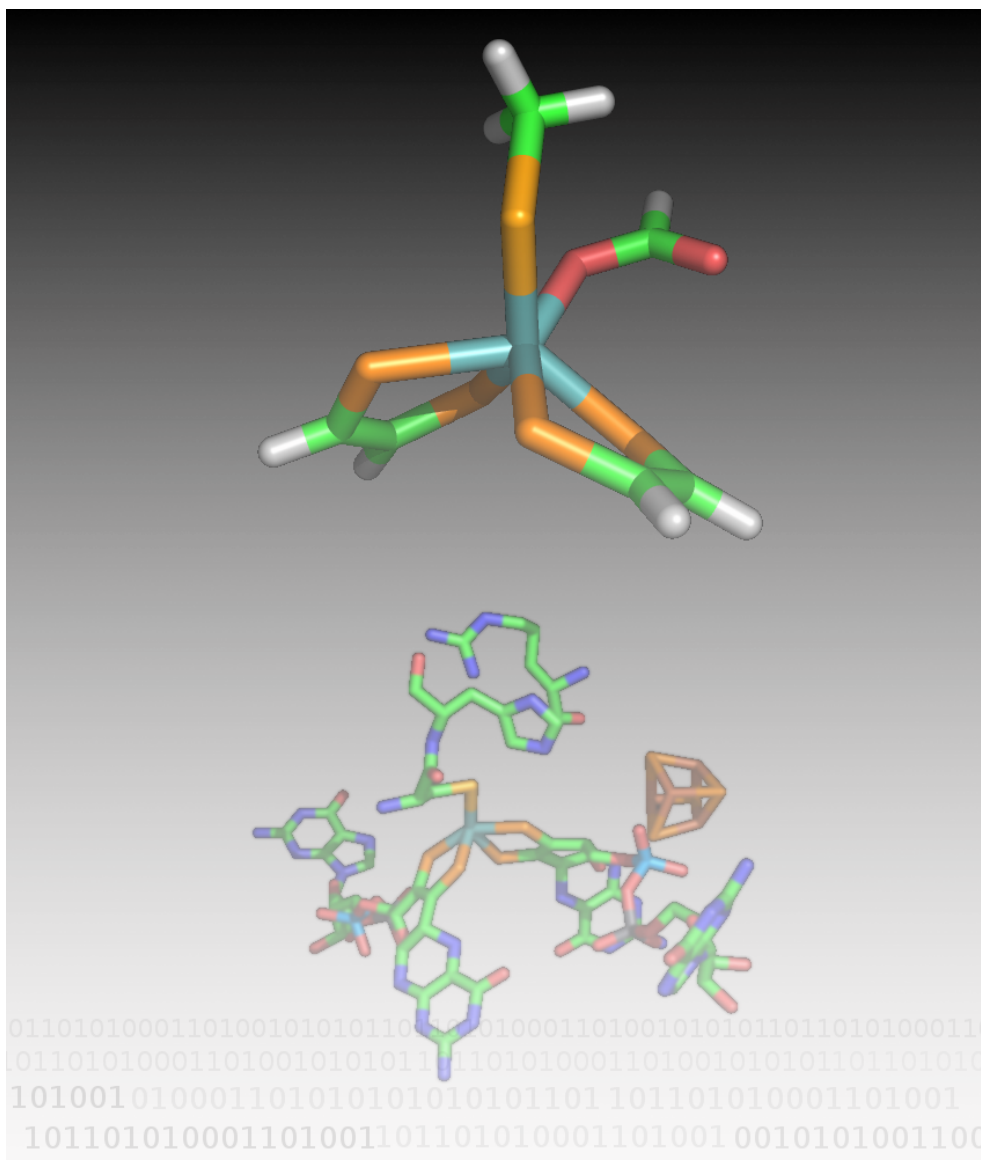


Estudi teòric de l'activitat bioquímica del seleni en la format deshidrogenasa H



Alfons Nonell i Canals

Institut Català d'Investigació Química (ICIQ)

Tarragona, juliol de 2006

Clàusula de bon ús

“Queda absolutament prohibida la utilització, recerca i desenvolupament, de manera directa o indirecta, de qualsevol de les aportacions científiques pròpies de l'autor que es presenten en aquesta memòria, per part de qualsevol exèrcit del món o per part de qualsevol grup armat, per a qualsevol ús militar i per a qualsevol altre ús que atempti contra els drets humans o contra el medi ambient, si no és amb el permís escrit de totes les persones del món.”

Més informació: www.prouinvestigacionmilitar.org

Good Use Right

“It is strictly prohibited to use, to investigate or to develop, in a direct or indirect way, any of the scientific contributions of the author contained in this work by any army or armed group in the world, for military purposes and for any other use which is against human rights or the environment, unless a written consent of all the persons in the world is obtained”

More information: www.prouinvestigacionmilitar.org

Agraïments

Aquest treball m'ha demanat estar moltes hores davant de l'ordinador, enviar càlculs, estudiar resultats, llegir,... tot això però, no hauria estat possible sense la gent que m'envolta. Així doncs, abans de començar a parlar de proteïnes, àtoms, números i conclusions, m'agradaria dedicar unes línies a thotom qui ha fet possible aquesta feina.

En primer lloc, als meus amics i companys de l'UAB, amb qui vaig començar aquesta aventura. Al Marc, la Maria, l'Erika, el Galí i en David.

Als meus companys de l'ICIQ, els dubtes, els riures, alegries i petites decepcions. A en Pere, l'Oriol, l'Hugo, la Núria, en David, l'Eva, en Torstein, l'Atualpa (gràcies també pel consells del món del \LaTeX), en Peter, en Manuel i la Fabienne.

To Rajeev, for your help in my day by day, patience, and good moments during my stay in Emory.

Als meus directors, en Jordi, per l'empenta i l'energia, i en Feliu, per la paciència i l'experiència. Dia a dia m'heu ensenyat i demostrat que la ciència la fan, per damunt de tot, les persones.

Al Pep, per, ara fa ja uns quants anys, haver-me ensenyat què és la recerca. A banda d'un bon tiet, és un bon mestre.

Als meus pares i germans, que m'han donat l'oportunitat de ser el que sóc.

I, finalment, a la millor companya de viatge. A qui, ara fa ja més de dos anys, em va animar a canviar la farmàcia pel despatx. A qui em fa costat i té la paciència necessària per compartir la vida amb un científic. Gràcies M^aElena.

I aquest camí que feu a peu,
el vostre anhel el faci pla,
i les petjades que deixareu
siguin històries que en el camí
escriviu.

Sortiu a peu. Esquirols, 1980

Índex

1	Introducció	12
1.1	El seleni	12
1.2	La selenocisteïna	14
1.3	La Format Deshidrogenasa H	20
1.4	Càlculs quàntics sobre metaloproteïnes	22
2	Objectius	25
3	Procediment	26
4	Resultats	29
4.1	Desprotonació del formiat	31
4.2	Desprotonació del seleni	34
4.3	Oxidació del molibdè	38
4.4	Incorporació d'un nou formiat	42
4.5	Anàlisi global de les energies	44
4.6	Anàlisi global de les estructures	48
4.6.1	Distància Mo-Se i Mo-S	49
4.6.2	Protonació i desprotonació del Se/S	50
5	Conclusions	52

Índex de taules

1	Seleni vs sofre	12
2	Seleni als aliments	14
3	Alguns selenoenzims	18
4	Energies del Benzil viologen	28
5	Energies relatives dels intermedis	46
6	Energies de protonació	47
7	Energies redox	48
8	Distàncies i estat d'oxidació	49
9	Distàncies en la protonació i desprotonació	50

Índex de figures

1	Els 20 aminoàcids	15
2	Comparació Cys-Sec	16
3	Codi genètic	17
4	Traducció de la Sec	19
5	Centre actiu	21
6	Model QM	26
7	Benzil viologen	27
8	Cicle catalític	30
9	Desprotonació del formiat. Seleni	32
10	Desprotonació del formiat. Sofre	33
11	Desprotonació del seleni	35
12	Desprotonació del sofre	37
13	Estat de transició de C a D	38
14	Oxidació del molibdè. Seleni	40
15	Oxidació del molibdè. Sofre	41
16	Incorporació d'un nou formiat. Seleni	43
17	Incorporació d'un nou formiat. Sofre	44
18	Perfil del a reacció	45
19	Intermedi D	51

1 Introducció

1.1 El seleni

El seleni és un element químic que té Se com a símbol i 34 com a nombre atòmic. Fou descobert l'any 1817 pel químic suec Jöns Jacob Berzelius que li va posar el nom grec "claror de la lluna". El seleni es pot trobar en diverses formes al·lotròpiques. La forma més comuna és el seleni gris cristal·lí, d'estructura hexagonal. També hi ha la forma roja, d'estructura monoclínic, fon a 221 °C i té una densitat de 4,39 g/cm³. I, finalment, el seleni amorf, que pot tenir dues formes: la forma vítria, de color negre, que és obtinguda al refredar ràpidament el seleni líquid i, també roja, la forma col·loïdal, que s'obté en reaccions de reducció. El seleni és insoluble en aigua i alcohol i és soluble en éter.

Propietat	Seleni	Sofre
Pes atòmic	78.96 uma	32.07 uma
Radi mitjà	115 pm	100 pm
Radi atòmic calculat	103 pm	88 pm
Radi covalent	116 pm	102 pm
Radi de Van der Waals	190 pm	180 pm
Configuració electrònica	[Ar] 3d ¹⁰ 4p ⁴ 4s ²	[Ne]3s ² 3p ⁴
Estats d'oxidació	±2,4,6	±2,4,6

Taula 1: Propietats atòmiques de seleni i sofre

Com passa amb molts altres elements, el seleni és un element tòxic, però és considerat un micronutrient essencial ja que en petites quantitats és necessari per la vida,^{1,2} tant en eucariotes com en procariotes. Dins la cèl·lula podem trobar seleni en formes lliures de baix pes molecular i en proteïnes formant part de la seva seqüència peptídica (generalment en el centre actiu) en forma d'un

aminoàcid anomenat selenocisteïna (Sec). En aquest segon cas parlarem de les selenoproteïnes.

Hi ha diferents processos patològics relacionats amb una disminució de seleni en la dieta, els més coneguts són els càncers i alguns problemes immunològics. L'explicació més acceptada és que la disminució d'ingesta de seleni suposa una disminució de la síntesi de diferents selenoproteïnes. Aquestes selenoproteïnes formarien part de diferents mecanismes de defensa contra els radicals lliures i, per tant, la seva disminució afavoriria la presència i desenvolupaments de diferents tipus de càncer.

Les funcions conegudes fins al moment per a les selenoproteïnes estan clarament relacionades amb aquesta funció protectora del seleni davant dels càncer, ja que algunes de les tasques de les selenoproteïnes dins la cèl·lula són la regulació de l'estat redox de la cèl·lula i la regulació hormonal del metabolisme. És conegut que tant el sofre com el seleni són presents en centres actius d'enzims que catalitzen reaccions de tipus redox.

Les necessitats de seleni varien en funció de l'edat,³ anant dels 15-20 μ g/dia entre els 0-3 anys fins als 55 μ g/dia a partir dels 19 anys. Aquests requeriments augmenten fins als 60 μ g/dia en les dones embarassades i fins a 70 μ g/dia durant la lactància. Les principals fonts de seleni⁴ són els aliments d'origen vegetal i productes càrnics on la quantitat varia en funció de la riquesa en seleni que tingui el sòl on s'han cultivat aquests aliments. Seguint una dieta equilibrada és difícil que es produeixin deficiències de seleni. En països on els sòls són pobres en seleni, s'han descrit malalties derivades de la manca d'aquest mineral. És el cas de la Xina, on es va descriure, a principis dels anys 30,⁵ la malaltia de Keshan que és una cardiomiopatia amb desenllaç fatal.

Estudis recents⁶ amb ratolins modificats genèticament per tal que expressin un baix nivell de selenoproteïnes han manifestat encara més la relació entre

Aliment	Quantitat de seleni
Tonyina (85 g)	63
Spaghetis (un plat)	34
Gall d'indi (100 g)	32
Pit de pollastre (100 g)	20
1 ou	14
Arròs blanc (1/2 tassa)	12
Pa (1 llesca)	4

Taula 2: Quantitat de seleni (en μg) present en alguns aliments.⁴ Cal recordar que la quantitat varia en funció del sòl on s'han cultivat o crescut els aliments o els seus ingredients.

el seleni i el càncer. En aquest estudi s'han criat ratolins bitransgènics: una modificació per expressar baixos nivells de selenoproteïnes i una altra per induir el càncer de pròstata. Aquests animals, en comparació amb els que simplement tenien la modificació per induir el càncer de pròstata, han desenvolupat molt més ràpidament aquest tumor.

Un millor coneixement del funcionament de les selenoproteïnes, i del paper que juga el seleni en les mateixes, pot ajudar, doncs, al desenvolupament de millors tractaments oncològics.

1.2 La selenocisteïna

Abans de parlar directament de la selenocisteïna cal fer un petit esment de què és un aminoàcid. Un aminoàcid és una molècula que conté un grup amino i un grup carboxílic. Hi ha aminoàcids proteics (formen part de proteïnes) i aminoàcids no proteics (solen ser neurotransmisors, vitamines,...). Els proteics, estructuralment, tenen un carboni asimètric (anomenat carboni alfa) que uneix

el grup amino, el grup carboxílic i una cadena lateral. En funció d'aquesta cadena lateral tenim diferents aminoàcids. En humans tenim 20 (21 si contem la selenocisteïna) aminoàcids proteïcs coneguts. Els aminoàcids proteïcs s'uneixen entre ells mitjançant l'enllaç peptídic que es dona entre el grup amino d'un i el carboxílic de l'altre.

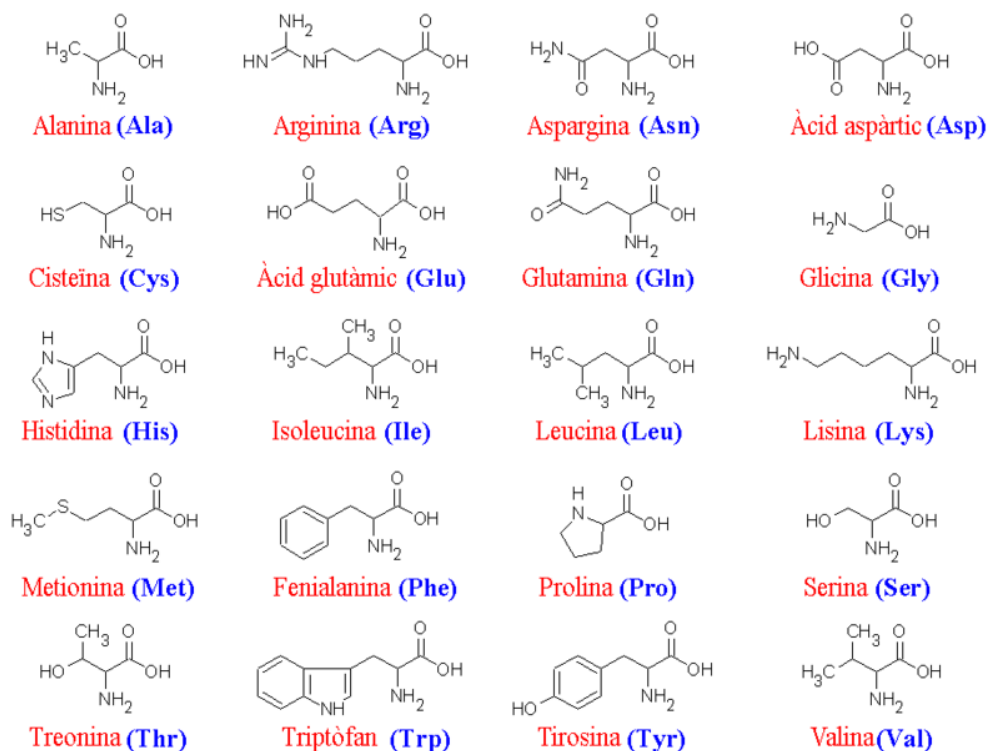


Figura 1: Taula dels que es consideren els 20 aminoàcids proteïcs en humans

La selenocisteïna, coneguda també com l'aminoàcid 21, és un residu present en diversos enzims, per exemple: glutatió peroxidases, tioreduxin reductases, format deshidrogenases, glicina reductases, i algunes hidrogenases. En general són enzims que catalitzen reaccions de tipus redox on la selenocisteïna juga un paper important. Aquelles proteïnes que contenen selenocisteïna són conegudes com a selenoproteïnes.

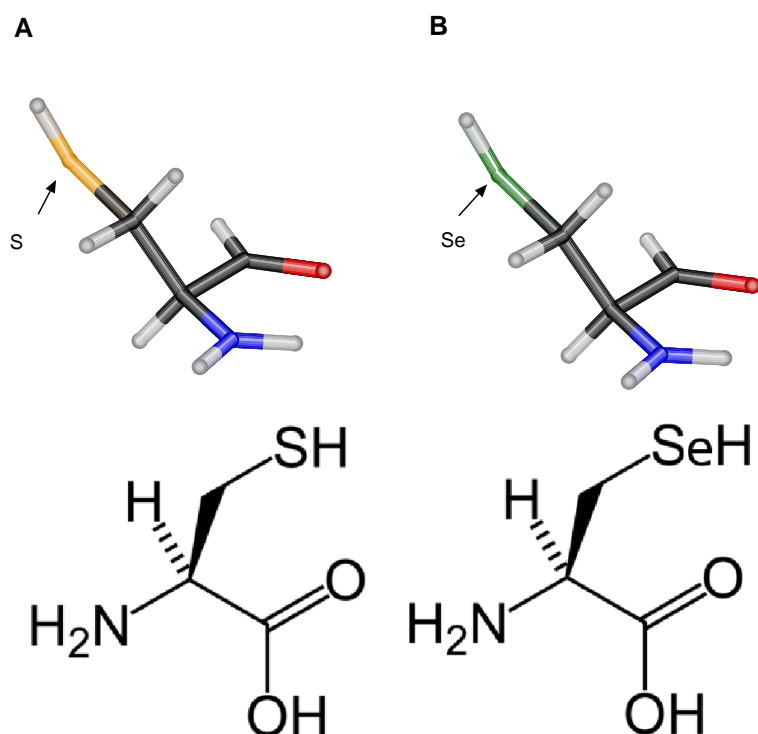


Figura 2: Comparació entre la cisteïna (A) i la selenocisteïna (B). Com es pot veure en la figura, els dos residus són idèntics, amb l'única diferència que, mentre la cisteïna té sofre, la selenocisteïna conté seleni

Estructuralment, la selenocisteïna és similar a una cisteïna on el sofre és substituït per seleni. La peculiaritat però, d'aquest aminoàcid rau en la seva forma d'inserció en la cadena peptídica. A diferència de la resta d'aminoàcids, la selenocisteïna no té un codó propi en el codi genètic, sinó que la seva inserció es deu a la combinació d'un codó "STOP"(UGA), un determinat motiu de la seqüència del RNA missatger (mRNA), conegut com a SECIS (*SElenoCysteine Insertion Sequence*) i un complex proteïc conegut com a *Sec translation complex*.

En condicions normals, la síntesi proteica té lloc gràcies a la traducció del codi contingut en el mRNA. Aquest procés té lloc al ribosoma. Durant la tra-

ducció, el ribosoma llegeix els codons (codi de tres lletres) de la seqüència a traduir i li uneix el RNA de transferència (tRNA) corresponent (cada codó té el seu corresponent anti-codó del codi genètic). Aquest tRNA transfereix l'aminoàcid que correspon a aquell codó a la cadena peptídica de nova creació. La traducció evoluciona i allarga la cadena peptídica mentre no hi hagi res que li indiqui al ribosoma que s'ha d'aturar. Aquests "senyals aturadors" són coneguts com a codons STOP i se'n coneixen tres: UGA, UAA i UAG. Quan el ribosoma arriba a un d'aquests codons, "salta" i s'atura així el procés de traducció proteïca.

	U	C	A	G		
U	UUU UUC	UCU UCC UCA UCG	UAU UAC	UGU UGC	U	
	UUA UUG		UAA UAG	UGA UGG	C	
C	CUU CUC CUA CUG	CCU CCC CCA CCG	CAU CAC	CGU CGC CGA CGG	U	
			CAA CAG		C	
					A	
A	AAU AUC AUA	ACU ACC ACA ACG	AAU AAC	AGU AGC	U	
	AUG		AAA AAG	AGA AGG	C	
					A	
G	GUU GUC GUA GUG	GCU GCC GCA GCG	GAU GAC	GGU GGC GGA GGG	U	
			GAA GAG			C
						A
					G	

Figura 3: El codi genètic està fet per codis de tres lletres anomenats codons.

Enzim	Reacció catalítica	Rol de la Sec
Glutatí peroxidases	Reducció d'hidroperòxids	Reacciona amb H ₂ O ₂ i forma acid selínic
Iodotironina deiodinases (D1, D2 i D3)	Conversió de T4 a T3 i degradació dels T3 i T4	Forma intermedis de selenil
Tioreduxin reductases	Redueix les tioreduxines i altres substrats	Part del motiu selenilsulfit-selenotiol
Selenofosfat sintasa 2	Conversió del selenit a selenofosfat	Desconegut
Metionina-R-sulfoxid reductasa B	Reducció de la metionina sulfoxid a metionina	Desconegut
Format deshidrogenasa H	Conversió del format a diòxid de carboni	Coordinació amb un àtom de molibdè
Glicina reductasa	Conversió de la glicina a acetil fosfat	Forma un intermedi selenicaboximetil èter

Taula 3: Mostra d'alguns selenoenzims, l'activitat dels quals és coneguda. En alguns casos es coneix, a més a més, el rol específic de la selenocisteïna.⁷

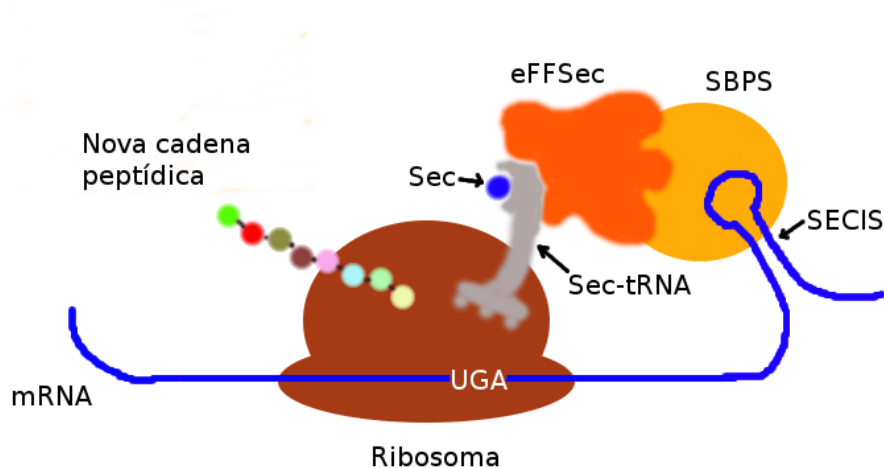


Figura 4: Representació de la traducció de la selenocisteïna i inserció en la cadena peptídica

Com ja s'ha comentat, el cas de la selenocisteïna és especial, perquè no té un codó concret en el codi genètic. La inserció d'una selenocisteïna en la cadena peptídica requereix la presència de, a banda dels elements normals de tota traducció (mRNA, ribosoma i tRNA), el SECIS i el *Sec translation complex*, un complex proteic que consta de dues proteïnes: la SBPS (*SECIS binding protein*) i la eEFSec (*Sec elongation factor*). Tot i la complexitat del mecanisme, la inserció d'una selenocisteïna es pot explicar de manera relativament senzilla: si quan el ribosoma arriba a un codó STOP UGA detecta la presència d'un element SECIS, s'activa la maquinària que fa que la SBPS s'uneixi al SECIS, posteriorment la eEFSec fa de nexa entre el Sec-tRNA (tRNA que porta unida una Sec -sintetitzada per la Sec sintasa-) i la SBPS afavorint la col·locació del Sec-tRNA al lloc aminoacídic del ribosoma i la posterior generació de l'enllaç peptídic entre la nova Sec i la cadena peptídica ja sintetitzada. Com a resum, es pot dir que, en la traducció de les selenocisteïnes, al no haver-hi un codó concret o, més ben dit, un codó únic que només codifiqui per elles, cal quelcom afegit per col·locar

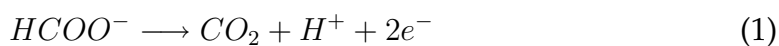
el Sec-tRNA en el lloc i el moment adequat.

Així doncs, el mecanisme d'inserció de la selenocisteïna és més sofisticat que no pas el dels altres 20 aminoàcids coneguts. El fet d'haver-lo preservat de l'evolució fa pensar en la importància de l'aminoàcid vint-i-ú.

La presència de selenocisteïna varia molt en funció dels organismes. Per exemple, no s'ha trobat cap selenoproteïna en llevats i plantes superiors, mentre que en procariotes i arqueobacteris, el nombre de proteïnes amb Sec és força baix. Pel que fa a eucariotes, el nombre de selenoproteïnes varia molt en funció dels organismes, mentre que en humans n'hi ha 25 d'identificades, en *Drosophila melanogaster* (una mosca) només n'hi ha 3 i 1 en *Caenorhabditis elegans* (un cuc). Actualment els mètodes més emprats per identificar selenoproteïnes fan ús de la bioinformàtica i es basen, principalment, en algoritmes destinats a buscar el codó stop UGA i el motiu SECIS a una determinada distància d'aquest codó.

1.3 La Format Deshidrogenasa H

La Format Deshidrogenasa H (FDHh)^{8,9} és un enzim que pertany al complex Format Hidrogen Liasa,¹⁰ de l'*Escherichia coli*. Aquest complex descomposa àcid fòrmic en diòxid de carboni (CO₂) i hidrogen. Dins del complex, el rol concret de la FDHh és oxidar el formiat (HCOO⁻) i obtenir diòxid de carboni alliberant un protó i dos electrons. De manera remarcable la reacció d'oxidació té lloc en condicions anaeròbies i sense que hi hagi cap transferència d'oxigen.



Aquest enzim té diverses de característiques especials que el fan interessant per als nostres estudis. D'una banda, quan parlem de la FDHh, parlem d'una selenoproteïna ja que en la posició 140 de la seva cadena peptídica conté una selenocisteïna. Una altra característica destacable és la presència d'un àtom

d'un metall de transició, concretament, un molibdè (Mo). Tant la selenocisteïna (Sec¹⁴⁰), com el molibdè són al centre actiu de l'enzim i juguen un paper important en la reacció.

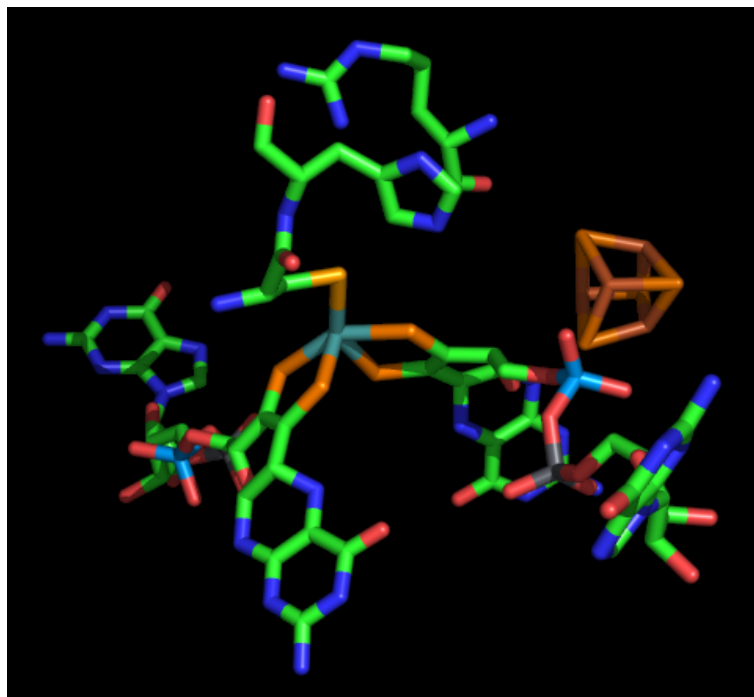


Figura 5: Representació del centre actiu de la FDHh. A la figura es poden veure els dos cofactors MGDC, l'àtom de molibdè, la selenocisteïna unida a la histidina 141, la caixa ferro-sofre i l'arginina 333.

La dada més important és però el fet que experiments d'enginyeria genètica demostren que la presència de l'element seleni és crítica per a la funcionalitat de l'enzim. Quan la selenocisteïna és reemplaçada per cisteïna, la velocitat de la reacció de descomposició del formiat es divideix per 300.

Altres característiques d'aquest centre actiu són la presència de dos cofactors de guanidina, els *molybdopterin guanine dinucleotide cofactors* (MGDC) -el molibdè està tetracoordinat a quatre sofres d'aquests cofactors-, i la proximitat

d'una histidina en la posició 141 (His¹⁴¹). Les histidines, amb el seu anell d'imidazol, solen ajudar a treure protons dels centres actius d'aquest tipus de reacció. A més a més, com que la reacció que té lloc al centre d'aquest enzim allibera dos electrons, cal un acceptor que els elimini o aparti del sistema. En aquest cas, l'acceptor d'electrons és una caixa ferro-sofre (Fe₄S₄) que es troba a 12 Å de l'àtom de molibdè que és qui allibera els dos electrons (el molibdè és reduït en iniciar la reacció i cal que es reoxidi -alliberant dos electrons- per regenerar l'enzim i reiniciar un altre cicle). Aquesta distància fa pensar que cal un "pont" entre el molibdè i la caixa ferro-sofre, els MDGC podrien ser els responsables d'aquesta tasca.

1.4 Càlculs quàntics sobre metaloproteïnes

En els darrers anys, l'aplicació de la química computacional en l'estudi de sistemes biològics ha anat en augment. Això ha estat fruit de diferents coincidències. D'una banda, la millora tècnica, tant a nivell de programari com de maquinari, cada vegada es disposa de màquines més potents a un preu més raonable i, a més a més, el desenvolupament de programari ha fet un salt qualitatiu. Per altra banda tenim l'interès que ha despertat el camp tant en biòlegs experimentals com en químics teòrics. Aplicar els mètodes teòrics en sistemes proteïcs ens permet conèixer molt més acuradament què passa a l'interior de l'enzim i perfilar amb més detall el mecanisme catalític. Amb la química computacional podem obtenir els intermedis de reacció, calcular els models de possibles estats de transició, fer, amb un cost molt baix, mutacions per veure els seus efectes en el mecanisme,...

A l'hora d'afrontar l'estudi teòric d'una proteïna ens podem plantejar l'ús de dos mètodes: la mecànica quàntica o la mecànica molecular. També es pot parlar d'un tercer mètode, híbrid, en què una part de la proteïna és tractada de

manera quàntica mentre que la mecànica molecular és emprada per la resta.

La modelització emprant **mecànica quàntica**¹¹⁻¹³ és la que ens descriu més detalladament el sistema i l'estructura electrònica dels àtoms que el formen. Aquests mètodes han demostrat ser molt efectius en sistemes de grandària mitjana i que contenen metalls de transició. L'inconvenient que tenen és l'elevat cost computacional que suposen, inconvenient que ens limita a treballar amb sistemes d'uns 80-100 àtoms. Això, en molts casos, no té per què ser problema, però, en el cas de la modelització de proteïnes, aquest límit fa que no es pugui treballar amb grans sistemes i que, tot sovint, s'hagin de simplificar i fer càlculs sobre models.

Els mètodes de **mecànica molecular**^{14,15} són, per altra banda, molt menys costosos des del punt de vista computacional i això ens permet treballar amb grans sistemes (podem arribar a parlar de milers d'àtoms) i, tot sovint, es poden modelar proteïnes senceres. Aquests mètodes fan una descripció menys detallada del sistema on no es té en compte l'estructura electrònica de les molècules en estudi. A banda del poc detall, el que fa més tediós l'ús d'aquests mètodes és la necessitat de parametritzar els àtoms, això és encara més complicat en sistemes que contenen metalls de transició.

Finalment, la tercera via que tenim en la modelització de proteïnes és un híbrid dels dos anteriors. Ara parlem dels mètodes QM/MM.¹⁶⁻²¹ Amb aquesta metodologia fem un tractament de mecànica molecular a tota la proteïna i un tractament quàntic a la part més important, el centre actiu. D'aquesta manera podem estudiar amb detall la reacció que catalitza l'enzim (degut a l'aplicació de la mecànica quàntica) i l'efecte de la resta de la proteïna sobre aquesta reacció (a nivell de forces electrostàtiques aportades per la mecànica molecular). Aquesta metodologia sembla ser la que està agafant més volada en el camp de la modelització proteïca, però caldrà esperar encara un temps per a tenir bon

programari capaç de resoldre problemes reals. A més a més, en el cas de les proteïnes amb metalls de transició, el fet de treballar amb mecànica molecular ens obliga de nou, a parametritzar. Cal dir però, que degut a què és un camp que desperta certs interessos econòmics, hi ha corporacions que estan treballant per desenvolupar i programar aplicacions cada dia més factibles.

El cas de les metaloproteïnes, específicament les que contenen metalls de transició, és una mica especial dins del camp dels sistemes biològics. La presència del centre metàl·lic fa inel·ludible l'ús d'un mètode quàntic de nivell mig alt, com a mínim un mètode DFT amb correccions de gradient.¹³ En qualsevol cas, hi ha hagut ja contribucions importants en aquest camp, que es troben recollides en publicacions de revisió.²²⁻²⁵ Ha estat particularment útil el treball del Prof. Siegbahn sobre el centre actiu de diverses proteïnes com ara citocroms, metanooxigenases i fotosistema II. La seva aproximació habitual ha consistit en calcular només el centre actiu de la proteïna, sense introduir en el càlcul l'efecte dels aminoàcids que es troben a llarga distància. La gran activitat en el camp es reflecteix en la recent publicació d'un número especial del *Journal of Computational Chemistry* dedicat a la Química Teòrica Bioinorgànica,²⁶ incloent entre altres estudis sobre P450,^{27,28} citocrom c oxidasa,²⁹ superòxid dismutasa,³⁰ hidrogenasa,³¹ cobalamina i transportadors d'oxigen de tipus hemo.^{32,33}

La qualitat dels resultats suggereix que aquesta aproximació de càlculs sobre un sistema model pot ser útil per a sistemes com ara la format deshidrogenasa H.

En el cas dels càlculs teòrics en el camp de les selenoproteïnes cal destacar les aportacions del grup del Prof. Morokuma en l'estudi del mecanisme de la glutatió peroxidasa.^{34,35}

2 Objectius

L'objectiu final d'aquest treball és entendre la raó per la qual l'enzim format deshidrogenasa H és una selenoproteïna, és a dir, perquè requereix un residu selenocisteïna en el seu centre actiu per ser eficient. La comprensió d'aquest comportament ens podrà portar a una millor comprensió de les selenoproteïnes en general, i, a un nivell global, del rol biològic de l'element seleni.

Per obtenir aquest objectiu principal, cal també marcar algunes fites parcials:

- Comprovar la validesa de la hipòtesi mecanística per a la format deshidrogenasa H per Boyington i col·laboradors a partir de dades experimentals.
- Analitzar el perfil de reacció i identificar-ne les seves etapes crítiques.
- Comparar el comportament dels residus cisteïna i selenocisteïna al llarg del cicle catalític.

3 Procediment

Tots els càlculs realitzats per l'elaboració d'aquest treball han estat fets sobre un petit model del centre actiu de l'enzim. Aquest model, obtingut a partir de l'estructura del PDB¹ amb codi 1FDI, inclou tots aquells àtoms necessaris i crítics per a la reacció. A la vegada, la grandària del model s'ha ajustat a les possibilitats computacionals d'aquest tipus de càlcul.

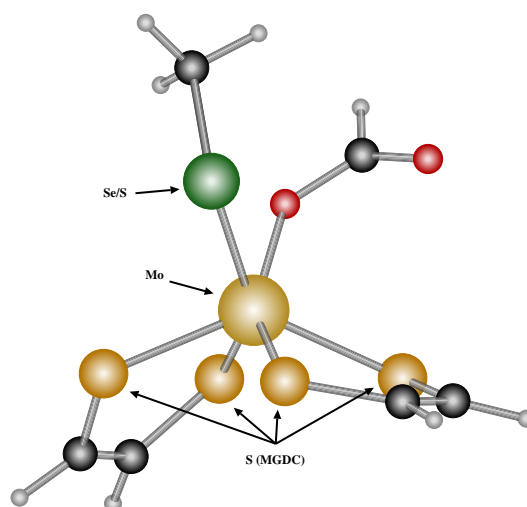


Figura 6: Model de centre actiu emprat per a fer els càlculs d'aquest treball

Així doncs, el model que hem emprat inclou l'àtom central de molibdè i part dels lligands o residus que l'envolten. La selenocisteïna (o cisteïna) és representada per una seleni (o sofre) unit al molibdè i substituït per un metil. Els cofactors han estat substituïts pel fragment S-HC=CH-S, on els sofres estan units a l'àtom central de molibdè. Per acabar, en aquelles etapes en què el paper de la His¹⁴¹ és important hem introduït un anell d'imidazol. A la Figura 6 es pot veure aquest model amb el substrat (formiat).

¹PDB:Protein Data Bank

Com s'ha comentat anteriorment, l'enzim catalitza una reacció de tipus redox que allibera dos electrons. Com a acceptor d'aquests electrons, l'enzim emprava una caixa ferro-sofre (Fe_4S_4), present en molts enzims que alliberen electrons. El càlcul d'aquest tipus d'estructures és costós i complicat i es va decidir substituir, en el nostre model, la caixa ferro-sofre per un altre acceptor d'electrons: el benzil-viologen (1,1'-Dibenzil-4,4'-bipiridini).

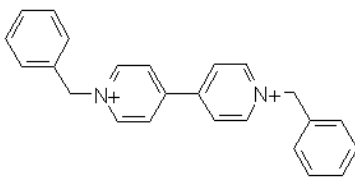


Figura 7: El benzil viologen

El benzil-viologen és una molècula emprada experimentalment en bioquímica com a acceptor d'electrons. La molècula pot tenir tres nivells d'oxidació, podent ésser neutra, catiònica o bicatiònica. En aquest estudi hem calculat l'energia d'aquest acceptor pels tres diferents estats d'oxidació. La diferència d'energia entre un estat d'oxidació i l'altre es pot extrapolar, en el nostre model, com l'energia necessària (exo o endotèrmica) per afegir o extreure un electró al sistema. Així doncs, el cost energètic d'extreure el primer electró del sistema considerarem que és el mateix que oxidar el benzil-viologen de la forma neutra a la catiònica i el cost d'extreure el segon electró correspondrà al cost d'obtenir la forma bicatiònica de benzil-viologen a partir de la catiònica.

La reacció neta que té lloc en el nostre sistema model és doncs, la representada en la següent equació:



Molècula	Energia	Increment
Bv ²⁺	-360757.5	0
Bv ¹⁺	-360853.6	-96.1
Bv	-360927.90	-74.24

Taula 4: Energies (kcal/mol del benzil viologen en els seus diferents estats d'oxidació (Bv²⁺, Bv¹⁺ i Bv). L'increment correspon a la diferència d'energia entre els diferents estats d'oxidació consecutius.

Els càlculs han estat duts a terme aplicant la teoria del funcional de densitat (DFT)^{36,37} mitjançant el funcional híbrid Becke3LYP.^{38,39} Les funcions de base emprades han estat la LANL2DZ⁴⁰ pel molibdè, seleni i sofre i 6-31+g(d)^{41,42} per la resta d'àtoms (carbonis, hidrogens i nitrogens). Les funcions de base del seleni i el sofre han estat complementades amb una capa de funcions de polarització D. Els programari emprat ha estat el paquet Gaussian 03, revisió C02.⁴³

Totes les geometries han estat primerament optimitzades en fase gas i, posteriorment, per tal de calcular l'efecte de l'entorn proteic, s'ha fet, a partir de les estructures ja minimitzades, un càlcul puntual d'energia en PCM. Com a solvent s'ha emprat l'acetonitril, ja que és el que té una constant dielèctrica de 36.64, que és la que ens aproxima més a l'estat del centre actiu d'una proteïna corrent. S'ha realitzat aquest procediment per a tots els mínims energètics del cicle i pels estats de transició. L'estudi s'ha fet amb el model de la forma nativa de l'enzim (amb seleni) i, posteriorment, canviant el seleni per sofre.

4 Resultats

El cicle catalític que s'ha seguit com a model ha estat una variació del descrit per Boyington i col·laboradors,⁹ presentat en la Figura 8 on es defineix també l'etiquetat de les diferents estructures. Les diferents etapes del cicle poden ser agrupades en quatre fases:

- Desprotonació del formiat per part del seleni, i sortida del diòxid de carboni. Des de l'estructura A fins a l'estructura B.
- Desprotonació del seleni per part d'una histidina. Des de l'estructura B fins a la D.
- Oxidació del molibdè mitjançant la pèrdua successiva de dos electrons. Des de l'estructura D fins a la F.
- Incorporació d'un nou formiat. Des de l'estructura F fins a A, on es recomença el cicle.

Els canvis energètics i geomètrics involucrats en cadascuna d'aquestes quatre etapes es discuteixen a continuació. En les dues últimes subseccions es discutiran de forma global les variacions energètiques i estructurals al llarg del cicle catalític.

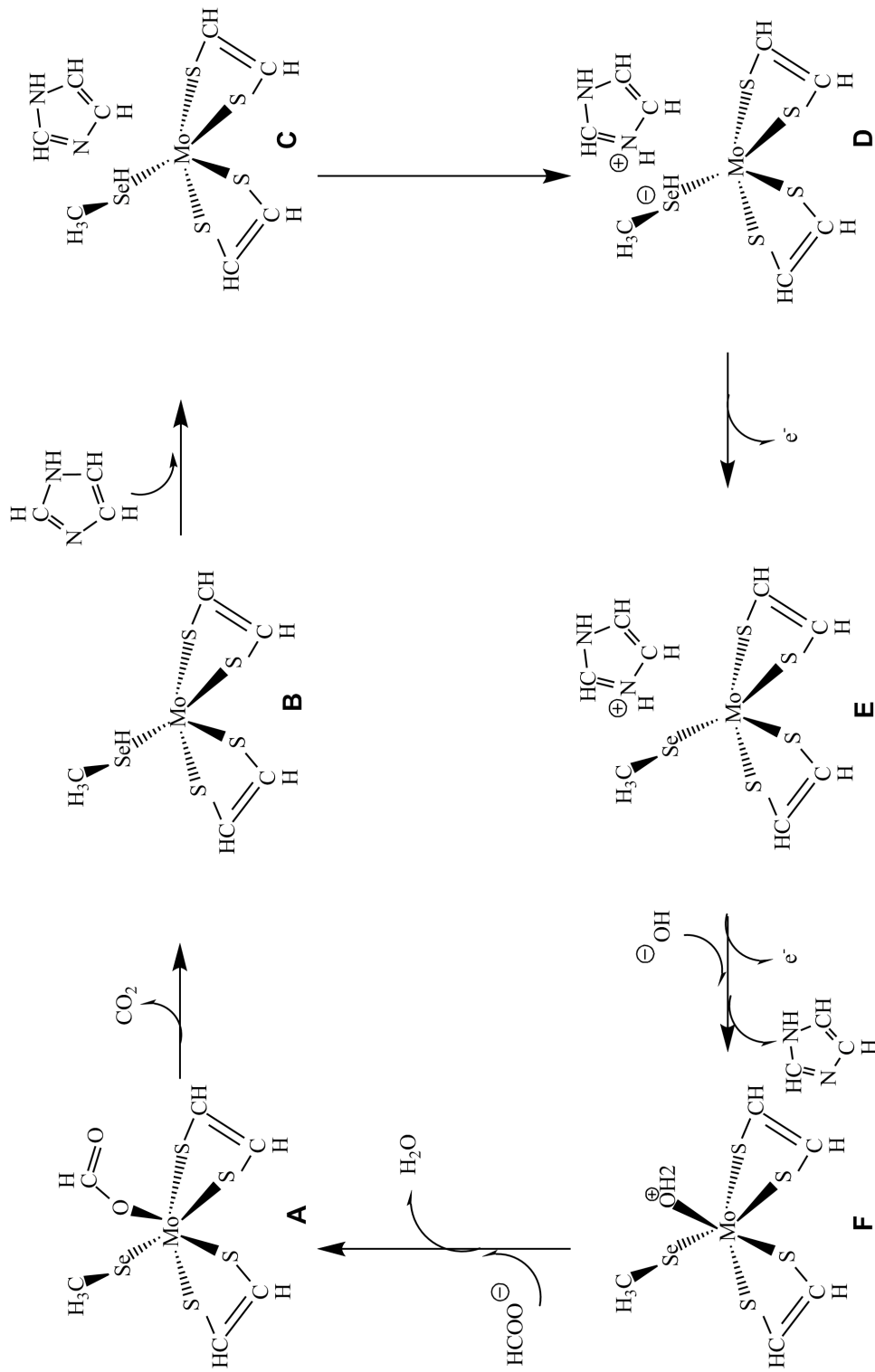


Figura 8: Representació esquemàtica del cicle catalític de l'enzim

4.1 Desprotonació del formiat

Aquest primer pas s'inicia en l'intermedi A, en el qual el molibdè es troba en estat d'oxidació +6. A banda dels dos lligands dianiònics de tipus pterina, que són coordinats al metall al llarg de tot el cicle, en aquesta estructura inicial hi ha dos altres lligands formalment aniònics, Me-Se⁻ i OCHO⁻. El formiat es troba coordinat per un dels seus àtoms d'oxigen. Aquesta primera etapa transforma A en B mitjançant la transferència de l'àtom d'hidrogen del formiat al seleni. Això comporta la reducció formal del metall a l'estat d'oxidació +4 i la sortida de la molècula de diòxid de carboni.

La Figura 9 recull les estructures optimitzades corresponents a aquesta primera etapa per al sistema amb seleni. L'intermedi A presenta distàncies d'enllaç curtes Mo-O (2.058 Å) i Mo-Se (2.487 Å). La distància Mo-Se és 0.145 Å més llarga en l'intermedi B, amb un valor de 2.632 Å. Això mostra la inferior capacitat com a lligand de Me-Se-H (en B) respecte a Me-Se⁻ (en A). L'estat de transició presenta la geometria esperada, amb transferència d'un àtom d'hidrogen entre el carboni del formiat i l'àtom de seleni com a coordenada de reacció. En l'estat de transició, la distància C-H és 1.47 Å, 0.366 Å més llarga que en l'intermedi A; i la distància Se-H és 1.700 Å, 0.113 Å més llarga que en l'intermedi B. La reacció és pràcticament termoneutra, amb B només 1.9 kcal/mol per sobre d'A. La barrera energètica és relativament alta, 22.6 kcal/mol, tot i que perfectament accessible. L'efecte catalític de l'enzim és evident, ja que els enllaços C-H són molt difícils de trencar en condicions tan suaus.

La Figura 10 recull les estructures optimitzades corresponents al cas del sistema amb sofre. Les estructures són qualitativament molt similars. La diferència principal es troba en el fet que les distàncies d'enllaç on el sofre està involucrat són més curtes que les del seleni per un valor al voltant de 0.10 Å, d'acord amb el diferent radi dels dos àtoms. La reacció és més exotèrmica en

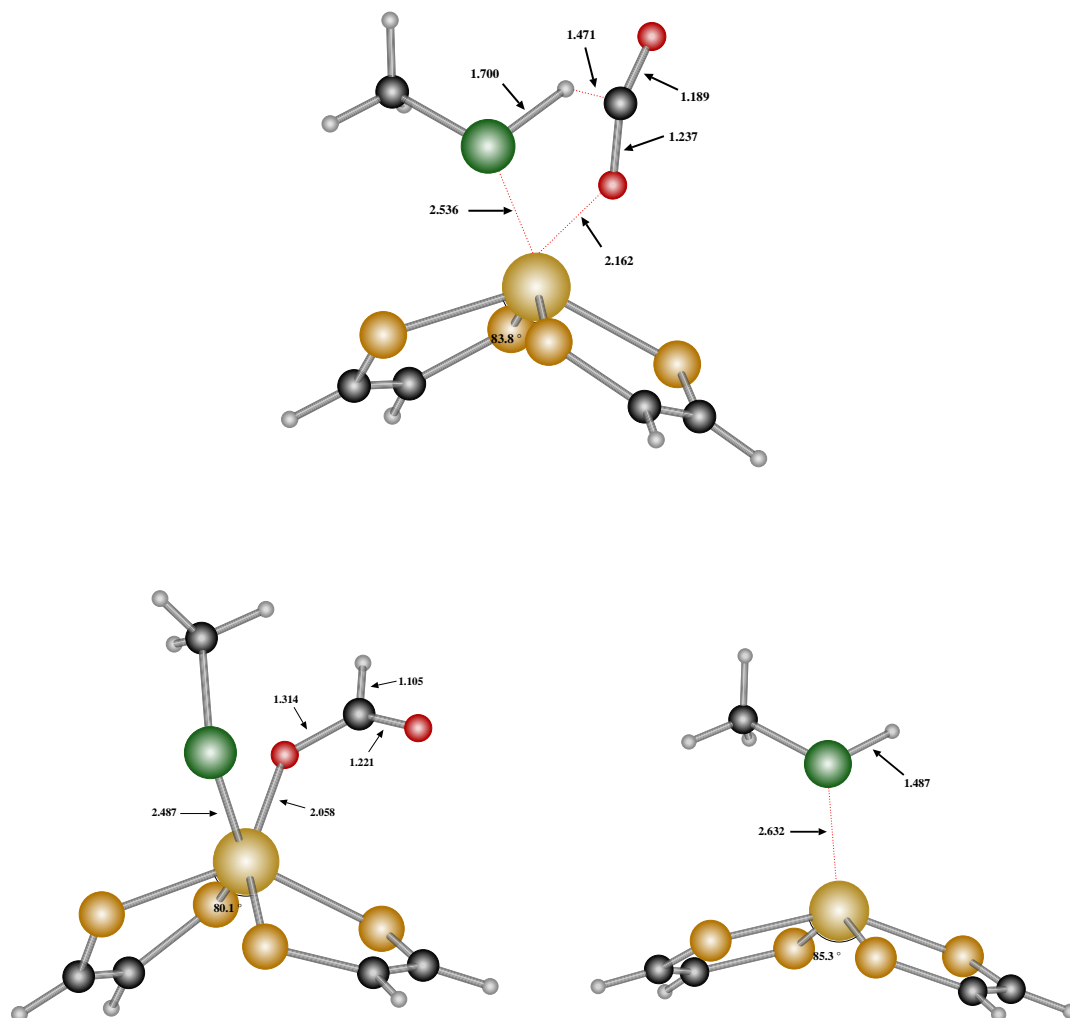


Figura 9: Punts estacionaris corresponents a l'etapa de desprotonació del formiat en el model amb seleni. Intermedi B (esquerra baix), estat de transició (dalt) intermedi B (dreta baix). S'indica el valor en Å d'algunes distàncies seleccionades.

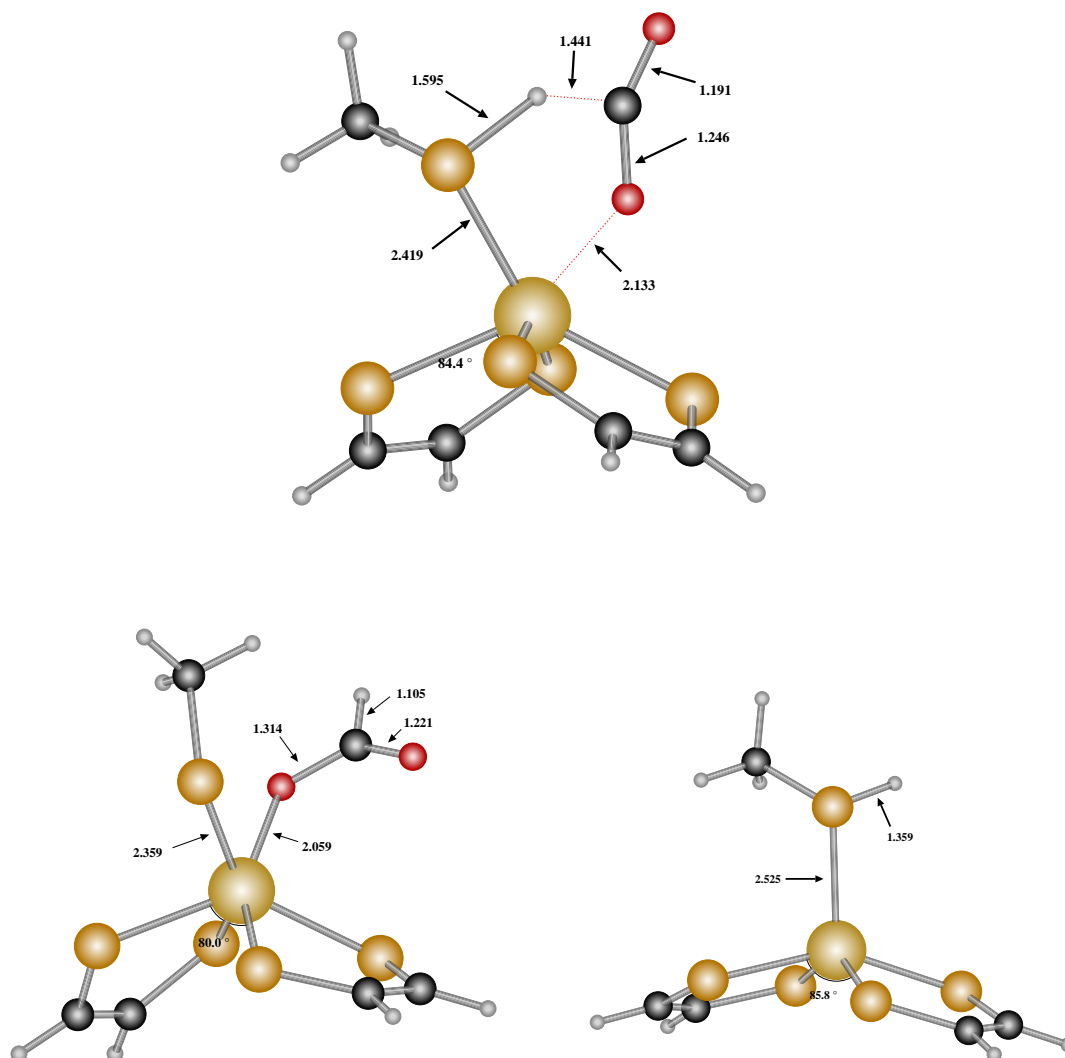


Figura 10: Punts estacionaris corresponents a l'etapa de desprotonació del formiat en el model amb sofre. Intermedi A (esquerra baix), estat de transició (dalt) intermedi B (dreta baix). S'indica el valor en Å d'algunes distàncies seleccionades.

el cas del sofre, l'estructura B és 6.0 kcal/mol per sota d'A. La barrera també és més baixa en el cas del sofre, amb un valor de 19.0 kcal/mol (a comparar amb les 22.6 kcal/mol del sistema amb seleni). El sofre té doncs una major afinitat protònica que el seleni, el que està perfectament d'acord amb la inferior acidesa de l'àcid sulfhídric respecte de selenhídric. És interessant notar que aquesta etapa del cicle sembla ser més fàcil per al sistema amb sofre que per al sistema amb seleni.

4.2 Desprotonació del seleni

La segona etapa s'inicia en l'intermedi B, resultant del pas anterior, amb un enllaç Se-H, i finalitza en l'intermedi D, on l'hidrogen inicialment enllaçat al seleni s'ha transferit a una histidina pròxima. No hi ha canvis d'estat d'oxidació en aquest pas, però sí que hi ha una separació de càrrega, ja que en el punt final el fragment metàl·lic queda carregat negativament, i la histidina amb una càrrega positiva. Des del punt de vista computacional, s'introdueix una estructura suplementària C, on la histidina neutra s'introdueix en el sistema. Aquesta estructura és necessària perquè la histidina està absent en B, ja que s'havia omès en l'etapa inicial degut a que no hauria estat ben coordinada i podia complicar la convergència de l'optimització de geometria. La Figura 11 recull les estructures optimitzades corresponents als intermedis B, C, D per al cas del sistema amb seleni. L'intermedi B conté una distància Mo-Se bastant llarga (2.632 Å). Tal com s'ha discutit anteriorment, això reflecteix l'escàs poder coordinant del grup Me-Se-H. Aquesta distància Mo-Se resta pràcticament inalterada quan s'introdueix l'imidazol. La distància Se-H sí que es veu en canvi afectada de forma sensible per la presència de la histidina amb un increment de 0.05 Å. Això reflecteix la presència d'un enllaç de pont d'hidrogen amb un dels àtoms de nitrogen de l'imidazol, que també es manifesta en l'arranjament

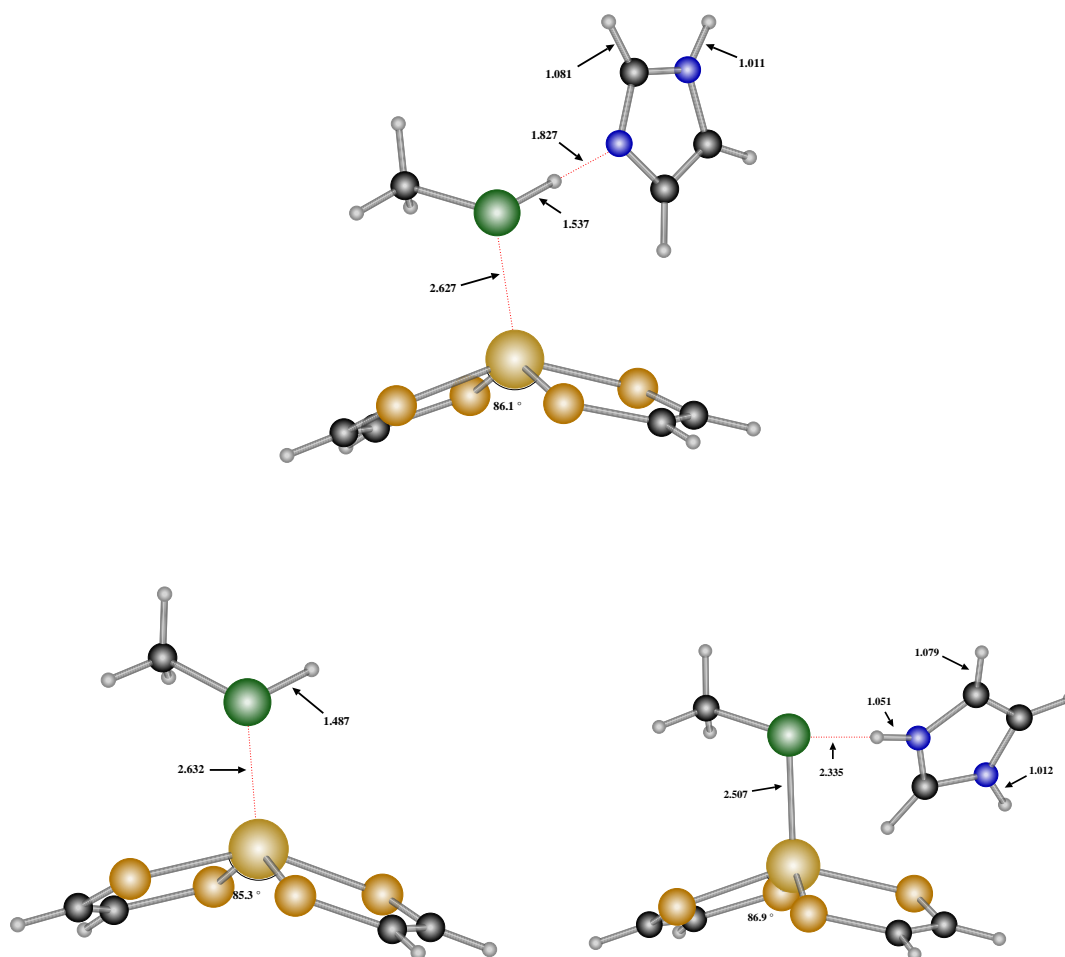


Figura 11: Intermedis corresponents a l'etapa de desprotonació del seleni. Intermedi B (esquerra baix), intermedi C (dalt) intermedi D (dreta baix). S'indica el valor en Å d'algunes distàncies seleccionades.

quasi lineal dels àtoms Se-H · · N. De tota manera, en l'espècie C, l'hidrogen resta unit clarament al seleni, ja que la distància N-H és encara prou llarga, amb un valor d'1.827 Å. La situació canvia completament en l'intermedi D, resultant de la transferència del protó del seleni al nitrogen, amb distàncies Se-H i N-H de 2.335 i 1.051 Å, respectivament. És interessant constatar com la pèrdua del protó per part del seleni augmenta significativament la seva afinitat per l'àtom metàl·lic. La distància Mo-Se es redueix des de 2.627 Å en C fins a 2.507 Å en D, un valor que ja és molt pròxim als 2.487 Å del complex de partida A.

La variació energètica en el trànsit de B a C reflecteix fonamentalment la força de l'enllaç de pont d'hidrogen, que és prou fort, amb un valor de 8.9 kcal/mol. El pas de C a D és clarament exotèrmic, amb una diferència d'energia de 22.5 kcal/mol en favor de D. Aquest resultat es deu en bona part a la consideració d'un entorn polar en aquests càlculs d'energies. La Figura 12 recull les estructures B, C, D per al sistema amb sofre. Les estructures són altre cop similars, amb la diferència principal en les distàncies més curtes associades al menor radi atòmic del sofre. Es pot esmentar la lleugerament major elongació de l'enllaç S-H en presència de l'imidazol, el que suggereix un enllaç d'hidrogen més fort. Això es confirma amb l'examen de les energies, amb una diferència de 9.6 kcal/mol entre B i C (a comparar amb el valor de 8.9 per al cas del seleni). Altrament, el descens d'energia en el pas de C a D també és important per al cas del sofre, amb un guany d'energia de 19.8 kcal/mol.

La presència de dos mínims diferenciats C i D en fase gas requereix l'existència d'un estat de transició entre ells. Les reaccions àcid/base solen tenir barreres molt baixes, i aquest procés de transferència de protó entre dos centres bàsics no n'és una excepció. Els estats de transició per als sistemes amb seleni i sofre han estat calculats, i les seves geometries es presenten en la figura 13. Les geometries són molt pròximes a les de l'intermedi C. En el cas del sistema amb

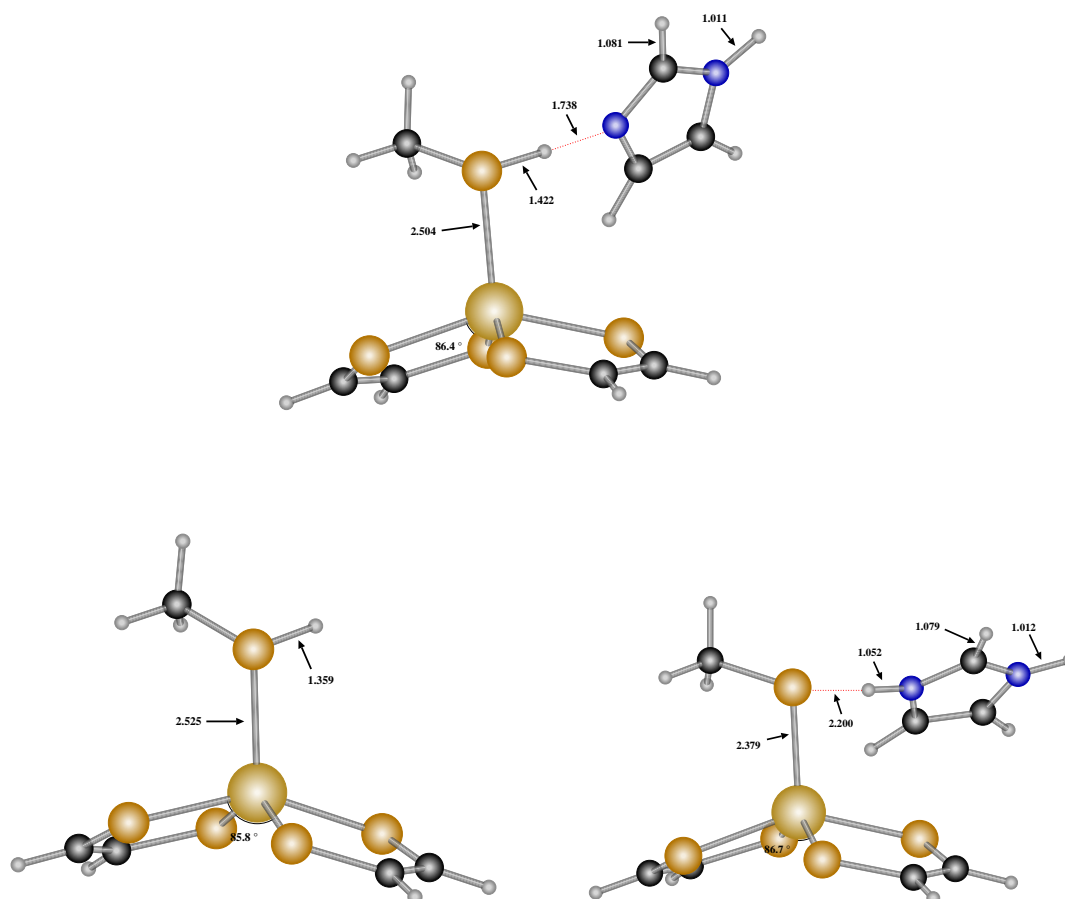


Figura 12: Intermedis corresponents a l'etapa de desprotonació del sofre. Intermedi B (esquerra baix), intermedi C (dalt) intermedi D (dreta baix). S'indica el valor en Å d'algunes distàncies seleccionades.

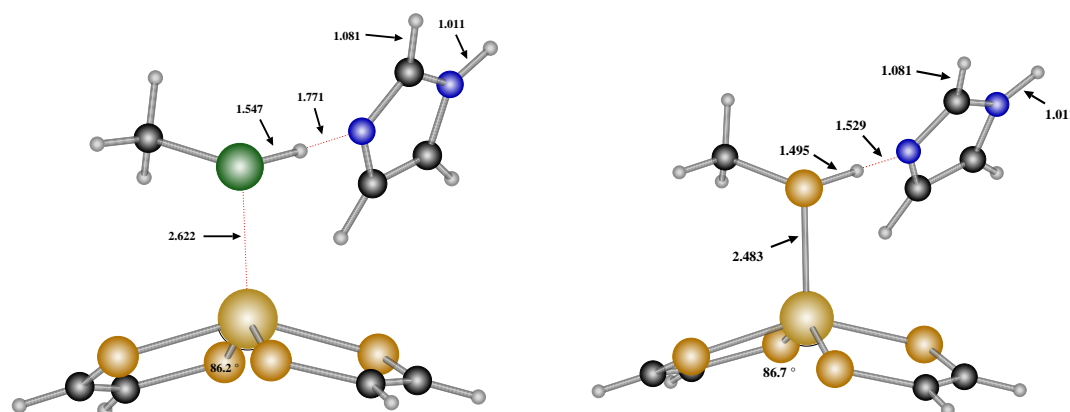


Figura 13: Estats de transició corresponents al trànsit entre C i D. Sistema amb seleni a l'esquerra, sistema amb sofre a la dreta. S'indica el valor en Å d'algunes distàncies seleccionades.

seleni, la distància Se-H només s'ha allargat en 0.01 Å; l'allargament és de 0.073 Å en el cas de la distància S-H en l'altre sistema. La gran similitud entre estat de transició i reactiu en una reacció fortament exotèrmica suggereix una barrera baixa, i aquest és el cas. De fet, la barrera, que és baixa en fase gas, desapareix quan es fan els càlculs puntuals PCM. L'estat de transició es troba doncs 0.8 kcal/mol de C en el cas del sistema amb Se, i 1.4 kcal/mol per sota en el cas del sistema amb S. Aquesta segona etapa és més favorable en el cas del seleni, però és poc probable que tingui un efecte directe en l'eficiència catalítica total perquè transcorre pràcticament sense barrera.

4.3 Oxidació del molibdè

Aquest tercer pas s'inicia en l'intermedi D, resultant de l'etapa anterior, i continua fins a F passant per E. El resultat net principal d'aquesta etapa és la pèrdua de dos electrons per part del centre actiu. Això representa que el molibdè incrementa formalment el seu estat d'oxidació de +4 a +6. Aquests dos electrons

van a la caixa de Fe-S en el sistema enzimàtic. Tal com s'ha esmentat en el procediment, en el nostre cas els transferim a una molècula de benzil viologen dicatiònica, que també s'utilitza com a agent oxidant en la bioquímica experimental d'aquests sistemes. El pas de D a E consisteix simplement en la transferència d'un electró, però el d'E a F és més elaborat. A banda de la pèrdua d'un electró, també s'incorpora al sistema un hidroxil monoaniònic, i es retira un imidazol neutre. L'entrada de l'hidroxil té com objectiu l'obtenció del sistema observat experimentalment, que conté aquest lligand, i la sortida de l'imidazol respon a la seva desaparició de l'esfera de coordinació en aquesta etapa i la següent. La càrrega positiva del sistema es deu finalment a la superior basicitat de l'oxigen del sistema M-OH respecte del nitrogen de l'imidazol. El fet que la reacció impliqui una transferència electrònica que es simula amb la utilització d'un acceptor extern d'electrons impossibilita el càlcul d'estats de transició. En qualsevol cas, això no sembla crític, perquè les barreres d'activació no solen ser altes per a aquest tipus de processos.

La Figura 14 presenta les geometries optimitzades dels intermedis D, E i F per al sistema amb seleni. Les principals diferències entre els intermedis D i E són l'escurçament de la distància Mo-Se (de 2.507 a 2.445 Å) i l'allargament de la distància Se-H (de 2.335 a 2.544 Å). L'oxidació del molibdè a l'estat d'oxidació +5 fa que augmenti la seva capacitat acceptora d'electrons dels lligands, el que enforteix l'enllaç amb el seleni. La transferència subseqüent d'electrons del seleni al metall debilita l'enllaç d'hidrogen amb l'imidazol protonat. Pel que fa a l'estructura F, és interessant observar que l'enllaç Mo-Se manté una distància molt similar (2.453 Å) a la de l'intermedi E, i que en canvi la distància Mo-O és prou llarga, amb un valor de 2.338 Å. L'aigua és doncs un lligand massa pobre per coordinar aquest complex de molibdè.

Aquesta etapa de la reacció és fortament endotèrmica, amb un increment

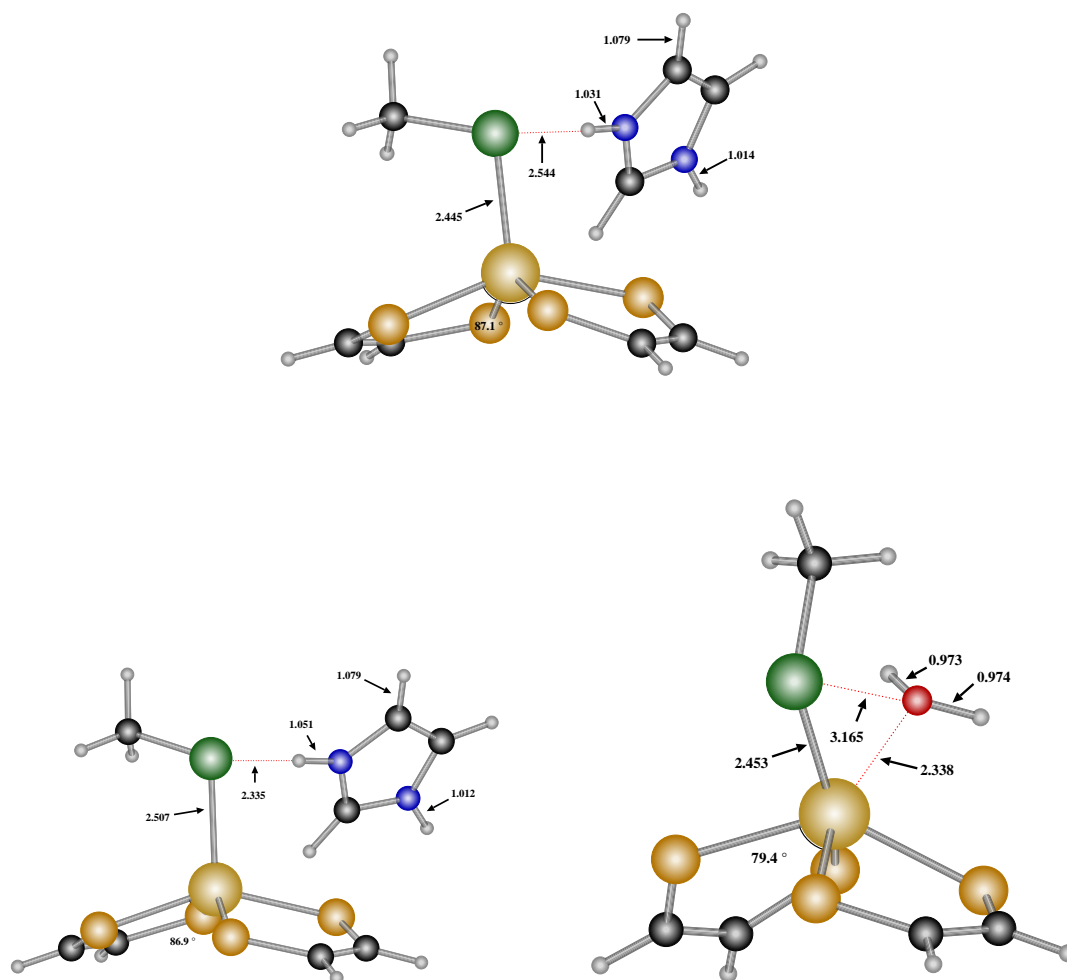


Figura 14: Intermedis corresponents a l'etapa d'oxidació del molibdè en el sistema amb seleni. Intermedis D (esquerra baix), E (dalt) F (dreta baix). S'indica el valor en Å d'algunes distàncies seleccionades.

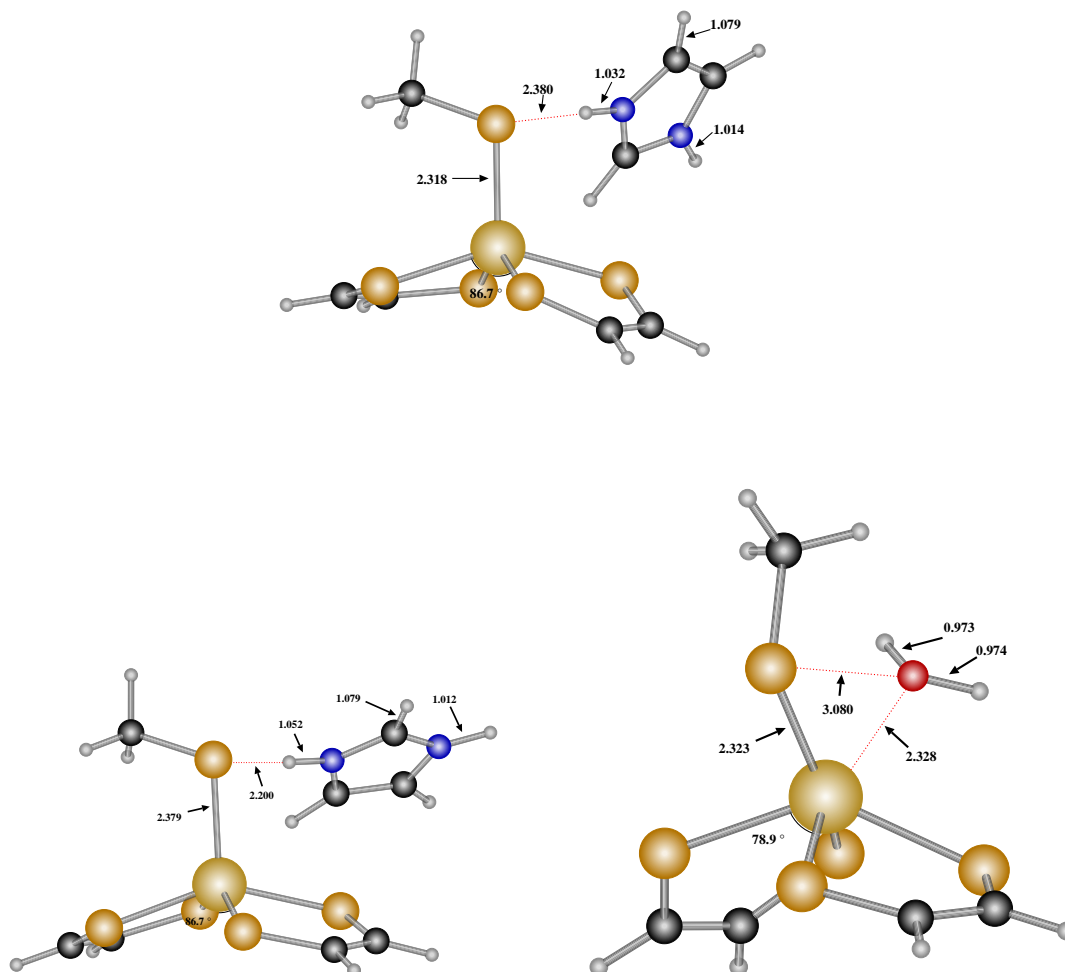


Figura 15: Intermedis corresponents a l'etapa d'oxidació del molibdè en el sistema amb sofre. Intermedis D (esquerra baix), E (dalt) F (dreta baix). S'indica el valor en Å d'algunes distàncies seleccionades.

important de l'energia, de 13.7 kcal/mol entre D i E, i de 22.1 kcal/mol entre E i F. Aquests valors poden no ser exactes pel fet d'haver emprat benzil viologen com a acceptor d'electrons, però suggereixen en qualsevol cas que aquesta etapa d'oxidació del molibdè presenta una barrera important.

La Figura 15 recull les estructures optimitzades corresponents al cas del sistema amb sofre. Les estructures són qualitativament similars. Es produeix també un escurçament de la distància Mo-S en el trànsit de D a E, en aquest cas de 2.379 a 2.318 Å. La coordinació de la molècula d'aigua en l'intermedi F és feble. Pel que fa les energies, l'etapa és fins i tot més endotèrmica que en el cas del Se, amb un increment de 19.9 kcal/mol entre D i E, i un increment de 18.7 kcal/mol entre E i F. Això reflecteix sens dubte la major electronegativitat del sofre respecte al seleni. Tot i que formalment els electrons s'extreuen de l'àtom metàl·lic, la variació de les distàncies Mo-Se (Mo-S) els dos àtoms no són independents. I la major afinitat electrònica del sofre dificulta més la cessió d'electrons per part del centre actiu que quan es té seleni.

Aquesta etapa presenta doncs una barrera important, que és més baixa en el cas del seleni que en el del sofre.

4.4 Incorporació d'un nou formiat

La darrera etapa del procés consisteix en la substitució de la molècula d'aigua de l'intermedi F per un anió formiat. Això permet tornar al punt de partida del cicle enzimàtic. La discussió d'aquesta etapa no inclou doncs nous intermedis però és interessant fer-la des del punt de vista estructural per veure els canvis implicats, i des del punt de vista energètic per comprovar que no té una barrera excessiva. La càrrega total del sistema és diferent, però això respon als estats de protonació que cal esperar dels grups entrant (formiat) i sortint (aigua) a un pH neutre. L'estat de transició entre F i A no s'ha calculat, però és d'esperar que

aquest procés de substitució de lligands tingui una barrera baixa.

La Figura 16 presenta les geometries dels intermedis F i A per al sistema amb seleni. La diferència de capacitat de coordinació entre l'aigua (neutra) i el formiat (aniònic) és evident, amb distàncies Mo-O de 2.338 Å en F i 2.058 Å en A. És curiós en canvi com aquesta diferència en la distància Mo-O té una repercussió petita en les distància Mo-Se que només es modifica en 0.034 Å (de 2.453 a 2.487 Å). Pel que fa l'energia, la reacció és clarament exotèrmica, amb un descens de 27.7 kcal/mol en anar de F a A.

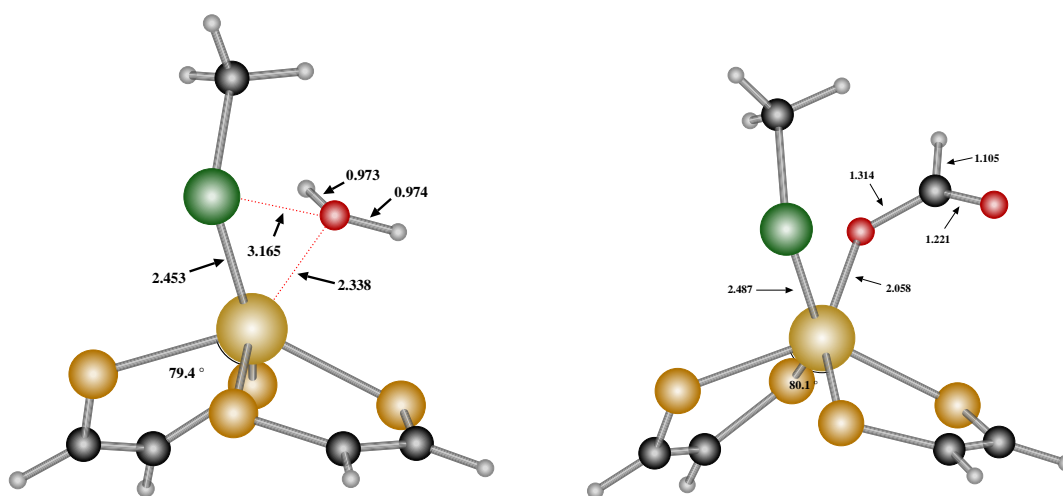


Figura 16: Intermedis corresponents a l'etapa d'incorporació d'un nou formiat en el sistema amb seleni. Intermedis F (esquerra), A (dreta). S'indica el valor en Å d'algunes distàncies seleccionades.

Les geometries corresponents al sistema amb S estan recollides en la Figura 17. Les tendències són exactament les mateixes, amb valors pràcticament idèntics (diferències de 0.01 Å) en les distàncies Mo-O respecte al sistema amb seleni. La diferència d'energia entre F i A és lleugerament menor que en el cas del sistema de seleni, però l'etapa és encara netament exotèrmica, amb un valor de 23.7 kcal/mol. L'etapa és doncs més favorable per al cas del seleni.

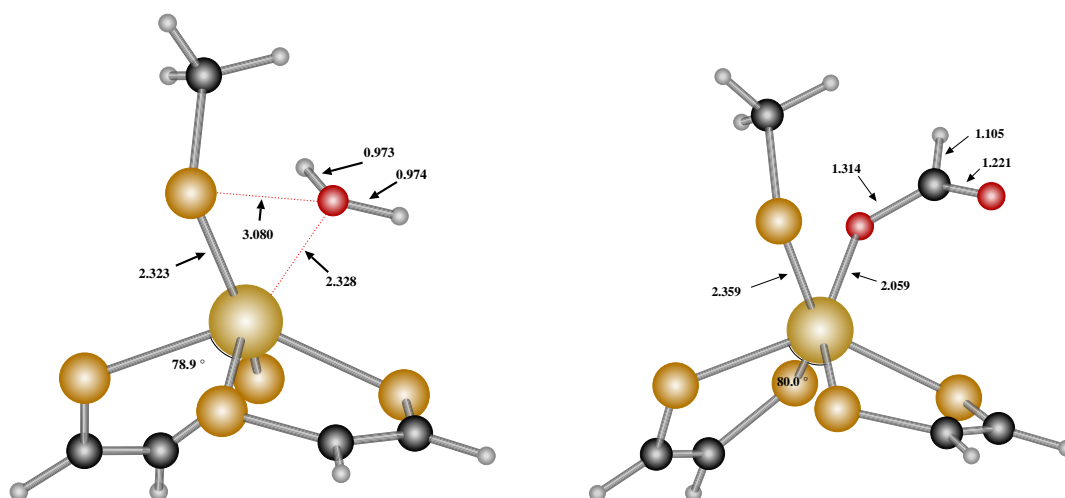


Figura 17: Intermedis corresponents a l'etapa d'incorporació d'un nou formiat en el sistema amb sofre. Intermedis F (esquerra), A (dreta). S'indica el valor en Å d'algunes distàncies seleccionades.

4.5 Anàlisi global de les energies

En les seccions anteriors s'han comentat, dins de la presentació de les etapes de reacció, les energies relatives de totes les espècies involucrades en el cicle catalític descrit en la Figura 8. En aquesta secció es fa una anàlisi global de les energies relatives, que es troben recollides en la Taula 5. Totes les energies es presenten relatives a la de l'intermedi A, on el formiat coordina el molibdè. S'ha inclòs també en la taula l'energia d'A', que correspon al punt de començament del següent cicle. A' es troba 21.4 kcal/mol per sota d'A, el que correspon a l'exotermicitat de la reacció neta que té lloc. Els dos perfils energètics, un per al sistema amb seleni i un altre per al sistema amb sofre, es presenten esquemàticament en la Figura 18.

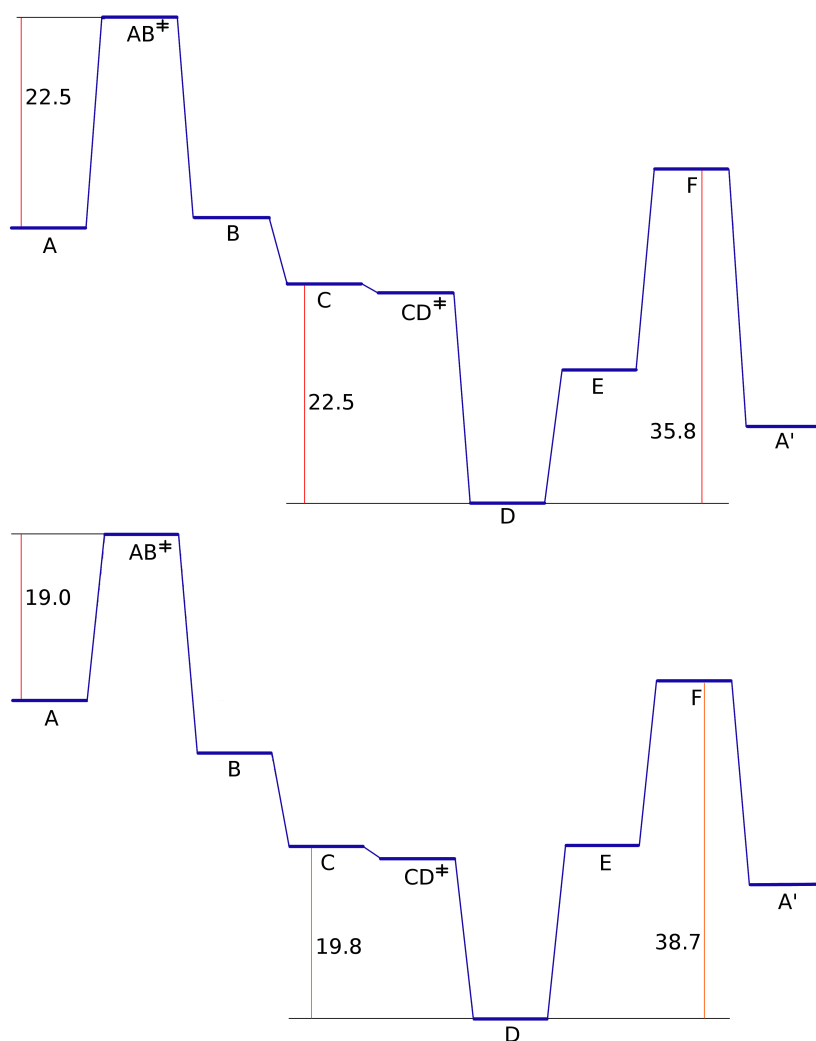


Figura 18: Perfil energètic, en Kcal/mol, de la reacció pel model amb seleni (a dalt) i pel model amb sofre (a baix).

Qualitativament, el perfil energètic és similar per a ambdós sistemes (seleni i sofre). Hi ha dues fases on s'observa un increment energètic, i doncs una barrera per a la reacció. La primera és el pas d'A a l'estat de transició AB, i la segona és el trànsit entre D i F, que inclou l'intermedi E. En un primer moment, mirant el gràfic (Figura 18), es podria pensar que la barrera AB és la limitant, perquè AB

és el punt més alt del perfil. Observant més detingudament el gràfic però, es veu que la barrera més alta correspon a l'increment entre D i F. AB té una l'energia relativa més alta (22.5 per al Se), però s'hi accedeix des de l'intermedi A, amb una energia relativa de 0 kcal/mol (la barrera és doncs de 22.5 kcal/mol). En canvi, per arribar a F, tot i que té una energia relativa de només 6.3 kcal/mol en el cas del Se, s'ha de passar per D, que té una energia de -29.5, el que dóna una barrera per a aquesta etapa de 35.8 kcal/mol.

Intermedi	Barrera Se	Barrera S	Diferència (Se-S)
A	0	0	0
tsAB	22.5	19.0	3.5
B	1.9	-5.9	7.8
C	-6.9	-16.6	9.7
tsCD	-7.7	-18.1	10.4
D	-29.5	-36.4	6.9
E	-15.8	-16.5	0.7
F	6.2	2.2	4.0
A'	-21.4	-21.4	0

Taula 5: Energies relatives (kcal/mol) de cada intermedi respecte A pel model amb seleni i pel model sofre. La darrera columna mostra la diferència entre el sofre i el seleni.

És interessant observar que cadascuna d'aquestes dues barreres es pot relacionar amb una de les dues diferències químiques principals entre selenocisteïna i cisteïna: la seva acidesa i el seu potencial de reducció.

El seleni (o sofre) està protonat en els intermedis B i C mentre que en la resta (A, D, E, F i A') resta desprotonat. L'estat de transició AB correspon precisament al moment en el qual l'aminoàcid extreu el protó del carboni central del

format. L'acidesa de seleni i sofre és diferent i el pK_A dels dos aminoàcids difereix en més de dues unitats (5.73 per la Sec i 8.53 per la Cys). Degut, doncs, a la diferència d'acidesa entre dos aminoàcids, cal pensar que la cisteïna, més bàsica tingui major afinitat pel protó. Això es recull precisament en les dades de la taula 6. La reacció de desprotonació en el cas del sofre és 7.8 kcal/mol més favorable en el cas del sofre (diferència d'energia entre A i B), i la cinètica del procés també afavoreix la reacció per al sofre, per 3.5 kcal/mol en el cas de la diferència d'energia entre A i AB. Si aquesta fós l'etapa limitant, el cicle enzimàtic seria doncs més eficaç amb cisteïna que amb selenocisteïna. Tal com s'ha comentat més amunt, els nostres càlculs indiquen però que aquesta no és l'etapa limitant.

Intermedi	Barrera Se	Barrera S	Diferència (Se-S)
A	0.0	0.0	0.0
tsAB	22.5	19.0	+3.5
B	1.9	-5.9	+7.8

Taula 6: Energies relatives (en kcal/mol) de la fase de protonació del seleni/sofre i diferència entre els dos elements.

Les barreres més importants i que realment marquen la diferència entre el sofre i el seleni estan, com ja s'ha comentat, en el pas de l'intermedi D fins a l'intermedi F. Aquesta transformació correspon a la fase redox de la reacció. El pas de D a l'intermedi E, correspon a l'alliberament d'un electró i el pas de D a F correspon a l'alliberament del segon electró. L'estat d'oxidació del seleni o el sofre no varia al llarg del cicle catalític, sí que ho fa, en canvi, el del molibdè que oscila entre +4 i +6. Tenim doncs, que l'estat d'oxidació formal del molibdè és +6 en els intermedis A, F i A'; +5 en l'intermedi E i +4 en els intermedis B, C i D. El pas de D a F suposa l'oxidació del molibdè de +4 a +6 i es correpon

amb la part més crítica del nostre cicle. Tal com ja s'ha comentat abans en la discussió d'aquesta etapa, hi ha importants variacions en la distància Mo-Se (o Mo-S), que indiquen una forta associació entre els dos àtoms i suggereixen que no es pot considerar que els seus estats d'oxidació siguin completament independents. El sofre, més electronegatiu, ha de ser més difícil d'oxidar, i això es reflecteix en les energies relatives d'aquesta etapa recollides en la taula 7. En efecte, l'abstracció del primer electró (diferència entre D i E) és 6.2 kcal/mol més favorable en el cas del Se, diferència que es manté en 2.9 kcal/mol per al cas del segon electró. El superior potencial de reducció del sofre fa doncs que sigui més difícil oxidat l'enzim amb cisteïna, i que la reacció sigui doncs més favorable amb selenocisteïna, tal com s'observa experimentalment.

Intermedi	Barrera Se	Barrera S	Diferència (Se-S)
D	0	0	0
E	13.7	19.9	-6.2
F	35.8	38.7	-2.9
A'	8.1	14.9	-6.8

Taula 7: Energies relatives (en kcal/mol) de la fase redox (de D a F) pel model amb seleni i pel model amb sofre i diferència entre els dos elements.

4.6 Anàlisi global de les estructures

L'estudi de les geometries minimitzades no ens aporta grans diferències entre el model amb seleni i el model amb sofre. Els dos àtoms tenen característiques diferents que ja fan pensar, d'entrada, que hi haurà coses que variaran. A continuació s'estudien les variacions de la distància de l'enllaç Mo-Se/S i les distàncies de l'enllaç que es forma i es trenca en la protonació i desprotonació del Se/S.

4.6.1 Distància Mo-Se i Mo-S

La distància d'enllaç entre el metall i el seleni o sofre és d'esperar que variï al llarg de la reacció. En els dos models l'augment o disminució d'aquesta sembla tenir relació directe amb l'estat d'oxidació del molibdè. És a dir, quan el molibdè està més reduït, la distància que el separa del seleni/sofre és més gran i quan aquest d'oxida, la distància disminueix.

Intermedi	Mo-Se	Mo-S	Estat d'oxidació
A	2.487	2.359	+4
tsAB	2.536	2.419	-
B	2.632	2.525	+6
C	2.627	2.504	+6
tsCD	2.622	2.483	+6
D	2.507	2.379	+6
E	2.445	2.318	+5
F	2.453	2.323	+4

Taula 8: Relació entre la distància de l'enllaç Mo-Se/S, en Å, i l'estat d'oxidació del molibdè

Així doncs, en el model amb seleni, quan comença la reacció la distància entre ambdós àtoms (Mo-Se) és de 2.487 Å i augmenta en la primera etapa fins als 2.632 Å de l'intermedi B, quan l'estat d'oxidació del molibdè és +6 i el seleni està protonat. A partir d'aquí, la distància comença a disminuir fins arribar als 2.445 Å de l'intermedi E. En el darrer punt, intermedi F, augmenta un xic, això podria ser degut a la desestabilització que origina la protonació de l'OH.

En el model amb sofre s'observa un comportament que segueix el mateix patró. Les distàncies en general són més curtes degut a les característiques pròpies del sofre respecte el seleni però, pel que fa al comportament de l'enllaç

S-Mo podem dir que es comporta igual que l'enllaç Se-Mo. La Taula 8 resumeix les distàncies d'enllaç tant per al model amb seleni com per al model amb sofre i les compara amb els diferents estats d'oxidació del molibdè.

4.6.2 Protonació i desprotonació del Se/S

En aquest apartat no es poden remarcar diferències destacables entre el model amb seleni i el model amb sofre. Si bé és cert, com comentava a l'apartat anterior, que amb sofre les distàncies són inferiors que amb seleni (degut al menor radi atòmic del sofe). A banda d'això, els models amb els dos elements tenen el mateix comportament, tal com es recull en la taula 9.

	Se/S-H		H-C		H-N	
	Se	S	Se	S	Se	S
tsAB	1.700	1.595	1.471	1.441	–	–
B	1.487	1.359	–	–	–	–
C	1.537	1.422	–	–	1.827	1.738
tsCD	1.547	1.495	–	–	1.771	1.529
D	2.335	2.200	–	–	1.051	1.052

Taula 9: Distàncies, en Å, en la protonació i desprotonació del seleni i del sofre. La distància Se/S-H correspon a la distància entre el Se/S i l'H del substrat, la distància H-C correspon a la distància entre l'H i el C del substrat i, la distància H-N, correspon a la distància entre el H i l'N de l'anell d'imidazol.

Hi ha una petita diferència en les estructures obtingudes pel sofre i el seleni en l'intermedi D: la rotació de l'anell d'imidazol, que és diferent. Això és degut a que en aquest punt hi ha molts intermedis, amb diferències energètiques irrisòries, que es generen rotant aquest anell.

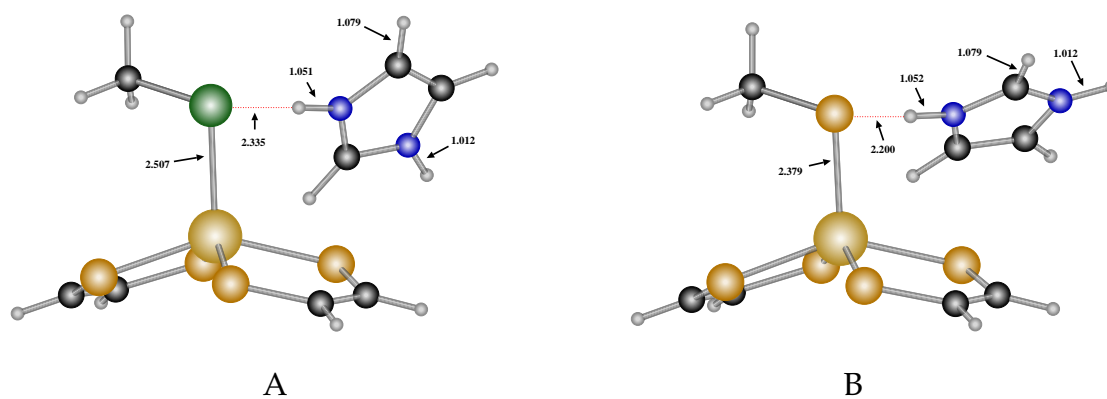


Figura 19: Diferència en la rotació de l'anell d'imidazol en l'intermedi D pel model amb seleni (A) i pel model amb sofre (B)

5 Conclusions

- El nostre estudi computacional del cicle catalític de la format deshidrogenasa H confirma la validesa qualitativa del mecanisme proposat per Boyington i col·laboradors a partir de dades experimentals.
- Només hi ha dues etapes del cicle catalític amb barreres energètiques suficients per discriminar entre l'eficiència de diferents mutacions de l'enzim: la desprotonació del formiat i l'oxidació del molibdè.
- L'enzim natiu, amb selenocisteïna, té una barrera més alta per a la desprotonació del formiat que l'enzim mutat, amb cisteïna. Això es deu a la superior afinitat protònica del sofre respecte del seleni.
- L'enzim natiu, amb selenocisteïna, té una barrera més baixa per a l'oxidació del molibdè que l'enzim mutat, amb cisteïna. Això es deu a la menor electronegativitat del seleni respecte del sofre.
- L'etapa de l'oxidació del molibdè presenta una barrera més alta que la de desprotonació del formiat, i decideix doncs l'eficàcia del cicle catalític.
- Els nostres càlculs sobre un sistema model reproduïxen doncs l'observació experimental d'una major eficàcia del residu selenocisteïna en aquest enzim, i l'expliquen a partir de la diferència de potencials de reducció entre seleni i sofre.

Referències

- [1] CD Thomson. *Eur J Clin Nutr*, 58:391, 2004.
- [2] SB Goldhaber. *Regul Toxicol Pharmacol*, 38:232, 2003.
- [3] *Dietary Reference Intakes: Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. Institute of Medicine, Food, and Nutrition Board (USA). 2000.
- [4] *National Nutrient Database for Standard Reference* (<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>). U.S. Department of Agriculture and Agricultural Research Service., volume 16. 2003.
- [5] MA Beck, O Levander, and J Handy. *J of Nutr*, 133:1463S, 2003.
- [6] V Diwadkar-Navsariwala, GS Prins, SM Swanson, LA Birch, VH Ray, S Heydayat, DL Lantvit, and AMDiamond. *Proc Natl Acad Sci*, 103:8179, MAY 2006.
- [7] L Johansson, G Gafvelin, and ESJ Arner. *Biochim Biophys Acta*, 1726:1, OCT 2005.
- [8] SV Khangulov, VN Gladyshev, GC Dismukes, and TC Stadtman. *Biochemistry*, 37:3518, 1998.
- [9] JC Boyington, VN Gladyshev, SV Khangulov, TC Stadtman, and PD Sun. *Science*, 275:1305, 1997.
- [10] MJ Axley, DA Gahame, and TC Stadtman. *J Biol Chem*, 265:18213, OCT 1990.
- [11] *Modern Quantum Chemistry*. A Szabo and NS Ostlund. McGraw-Hill, New York, 1a edició revisada edition, 1989.

- [12] *Introduction to Computational Chemistry*. F Jensen. Wiley, New York, 1999.
- [13] *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*. W Koch and MC Holthausen. Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
- [14] *Molecular Mechanics*. U Burkert and NL Allinger. ACS, Washington, 1982.
- [15] *Molecular Mechanics Across Chemistry*. AK Rappé and CJ Casweit. University Science Books, Sausalito, CA, 1997.
- [16] M Karplus A Warshell. *J. Am. Chem. Soc.*, 94:5612, 1972.
- [17] MJ Field, A Bash, and M Karplus. *J. Comput. Chem.*, 11:700, 1990.
- [18] F Maseras and K Morokuma. *J. Comput. Chem.*, 16:1170, 1995.
- [19] D Bakowies and W Thiel. *J. Phys. Chem.*, 100:10580, 1996.
- [20] J Gao. *Acc. Chem. Res.*, 29:298, 1996.
- [21] G Monard and KM Merz. *Acc. Chem. Res.*, 32:904, 1999.
- [22] PEM Siegbahn and MRA Blomberg. *Chem. Rev.*, 100:421, 2000.
- [23] F Himo and PEM Siegbahn. *Chem. Rev.*, 103:2421, 2003.
- [24] PEM Siegbahn. *Q Rev Biophys*, 36:91, 2003.
- [25] PJ Stephens, DR Jollie, and A Warshel. *Chem. Rev.*, 96:2491, 1996.
- [26] G Frenking and MC Holthausen. *J. Comput. Chem.*, 27:1221, 2006.
- [27] A Altun, S Shaik, and W Thiel. *J. Comput. Chem.*, 27:1324, 2006.
- [28] JN Harvey, CM Bathelt, and AJ Mulholland. *J. Comput. Chem.*, 27:1352, 2006.

- [29] M Blomberg and PEM Siegbahn. *J. Comput. Chem.*, 27:1373, 2006.
- [30] R Prabhakar, K Morokuma, and DG Musaev. *J. Comput. Chem.*, 27:1438, 2006.
- [31] JW Tye, MY Darensbourg, and MB Hall. *J. Comput. Chem.*, 27:1454, 2006.
- [32] H Nakashima, J Hasegawa, and H Nakatsuji. *J. Comput. Chem.*, 27:1363, 2006.
- [33] JD Marechal, F Maseras, A Lledos, L Mouawad, and D Perahia. *J. Comput. Chem.*, 27:1446, 2006.
- [34] R Prabhakar, T Vreven, K Morokuma, and DG Musaev. *Biochemistry*, 44:11864, 2005.
- [35] R Prabhakar, DG Musaev, IV Khavrutskii, and K Morokuma. *J. Phys. Chem. B.*, 108:12643, 2004.
- [36] P Hohenberg and W Kohn. *Phys Rev B*, 136:B864, 1964.
- [37] W Kohn and L Sham. *Phys Rev B*, 140:A1133, 1965.
- [38] AD Becke. *J. Chem. Phys*, 98:5648, 1993.
- [39] C Lee, W Yang, and RG Parr. *Phys Rev*, 37:B785, 1988.
- [40] PJ Hay and WR Wadt. *J. Chem. Phys*, 82:299, 1985.
- [41] WJ Hehre, R Ditchfield, and JA Pople. *J. Chem. Phys*, 56:2257, 1972.
- [42] PC Hariharan and JA Pople. *Theor. Chim. Acta*, 28:213, 1973.
- [43] Gaussian 03, revision c.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven,

K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople. Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004.

