas tunnels and active-site electronic/redox effects. *Journal of the American Chemical Society*, 131(41), 14979–14989.

Goldet, G., Wait, A. F., Cracknell, J. a, Vincent, K. a, Ludwig, M., Lenz, O., ... Armstrong, F. a. (2008). Hydrogen Production under Aerobic Conditions by Membrane-Bound Hydrogenases from *Ralstonia* Species Hydrogen Production under Aerobic Conditions by Membrane-Bound Hydrogenases from *Ralstonia* Species, (19), 11106–11113.

Gray, H. B., & Winkler, J. R. (2009). Electron flow through proteins. *Chemical Physics Letters*, 483(1-3), 1–9.

Harvey, J., Bathelt, C., & Mulholland, A. (2006). QM/MM Modeling of Compound I Active Species in Cytochrome P450, Cytochrome C Peroxidase, and Ascorbate Peroxidase. *Journal of Computational Chemistry*, 27(16), 1352.

Haselkorn, R., Lapidus, A., Kogan, Y., Vlcek, C., Paces, J., Paces, V., ... Fonstein, M. (2001). The *Rhodobacter capsulatus* genome. *Photosynthesis Research*, 70(1), 43–52.

Hopfield, J. J. (1974). Electron transfer between biological molecules by thermally activated tunneling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(9), 3640–3644.

Hudson, J. M., Heffron, K., Kotlyar, V., Sher, Y., Maklashina, E., Cecchini, G., & Armstrong, F. a. (2005). Electron transfer and catalytic control by the iron-sulfur clusters in a respiratory enzyme, *E. coli* fumarate reductase. *Journal of the American Chemical Society*, 127(19), 6977–6989.

Jones, A. K., Lamle, S. E., Pershad, H. R., Vincent, K. a., Albracht, S. P. J., & Armstrong, F. a. (2003). Enzyme electrokinetics: Electrochemical studies of the anaerobic interconversions between active and inactive states of *Allochrochromatium vinosum* [NiFe]-hydrogenase. *Journal of the American Chemical Society*, 125(28), 8505–8514.

Jordan, a, & Reichard, P. (1998). Ribonucleotide reductases. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 71–98.

Jortner, J., Bixon, M., Langenbacher, T., & Michel-Beyerle, M. E. (1998). Charge transfer and transport in DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(22), 12759–12765.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Tabata, S. (2002). Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Research*, 9(6), 189–197.

- Lenz, O., Ludwig, M., Schubert, T., Bürstel, I., Ganskow, S., Goris, T., ... Friedrich, B. (2010). H₂ conversion in the presence of O₂ as performed by the membrane-bound [NiFe]-Hydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *ChemPhysChem*, 11(6), 1107–1119.
- Li, H., Robertson, A. D., & Jensen, J. H. (2005). Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK_a values. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 61(4), 704–721.
- Liebgott, P.-P., Leroux, F., Burlat, B., Dementin, S., Baffert, C., Lautier, T., Léger, C. (2010). Relating diffusion along the substrate tunnel and oxygen sensitivity in hydrogenase. *Nature Chemical Biology*, 6(1), 63–70.
- Leach, A. (2001). *Molecular Modelling, Principles and Applications*. Wesley Longman.
- Montet, Y., Amara, P., Volbeda, a, Vernede, X., Hatchikian, E. C., Field, M. J., Fontecilla-Camps, J. C. (1997). Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. *Nature Structural Biology*, 4(7), 523–526.
- Mulliken, R. S. (1955). Electronic Population Analysis on LCAO [Single Bond] MO Molecular Wave Functions. I. *The Journal of Chemical Physics*, 23(10), 1833.
- Nicolet, Y., Piras, C., Legrand, P., Hatchikian, C. E., & Fontecilla-Camps, J. C. (1999). *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure*, 7(1), 13–23.
- Núñez, M. E., & Barton, J. K. (2000). Probing DNA charge transport with metallointercalators. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4(2), 199–206.
- Ogata, H., Lubitz, W., & Higuchi, Y. (2009). [NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism. *Dalton Transactions* (Cambridge, England : 2003), 9226(37), 7577–7587.
- Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X., & Dutton, P. L. (1999). Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature*, 402(6757), 47–52.
- Rova, U., Adrait, A., Pötsch, S., Gräslund, A., & Thelander, L. (1999). Evidence by mutagenesis that Tyr370 of the mouse ribonucleotide reductase R2 protein is the connecting link in the intersubunit radical transfer pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 274(34), 23746–23751.

Schwartz, E., & Friedrich, B. (2006). The H₂-Metabolizing Prokaryotes.

Seyedsayamdost, M. R., Yee, C. S., Reece, S. Y., Nocera, D. G., & Stubbe, J. (2006). pH Rate Profiles of F_n Y356-R2s (n = 2, 3, 4) in Escherichia coli Ribonucleotide Reductase: Evidence that Y356 Is a Redox-Active Amino Acid along the Radical Propagation Pathway, (11), 1562–1568.

Stripp, S. T., Goldet, G., Brandmayr, C., Sanganas, O., Vincent, K. a, Haumann, M., Happe, T. (2009). How oxygen attacks [FeFe] hydrogenases from photosynthetic organisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(41), 17331–17336.

Stubbe, J. A., Nocera, D. G., Yee, C. S., & Chang, M. C. Y. (2003). Radical initiation in the class I ribonucleotide reductase: Long-range proton-coupled electron transfer? Chemical Reviews, 103(6), 2167–2201.

Van der Kamp, M. W., & Mulholland, A. J. (2008). Computational enzymology: insight into biological catalysts from modelling. Natural Product Reports, 25(6), 1001–1014.

Vignais, P. M., & Billoud, B. (2007). Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview, (0), 4206–4272.

Vincent, K. a., Parkin, A., & Armstrong, F. a. (2007). Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases. Chemical Reviews, 107(10), 4366–4413.