Biogeociclos: Uma visão molecular das enzimas e dos mecanismos envolvidos nos ciclos dos elementos: Parte I

CARLA CARNEIRO^{1,2} E JOSÉ J. G. MOURA¹

Parte 1: Biogeociclo do Azoto

Título corrente: Biogeociclos dos elementos

Palavras chave: Ciclos dos elementos, Azoto, Enxofre, Carbono, Hidrogénio

Nota prévia

A circulação dos elementos químicos no planeta é um processo complexo com muitas e variadas vertentes. Os vários ciclos elementares são muito mais do que simples reacções químicas. São em parte biológicos e em parte geoquímicos, pois envolvem a participação de microrganismos e estão associados a grupos de elementos metálicos. Uma variedade de enzimas e múltiplos transportadores electrónicos (que com estas interactuam) asseguram a catálise, passo a passo, por formação de intermediários chave.

As etapas chave destes ciclos biogeoquímicos são catalisados por enzimas que dependem de ferro, manganês, molibdénio, cobre, níquel, entre outros e têm levantado importantes questões na área da Química Bioinorgânica, nos processos de conservação de energia e nas relações estrutura/função. O esclarecimento destas e de outras questões surgiu, essencialmente nos últimos três anos, por obtenção da estrutura cristalográfica duma variedade de enzimas incluindo estruturas das enzimas com o

substrato ou com o produto ligado. Estes novos dados contribuíram, assim, para um progresso significativo no conhecimento do papel dos centros metálicos envolvidos na catálise, revelando a sua arquitectura, para além de aspectos estruturais globais que permitiram uma interpretação mecanística dos processos que compõem os vários ciclos biogeoquímicos. Estes são constituídos por processos assimilativos, quando se realiza a incorporação de um determinado elemento, sob a forma de matéria orgânica, ou respiratórios, se associados à obtenção de energia, utilizando as várias espécies como aceitadores electrónicos e/ou dissimilativos associados à dissipação de energia ou poder redutor ou à detoxificação.

Muito embora a respiração aeróbia seja energeticamente mais favorável uma variedade de compostos (orgânicos e inorgânicos) pode ser utilizada como aceitador terminal de electrões, para além do oxigénio (figura 1). A capacidade de efectuar uma respiração anaeróbia permite, deste modo, a alguns microrganismos, a sobrevivência em nichos particulares.

É objectivo deste artigo rever aspectos estruturais das enzimas envolvidos nos ciclos dos elementos. Os ciclos não são apresentados de modo exaustivo, mas procura-se pôr em evidência as partes dos ciclos para as quais há um conheci-

mento detalhado da estrutura tridimensional do biocatalisador envolvido. Mais ainda, são apresentadas hipóteses mecanísticas que resultam, muitas delas, da análise estrutural. Os avanços da biologia molecular e das técnicas de análise estrutural permitem, que neste momento, haja disponível um conjunto de informação que possibilita uma análise detalhada das relações estrutura e função dos biocatalisadores que controlam as transformações ocorrentes nos ciclos.

O artigo é dividido em 3 partes:

- 1 - Biogeociclo do AZOTO
- 2- Biogeociclo do ENXOFRE
- 3- Biogeociclo do CARBONO e HIDROGÉNIO

1. O ciclo do azoto

1.1. Introdução

No ciclo biogeoquímico do azoto (figura 2) participam uma série de enzimas que catalisam a interconversão do azoto inorgânico entre diferentes estados de oxidação (+5 a -3), a sua assimilação (como matéria orgânica) e a respectiva mineralização (reacção inversa) (Richardson *et al.*, 1998; Richardson e Watmough, 1999).

Nos procariotas, as várias reacções de oxidação-redução, com excepção da

¹REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Monte de Caparica, Portugal Tel: +351-21-2948382 Fax: +351-21-2948550 e-mail: jose.moura@dq.fct.unl.pt, web www.dq.fct.unl.pt/bioin/

² Morada presente: Departamento de Sistemas e Informática, Escola Superior de Tecnologia, Instituto Politécnico de Setúbal, Rua Vale de Chaves, Estefanilha, 2910-761 Setúbal

figura 1 Exemplos de respiração anaeróbia (Adaptado de Madigan et al., 2000).

reacção de fixação (que envolve uma enzima citoplasmática que requer ATP), estão associadas a transportadores de membrana na cadeia respiratória e, consequentemente, à síntese de adenosina trifosfato (ATP). Os passos oxidativos (amónia a nitrito e nitrito a nitrato)

envolvem a doação de electrões ao oxigénio, via proteínas membranares, enquanto que as reacções de redução (nitrato a azoto molecular) envolvem o fluxo de electrões provenientes de várias cadeias de transporte electrónico (Ferguson, 1998).

A capacidade de fixar o azoto molecular é restrita aos procariotas dos domínios Bacteria e Archaea, denominados organismos diazotróficos. A nitrificação é o processo pelo qual a amónia é oxidada a nitrito; na nitrificação autotrófica, a amónia é utilizada como fonte de crescimento, enquanto que a nitrificação heterotrófica está associada à dissipação de energia. A sequência pela qual o nitrato e o nitrito são reduzidos, via óxidos azotados gasosos, a azoto molecular é denominada desnitrificação. O nitrato e o nitrito podem também ser reduzidos com fins assimilativos ou para detoxificação do nitrito por acção de enzimas citoplasmáticas, num processo não energético (Richardson et al., 1998; Richardson e Watmough, 1999; Schmid et al., 2001).

1.2. Caracterização molecular de enzimas do ciclo do azoto

1.2.1. Nitrogenase (passo 1)

A nitrogenase catalisa a redução do azoto molecular a amónia num processo dependente de ATP, de acordo com a seguinte equação:

A nitrogenase catalisa também a redução de protões a hidrogénio molecular, à custa da hidrólise da ATP, e a redução de uma série de substratos não fisiológicos (acetileno, azida, cianeto e cloropropeno) (Schmid et al., 2001).

A nitrogenase de Azotobacter (Az.) vine-landii (figura 3) é composta por duas

figura 2 Ciclo biogeoquímico do azoto. O azoto atmosférico (N_2) pode ser reduzido a amónia (NH_3) por acção da nitrogenase (passo 1). A amónia pode ser incorporada como matéria orgânica ou ser sequencialmente oxidada, via hidroxilamina, a nitrito (NO_2^-), por catálise da MOA (passo 2) e da OHA (passo 3), respectivamente, e a nitrato (NO_3^-), por intermédio da oxidase do nitrito (passo 4) (desnitrificação). Por sua vez, o nitrato pode ser utilizado como fonte de azoto para biossínteses, ou ser sequencialmente reduzido, via nitrito, a óxido nítrico (NO) e o óxido nítrico (N_2O) a azoto molecular (N_2), por acção conjunta da NAR (ou NAP), NiR (ou CuNiR), NOR e NOS, respectivamente (passos 5 a 8). O nitrito pode, por sua vez, ser reduzido a amónia, por catálise da ccNiR (passo 6) (Adaptado de Ferguson, 1998). A nomenclatura das enzimas é indicada no texto.

figura 3 Representação esquemática da nitrogenase hetero-octamérica de *Az. vinelandii* estabilizada com $\text{ADP}\cdot\text{AlF}_4^-$. Os co-factores e o íon cálcio (a verde) estão representados por modelos "stick and ball" (Adaptado de Schmid *et al.*, 2001).

proteínas citoplasmáticas: a proteína de ferro (Fe), um homodímero de 63 kDa e a proteína de molibdénio e ferro (FeMo), um heterotetrâmero ($\alpha_2\beta_2$) de 240 kDa em que cada subunidade α e β possui 60 kDa. A proteína de Fe, ou componente II, possui um único centro de $[\text{4Fe-4S}]$ e liga duas moléculas de ATP; transmite electrões, a partir de uma proteína doadora, a flavodoxina, para a proteína de FeMo, ou componente I, que contém o sítio de ligação e de redução do azoto molecular. A proteína de FeMo possui, por dímero, dois tipos de centros de ferro-enxofre: um é o agregado P, um centro de $[\text{8Fe-7S}]$, um duplo cubano, e o outro incorpora molibdénio ($\text{1Mo:7Fe:9S:1 homocitrato}$). Adicionalmente, possui dois catiões ligados, Ca^{2+} ou Mg^{2+} , aos quais foi atribuído um papel estrutural. As nitrogenases alternativas diferem das nitrogenases tradicionais, no facto do molibdénio da pro-

teína de FeMo ser substituído por vanádio (proteína FeV) ou por um ferro adicional (proteína FeFe) (Ferguson, 1998; Schmid *et al.*, 2001).

A proteína de FeMo

Apesar de não existir semelhança na sequência de aminoácidos das duas subunidades (α e β) do tetrâmero, estas apresentam um enrolamento muito semelhante que consiste em três domínios do tipo folha β paralela/hélice α . Na subunidade α , o co-factor de FeMo ocupa o topo de uma fenda existente na interface dos três domínios, enquanto que o agregado P está localizado na interface, entre as subunidades α e β , protegido do solvente. No entanto, o ambiente em seu redor contém vários resíduos polares e carregados. Cada subunidade β possui um catião ligado, presumivelmente um cálcio, coordenado por resíduos de ambas as subunidades. A ex-

tensa interacção entre as subunidades α e β sugere que cada um dos dímeros ab forma uma unidade funcional pelo que se pode considerar o tetrâmero como sendo um dímero de dímeros (figura 4) (Schmid *et al.*, 2001).

O agregado P, um centro de $[\text{8Fe-7S}]$, alterna a sua coordenação, consoante o estado de oxidação da proteína de FeMo. No estado oxidado (P_{ox}) (figura 5A), este pode ser descrito como sendo constituído por um centro de $[\text{4Fe-4S}]$ e um centro de $[\text{4Fe-3S}]$ (predominantemente ligados à subunidade α e β , respectivamente) e ligados em ponte por duas cisteínas ($\text{Cis}\alpha 88$ e $\text{Cis}\beta 95$). Adicionalmente, existem dois ligandos não sulfurados: o azoto da ligação peptídica, pertencente à $\text{Cis}\alpha 88$ e o oxigénio da cadeia lateral da $\text{Ser}\beta 188$. No estado reduzido (P_{N}) (figura 5B), a coordenação é efectuada apenas por seis cisteínas, três da subunidade α e três da subuni-

figura 4 Representação esquemática do heterotetrâmero, proteína de FeMo, da nitrogenase de *Az. vinelandii*. Os co-factores e o íon cálcio (a verde) estão representados por modelos "stick and ball" (Adaptado de Schmid *et al.*, 2001).

figura 5 Estrutura do agregado P e respectivos ligandos da proteína de FeMo da nitrogenase de *Az. vinelandii*, (A) no estado oxidado (Pox) e (B) no estado reduzido (PN) (Adaptado de Schmid *et al.*, 2001).

figura 6 Estrutura do agregado de FeMo e respectivos ligandos da proteína de FeMo da nitrogenase de *Az. vinelandii* (Adaptado de Schmid *et al.*, 2001).

dade β , (Cis α 62, Cis α 88, Cis α 154, Cis β 70, Cis β 95 e Cis β 153). A alteração da estrutura do agregado P, entre P_{ox} e P_N, é acompanhada por uma alteração dos ligandos, associada ao movimento do Fe5 e Fe6. O enxofre S1A (enxofre central) deixa de ter uma coordenação tetraédrica, para apresentar, no estado reduzido, uma coordenação octaédrica distorcida (Schmid *et al.*, 2001).

O co-fator de FeMo, a 10 Å da superfície, está ligado essencialmente à subunidade a e pode ser considerado como derivado de um centro de [4Fe-3S] e de um agregado [Mo:3Fe:3S], cubanos parciais, ligados em ponte por três enxofres (figura 6). Apenas dois resíduos ligam o co-fator à cadeia polipeptídica (Cis α 275 e His α 442), num arranjo tal que seis dos átomos de ferro possuem apenas três ligandos. A coordenação octaédrica do molibdênio é completada por ligação de um homocitrato (ligando bidentado) (Schmid *et al.*, 2001).

Curiosamente, os ligandos dos agregado P e co-fator de FeMo pertencem a uma mesma região, um centro composto por quatro folhas β rodeadas por hélices α , num arranjo estrutural semelhante ao observado na coordenação do agregado

H das hidrogenases contendo apenas ferro (Schmid *et al.*, 2001).

A proteína de Fe

Cada uma das subunidades idênticas do dímero apresenta oito folhas β torcidas, rodeadas por nove hélices α (figura 7); a parte central contém sete folhas β paralelas e uma pequena folha β antiparalela, num arranjo semelhante às proteínas de permuta de nucleotídeos. O centro de [4Fe-4S], localizado à superfície e na interface das duas cadeias polipeptídicas, está coordenado simetricamente por duas cisteínas, uma de cada subunidade (Cis97 e Cis132). Os dois locais de ligação da molécula de ATP (um em cada subunidade) distam cerca de 20 Å do centro de ferro-enxofre (Ferguson, 1998; Schmid *et al.*, 2001).

A estrutura cristalina obtida para o complexo, entre a proteína de Fe, contendo ADP.AIF₄⁻ (em ambos os locais de ligação do ATP) como factor de estabilização e a proteína de FeMo, permitiu confirmar o modo de associação entre as duas proteínas (a proteína de FeMo heterotetramérica possui dois homodíme-

ros de proteína de Fe ligados) e tirar ilações relativamente ao mecanismo de catálise. A proteína de Fe sofre grandes alterações estruturais, que estão associadas à hidrólise do ATP, posicionando o centro de ferro-enxofre a 14 Å do agregado P. Na proteína de FeMo apenas se observam alterações conformacionais no agregado P, permanecendo inalterado o resto da molécula (Ferguson, 1998).

Deste modo, a redução do azoto molecular envolve inicialmente a formação dum complexo entre a proteína de Fe reduzida (por duas flavodoxinas), ligada a duas moléculas de ATP, e a proteína de FeMo. A subsequente transferência electrónica entre as duas proteínas, via agregado P, está associada à hidrólise da ATP (duas moléculas por electrão transferido). Esta hidrólise impulsiona a dissociação do complexo formado pelas duas proteínas, favorece a estabilização da interface entre as subunidades na proteína de Fe, contribuindo para o reposicionamento do centro de ferro-enxofre na superfície (para ser novamente reduzido) e permite nova ligação de duas moléculas de ATP. Na proteína de FeMo, as alterações observadas, entre o

figura 7 Representação esquemática do homodímero, proteína de Fe, da nitrogenase de *Az. vinelandii*. O centro de [4Fe-4S] e os nucleotídeos (ADP·AlF₄⁻) estão representados por modelos "stick and ball" (Adaptado de Schmid et al., 2001).

estado oxidado e reduzido, apenas na coordenação do agregado P, sugerem que a transferência de dois electrões está associada à entrada de dois prótons; os ligandos libertados (a serina e a cisteína) podem ser protonados e os electrões são entregues ao sítio activo, o agregado FeMo, de uma forma sincronizada e mediada pelo agregado P. A reacção termina por repetição dos ciclos anteriores, até se terem acumulado electrões (ou prótons) suficientes (Ferguson, 1998).

Geralmente é aceite que substratos e inibidores se ligam directamente aos centros metálicos; no entanto, a demonstração directa deste facto tem sido difícil e ainda não foi possível, neste caso. Existem dois modos de ligação possíveis para o azoto molecular ao co-factor de FeMo: o N₂ liga-se ao molibdénio e a um (ou vários) ferro(s), ou formam-se espécies híbridas. A ideia de uma transferência de dois electrões deve ser considerada com reservas, e ter apenas o estatuto de hipótese, pois algumas observações não são consistentes com este mecanismo (Ferguson, 1998).

1.2.2. Mono-oxigenase da amónia (passo 2) - MOA

A mono-oxigenase da amónia (MOA) é uma enzima membranar que catalisa a primeira reacção da nitrificação, de acordo com a seguinte equação:

O estudo da MOA tem sido dificultado, dada a labilidade da enzima. No entanto, a determinação de três genes estruturais permitiu estabelecer analogias com a mono-oxigenase do metano (MOM), também uma enzima membranar (McTavish *et al.*, 1993; Holmes *et al.*, 1995). O conhecimento da MOA será favorecido pelo estudo da MOM, recentemente purificada como uma enzima trimérica que liga até quinze átomos de cobre por complexo. Actualmente é aceite o facto de que a MOA liga um centro polinuclear de cobre e possivelmente ferro, mas como, até à data, muito pouco é conhecido acerca da MOM, o conhecimento da MOA é também limitado (Ferguson, 1998; Richardson e Watmough, 1999).

Independentemente da natureza molecular da MOA a sua actividade enzimática depende de uma fonte de electrões, possivelmente a reacção de oxidação da hidroxilamina a nitrito catalisada pela oxidase da hidroxilamina (passo 3); dos quatro electrões libertados dois são utilizados pela MOA na oxidação da amónia gerando outra molécula de hidroxilamina, os dois restantes são entregues a uma oxidase terminal da cadeia respiratória gerando um gradiente protónico e subsequente formação de ATP, ou são utilizados na redução do NAD⁺ (Ferguson, 1998; Richardson e Watmough, 1999; Igarashi e Tanaka, 2001).

Paracoccus (Pa.) *denitrificans*, é um organismo desnitrificante, que pode efec-

tuar alguns passos da nitrificação, sem deles depender para o seu crescimento, num processo denominado nitrificação heterotrófica. A MOA, recentemente isolada deste organismo, parece ser uma oxidase do quinol, que contém cobre coordenado a três histidinas, e difere da enzima de *Nitrosomonas* sp. (organismo autotrófico) pois consiste em apenas duas subunidades com massas moleculares de 38 e 46 kDa, respectivamente (Richardson *et al.*, 1998).

1.2.3. Oxidase da hidroxilamina (passo 3) - OHA

A oxidase da hidroxilamina (OHA), uma enzima periplasmática, catalisa a oxidação da hidroxilamina a nitrito, de acordo com a seguinte equação:

A OHA de *Nitrosomonas* (N.) *europaea* é um homotrímero de 200 kDa, que apresenta unicamente hemo como co-factor, covalentemente ligados, num total de vinte e quatro (sete hemo c e um hemo P₄₆₀ por subunidade). Os hemo estão dispostos em cada subunidade como um agregado triplo, dois agregados duplos e um hemo magneticamente isolado. Enquanto os hemo c estão envolvidos na transferência electrónica intra e intermolecular, o hemo P₄₆₀ (localizado na parte superior de uma cavidade), pentacoordenado, é o sítio activo permitindo deste modo a ligação do substrato, a hidroxilamina (NH₂OH). De todos os hemo, apenas o hemo P₄₆₀ e o

figura 8 Representação esquemática de uma subunidade da oxidase da hidroxilamina de *N. europaea*. Os hemos são apresentados por modelos "stick and ball" (Adaptado de Igarashi e Tanaka, 2001).

hemo 1 estão parcialmente expostos ao solvente, pelo que funcionam como ponto de entrada e saída dos electrões, respectivamente. O agregado triplo está envolvido na rápida transferência electrónica, do substrato para o aceitador (o citocromo c_{554} , um citocromo tetrahémico) de modo a evitar a formação de óxido nítrico ou óxido nitroso (Ferguson, 1998; Richardson e Watmough, 1999; Igarashi e Tanaka, 2001).

Os hemos c apresentam uma coordenação bis histidina e o hemo P_{460} (assim denominado por apresentar uma absorção característica na sua forma reduzida), pentacoordenado, possui uma ligação covalente adicional a um resíduo de tirosina (Tir467) numa subunidade adjacente (entre um carbono meso do hemo e um carbono benzílico da tirosina) que parece ser responsável pela trimeriza-

ção da molécula (Igarashi e Tanaka, 2001).

Estrutura global

A molécula é bastante compacta, em resultado de uma vasta área de contacto entre as subunidades, mas possui uma grande cavidade na parte inferior e fendas entre as subunidades (com capacidade para albergar uma molécula de grandes dimensões como é o citocromo c_{554}). No topo do trímero, seis longas hélices e três pares de hélices torcidas, das três subunidades, formam um pilar no centro da molécula, estabilizado por contactos hidrofóbicos entre dois discos de tríades de leucinas. Cada subunidade, com uma topologia essencialmente em hélice α , está organizada em dois domínios, para além do C-terminal flexível (figura 8). O domínio do N-terminal

contém duas folhas β curtas e 14 hélices α , com cinco hemos c e um hemo P_{460} . Quatro dos hemos (hemos 1 a 3 e 5) estão protegidos pela cadeia polipeptídica e o seu acesso ao solvente é limitado por duas áreas de pequenas dimensões. O domínio central contém dois hemos c (hemos 7 e 8) e dez hélices α , incluindo as longas hélices que formam o pilar central. O hemo magneticamente isolado (hemo 8) está localizado no final do feixe de hélices α do domínio central e o agregado triplo (hemos 6 e 7 e P_{460}) está localizado num bolso entre o N-terminal e o domínio central (Igarashi e Tanaka, 2001).

Os hemos

Os hemos, localizados na metade inferior da molécula, formam quatro grupos (figura 9). Estes estão muito próximos e interactuam directamente, formando uma rede possivelmente envolvida na transferência electrónica (Igarashi e Tanaka, 2001).

No primeiro grupo (a amarelo), o agregado triplo é composto pelos hemos 6, 7 e P_{460} , num arranjo praticamente coplanar; no entanto, a interacção entre o hemo P_{460} e o hemo 6 é ligeiramente diferente da existente entre os hemos 6 e 7, pelo facto do hemo P_{460} apresentar uma rotação tal que os seus grupos propionato formam ligações por pontes de hidrogénio com os mesmos grupos do hemo 6, tornando, deste modo, acessível a posição de coordenação no hemo P_{460} . O segundo grupo (a azul), o agregado duplo I, é composto pelos hemos 3 e 5 que, à semelhança dos hemos 6 e 7,

figura 9 Estrutura dos hemos, disposição espacial e tipos de interacção hemo-hemo da oxidase da hidroxilamina de *N. europaea*. As interações são representadas por uma elipse de cor diferente (agregado triplo (amarelo), agregado duplo I (azul), agregado duplo II (verde), hemo isolado (lilas) (Adaptado de Igarashi e Tanaka, 2001).

são praticamente coplanares. Os grupos propionato, de ambos os hemos, estão direccionados para a cavidade central inferior e dois deles expostos ao solvente. Da mesma forma que os hemos 6 e P₄₆₀, o hemo 3 interacciona com o hemo 5 que, por sua vez, interacciona com o hemo 6 do agregado triplo. O arranjo do terceiro grupo (a verde), o agregado duplo II (hemos 1 e 2), é semelhante ao dos hemos 3 e 5 no agregado duplo I e dos hemos 6 e 7 no agregado triplo (os hemos são praticamente paralelos, mas ligeiramente inclinados em cerca de 20°). Os seus grupos propionato estão orientados para a parte superior da molécula; um dos grupos do hemo 1 está em contacto com o solvente e existem interacções por pontes de hidrogénio com resíduos da subunidade adjacente, contribuindo, deste modo, para a formação do trímero. Adicionalmente, o hemo 2 interacciona com o hemo 3 do agregado duplo I. O quarto grupo, o hemo isolado (hemo 8, a lilás), estabelece interacções com o agregado triplo e com o agregado duplo II da subunidade adjacente (Igarashi e Tanaka, 2001).

A oxidação da hidroxilamina decorre em dois passos: a desidrogenação da hidroxilamina, seguida da oxigenação do intermediário azotado (espécie ferroso-nitrosilo) para formar nitrito, não havendo libertação de intermediários. No entanto, dada a inexistência de uma estrutura derivada, o mecanismo de oxidação da hidroxilamina está ainda por elucidar. A estrutura do hemo P₄₆₀ e o arranjo dos restantes hemos permitem uma transferência electrónica concertada de dois electrões. Quando o hemo P₄₆₀ extrai dois electrões à hidroxilamina, é promovida a transferência para o aceitador (hemos 6 e 7). Estes hemos estão acoplados e interaccionam com o hemo P₄₆₀, removendo os dois electrões, disponibilizando-o para o segundo passo. A proximidade entre os agregados permite a transferência entre estes e os agregados duplos (hemos 3 e 5 e hemos 1 e 2) e daqui para o aceitador final, o citocromo c₅₅₄. A existência de agregados dihémicos coplanares reforça a ideia de uma transferência di-electrónica, ou a transferência electrónica pode envolver a saída de apenas um electrão, via agre-

gado II, para o citocromo c₅₅₄, convertendo um sistema de quatro electrões (a OHA) num sistema monoelectrónico compatível com o citocromo c₅₅₂, associado com as oxidases terminais. O hemo 8, que interacciona com o agregado II da subunidade adjacente, pode funcionar como um caminho distinto, transferindo um electrão para um dos hemos do agregado duplo adjacente (Ferguson, 1998; Richardson e Watmough, 1999).

No ciclo catalítico, e por analogia com a redutase do nitrito multihémica, ccNiR (passo 6), parece ser importante a participação dum aspartato (Asp267), que funciona como aceitador de prótons na oxidação da hidroxilamina, dum histidina (His268), provavelmente envolvida no processo de mono-oxigenação, e dum tirosina (Tir334), que funciona como um estabilizador do estado intermediário (Ferguson, 1998).

Contrariamente à OHA multihémica de organismos autotróficos (a de *N. europaea* descrita anteriormente), a OHA envolvida na oxidação heterotrófica da amónia (como por exemplo de *Pa. denitrificans*) é uma enzima monomérica de 18 kDa (periplasmática), que liga ferro não hémico; possivelmente um centro dinuclear de ferro, como centro catalítico, e um centro mononuclear envolvido na transferência electrónica. A catálise envolve a formação de nitrito e de óxido nitroso, em condições aeróbicas, enquanto que em condições anaeróbicas apenas se forma óxido nitroso, num mecanismo que envolve apenas transferência de dois electrões (Richardson *et al.*, 1998; Igarashi e Tanaka, 2001).

A necessidade da OHA de *N. europaea* realizar uma oxidação que envolve quatro electrões, enquanto que a OHA de *Pa. denitrificans* executa uma oxidação que envolve dois electrões, é presumivelmente a razão da grande complexidade da enzima de *N. europaea*, comparativamente com a OHA de *Pa. denitrificans* (Richardson *et al.*, 1998).

1.2.4. Oxidase do nitrito (passo 4)

O passo oxidativo de nitrito a nitrato é catalisado pela oxidase do nitrito, de acordo com a equação:

A análise da sua sequência de aminoácidos indica que esta enzima membrana é análoga à redutase do nitrato membrana, NAR, relativamente às subunidades a e b. A primeira, a subunidade catalítica, contém o co-factor de molibdénio, uma molibdopterina guanosina dinucleotídeo (MGD) e a segunda contém centros de ferro-enxofre. Mecanicamente, a oxidação do nitrito parece ser o inverso da redução do nitrato (Ferguson, 1998)

1.2.5. Redutase do nitrato (passo 5) - NAP, NAR, NAS

A redutase do nitrato catalisa a redução do nitrato a nitrito, de acordo com a seguinte equação:

Os procariotas possuem três subclases, estruturalmente distintas de redutases do nitrato: as assimilativas citoplasmáticas (NAS), as dissimilativas membranares (NAR) e as dissimilativas periplasmáticas (NAP), que possuem um co-factor de molibdénio no seu sítio activo, uma variante da molibdopterina mononucleotídeo (MPT), uma molibdopterina guanosina dinucleotídeo (MGD) (Richardson e Watmough, 1999; Romão *et al.*, 2001).

A única estrutura de cristalográfica conhecida até à data é a da redutase do nitrato periplasmática (NAP) de *Desulfovibrio* (D.) *desulfuricans* ATCC 27774 (Dias *et al.*, 1999 a; 1999 b). Contrariamente a outras enzimas homólogas, em que a subunidade catalítica (NapA) está associada a outras subunidades menores, a NAP possui uma única subunidade, tornando-se no membro mais simples das enzimas englobadas na classe da redutase do dimetilo sulfóxido (DMSOR) (Moura *et al.*, 1997; Romão *et al.*, 1997). A NAP possui um centro de [4Fe-4S] e um co-factor de molibdénio bis-MGD; o centro de ferro-enxofre participa na transferência electrónica a partir dum doador fisiológico, ainda desconhecido, para o centro de molibdénio onde decorre a catálise, a redução do nitrato a nitrito (Bursakov *et al.*, 1995; Carneiro *et al.*, 1995; Moura *et al.*,

figura 10 Representação esquemática da NAP de *D. desulfuricans* ATCC 27774. Os co-factores estão representados por modelos "stick and ball" (Adaptado de Romão *et al.*, 2001).

2001). A proximidade dos dois co-factores, bem como a existência de interações entre ligações facilita a transferência intramolecular com participação de uma lisina (Lis49). Uma arginina (Arg354) participa na estabilização do substrato (o nitrato) durante o ciclo catalítico (Dias *et al.*, 1999 b).

A NAP (figura 10) tem uma forma elipsoidal coincidindo a menor dimensão com a direcção da cavidade que conduz ao sítio activo. Com uma topologia α/β organizada em quatro domínios é semelhante à desidrogenase do formato (FDHh) de *Escherichia* (*E.*) *coli* (Sun *et al.*, 2001). O centro de [4Fe-4S] está localizado na periferia da molécula, no

domínio I, enquanto que o co-factor de molibdênio se estende no interior da molécula, interagindo com resíduos de todos os domínios (Romão *et al.*, 2001).

O arranjo espacial da NAP (incluindo o modo como o molibdênio coordena as duas MGD) define um eixo de simetria, relativamente aos domínios II e III, criando uma cavidade em forma de funil, revestida com resíduos carregados, e que permite o acesso ao centro de molibdênio. O co-factor (localizado a 15 Å da superfície) estende-se no interior da molécula por uma distância máxima de 32 Å e é estabilizado por ligações por pontes de hidrogénio e uma

ligação adicional a um resíduo da cadeia polipeptídica (Cis140). No estado oxidado, o molibdênio possui uma geometria trigonal prismática distorcida, em que quatro dos ligandos são os ditiolenos das duas pterinas (MGD 811 e 812), o quinto é a Cis140 e o sexto um hidróxido/água, que aponta no sentido da cavidade e que dá lugar, no estado reduzido, ao substrato, o nitrato. O molibdênio dista 12 Å de um dos átomos de ferro do centro de ferro-enxofre e, à semelhança de outras molibdoenzimas, é possível definir um percurso electrónico através das ligações (via MGD 812) entre os dois co-factores, envolvendo a participação de uma molécula de água ou, alternativamente, um resíduo de lisina (Lis49)

figura 11 Estrutura e disposição do centro de ferro-enxofre e do co-fator de molibdênio bis-MGD da NAP de *D. desulfuricans* ATCC 27774. O percurso electrónico proposto é mediado por uma molécula de água ou pela Lis49 (Adaptado de Romão *et al.*, 2001).

figura 12. Mecanismo de catálise da NAP de *D. desulfuricans* ATCC 27774 (Adaptado de Romão et al., 2001).

(figura 11) (Dias et al., 1999 b; Romão et al., 2001).

O mecanismo de catálise proposto (figura 12) baseia-se em estudos com compostos modelo ou enzimas relacionadas. A reacção tem início com a forma reduzida (MoIV) que pode ligar o nitrato; a ligação N-O é enfraquecida, facilitando a libertação do produto, o nitrito; o molibdénio é então oxidado (a MoVI), apresentando uma ligação oxo a um oxigénio do nitrato. Segue-se a transferência de dois protões, possivelmente a partir de moléculas de água existentes no sítio activo; a transferência de dois electrões, a partir do centro de ferro-enxofre, com concomitante saída de uma molécula de água origina a forma nativa (MoIV). Presume-se que alguns dos resíduos carregados, existentes na cavidade catalítica, estão implicados no ciclo catalítico; a Arg354 ou a Arg138 são potenciais estabilizadores do nitrato (Dias et al., 1999 b; Romão et al., 2001).

1.2.6. Redutase do nitrito (passo 6)

A redução do nitrito a óxido nítrico, de acordo com a seguinte equação:

é catalisada por dois tipos de redutases do nitrito periplasmáticas, dependendo do co-factor presente: uma enzima hémica, um citocromo cd_1 (NiR), ou uma proteína de cobre, a CuNiR. Os diferentes co-factores permitem uma fácil distinção bioquímica (Averill, 1996). No entanto, existem redutases do nitrito multihémicas, contendo, como co-factores, apenas hemos c (ccNiR) capazes de reduzir o nitrito a amónia, utilizando electrões da oxidação do formato ou do hidrogénio, de acordo com a seguinte equação:

A ccNiR catalisa também a redução do óxido nítrico e da hidroxilamina a amónia, bem como a redução do sulfito a sulfureto (Einsle, 2001).

Redutase do nitrito do tipo cd_1 (NiR)

As estruturas da NiR, disponíveis para *Pseudomonas* (Ps.) aeruginosa e *Pa. denitrificans* GB17, apesar de apresentarem um arranjo global semelhante, diferem no ambiente de ligação dos hemos, tanto para o estado oxidado, como para o estado reduzido. A NiR é um homodímero (2x60 kDa); cada monómero possui um hemo c, covalentemente ligado à cadeia polipeptídica, por ligações tioéter (Cis65 e Cis68), e um hemo d_1 ligado de um modo não covalente. Distam, numa mesma subunidade, de 11 Å num arranjo espacial tal que o ângulo entre eles é de 60°. O hemo c funciona como aceitador de electrões, provenientes dum citocromo c externo ou de uma cupredoxina, e o hemo d_1 constitui o sítio activo da enzima. Duas histidinas participam na catálise, e tanto o substrato como o produto (nitrito e óxido nítrico (NO), respectivamente, são estabilizados por várias ligações por pontes de hidrogénio (Averill,

figura 13 Representação esquemática da NiR de *Pa. denitrificans* GB17 (*Pa. pantotrophus*) (b) vista do domínio de ligação do hemo d_1 (90° relativamente a (a)). Os hemos estão representados por modelos "stick and ball" (Adaptado de Allen et al., 2001).

figura 14 Representação dos hemos e respectivos ligandos da NiR de *Pa. denitrificans* GB17. Duas histidinas (a verde) estão possivelmente envolvidas na catálise (Adaptado de Allen et al., 2001).

1996; Allen *et al.*, 2001; Moura e Moura, 2001).

Cada subunidade está organizada em dois domínios estruturalmente diferentes (figura 13A). O ambiente de coordenação do hemo *c* é essencialmente hidrofóbico, de modo que este expõe os seus grupos propionato ao solvente. O hemo *d*₁, localizado num túnel definido pela hélice de folha β (figura 13B), estabelece inúmeros contactos com a cadeia polipeptídica e com moléculas de água localizadas no interior. A associação das duas subunidades deve-se à existência de ligações de hidrogénio entre os domínios em hélice de folha β dos dois monómeros (Allen *et al.*, 2001).

O domínio N-terminal, essencialmente em hélice α , contém o hemo *c* e o C-terminal com uma topologia em "β-propeller"; uma hélice de oito lâminas em folha β (cada lâmina é composta por quatro folhas β antiparalelas) liga o hemo *d*₁.

Em *Pa. denitrificans* GB17, o hemo *c* apresenta uma coordenação bis-histidina (His17 e His69) e o hemo *d*₁, também hexa coordenado, possui, como ligandos, uma uma tirosina, do domínio do hemo *c* e uma histidina (Tir25 e His200) (figura 14). No entanto, após redução, ambos os hemos alteram a sua coordenação: no hemo *c* uma histidina é substituída por uma metionina e o

hemo *d*₁, agora pentacoordenado, mantém a histidina, mas "perde" a tirosina (Allen *et al.*, 2001).

Por sua vez em *Pseudomonas* (Ps.) *aeruginosa*, o hemo *c* apresenta, no estado oxidado, uma coordenação metionina-histidina (Met88 e His51), típica de citocromos *c* e o hemo *d*₁ tem como ligandos, uma histidina (His182) e um hidroxilo. Este último estabelece uma ligação, por ponte de hidrogénio, com uma tirosina (Tir10) pertencente à outra subunidade formando, deste modo, uma ligação cruzada na região do N-terminal. No estado reduzido, o hemo *c* mantém a coordenação e a tirosina (Tir10) do hemo *d*₁, apesar de conservada, não é equivalente à Tir25 de *Pa. denitrificans* GB17, isto é não participa na catálise; a sua substituição por fenilalanina não altera as propriedades catalíticas (Cutruzzolà *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 2001).

A catálise (figura 15) é iniciada com a ligação do nitrito, através do seu átomo de azoto, ao hemo *d*₁ reduzido. A posterior redução e desidratação do nitrito resulta na formação de um intermediário nitrosilo ($\text{Fe}^{2+}\text{-NO}^+$ ou $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$). Duas histidinas (His345 e His388, em *Pa. denitrificans* GB17 e His327 e His369, em *Ps. aeruginosa*) participam na reacção de protonação acoplada à remoção de um dos oxigénios (como água) do nitrito.

O passo crítico é a dissociação do óxido nítrico; o intermediário nitrosilo ganha um electrão, por transferência intraelectrónica do hemo *c*, conduzindo à inactivação da enzima por formação de um complexo estável ($\text{Fe}_2\text{-NO}$). Contudo, a forma de evitar a sua formação não está ainda estabelecida *in vivo* (Averill, 1996; Ferguson, 1998, Allen *et al.*, 2001; Cutruzzolà *et al.*, 2001). Em *Pa. denitrificans* GB17, a Tir25 parece estar envolvida na libertação do NO, provavelmente coordenando-se de novo ao hemo *d*₁ durante cada ciclo catalítico. O hemo *c* parece ter um papel no controlo da velocidade de transferência intraelectrónica entre os hemos *c* e *d*₁ evitando a inibição da NiR pelo produto; deste modo, o hemo *d*₁ só deve ser novamente reduzido após libertação do NO (Berks *et al.*, 1995, Allen *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2001; Moura e Moura, 2001).

O mecanismo proposto, não é no entanto universal, na medida em que o resíduo de tirosina (Tir25) não é encontrado em *Ps. stutzeri* e a tirosina (Tir10) de *Ps. aeruginosa* não é essencial para a catálise (Cutruzzolà *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 2001).

Redutase do nitrito contendo cobre (CuNiR)

A CuNiR de *Achromobacter* (Ach.) *cycloclastes* (figura 16) é um homotrí-

figura 15 Mecanismo de catálise da NiR de *Pa. denitrificans* GB17 (Adaptado de Berks et al., 1995; Ferguson, 1998).

mero (3x37 kDa) contendo dois cobres por monômero (não existem outros co-factores) que distam 12,6 Å. O cobre do tipo 1, localizado no N-terminal, funciona como doador eletrônico, enquanto que o cobre do tipo 2, ligado na interface dos monômeros, é o sítio catalítico. Dois resíduos não coordenados ao cobre (Asp98 e His255) funcionam como doadores de prótons durante o ciclo catalítico (Adman e Murphy, 2001).

Cada monômero, essencialmente em folha β, possui dois domínios, iguais em tamanho, com uma topologia em "Greek-key", característico das cupredoxinas. O domínio N-terminal de cada monômero interage com o domínio C-terminal do monômero adjacente; o pri-

meiro forma o canto do trímero, enquanto que o C-terminal se encontra no centro. Uma cauda proeminente no C-terminal é essencial para a manutenção da estrutura quaternária (Adman e Murphy, 2001; Moura e Moura, 2001).

Duas histidinas, uma cisteína e uma metionina (His95, Cys136, His145 e Met150), numa geometria tetraédrica distorcida (ou triangular plana distorcida, considerando que a metionina é o ligando mais fracamente ligado), completam a esfera de coordenação do cobre do tipo 1. O cobre do tipo 2 está coordenado a três histidinas, duas de um monômero (His100 e His135) e a terceira do monômero adjacente (His306); apresenta uma geometria tetraédrica e, na ausência de substrato, possui a

quarta posição de coordenação ocupada por uma molécula de água (ou hidroxilo). O cobre do tipo 2 localiza-se na parte inferior de uma cavidade (a 12 Å da superfície) que alberga dois resíduos carregados (Asp98 e His255), mas é hidrofóbica de um dos lados; o canal que conduz à superfície está preenchido com moléculas de água, mas a parte hidrofóbica que contém a His255, favorece a saída do produto, o óxido nítrico (NO). Interações de hidrogénio específicas mantêm a orientação dos ligandos de cobre (figura 17) (Adman e Murphy, 2001).

Durante a catálise (figura 18) o nitrito liga-se assimetricamente à forma oxidada, deslocando o hidroxilo (ou o cloreto, no caso da CuNiR de *A. xylosoxidans*).

figura 16 Representação esquemática da CuNiR de *Ach. cycloclastes*. Os cobres (a laranja) estão representados por modelos "stick and ball" (Adaptado de Adman e Murphy, 2001).

figura 17 Representação dos cobres (a amarelo claro) e respectivos ligandos da CuNiR de *Ach. cycloclastes*. Os resíduos Asp98 e His225 (a verde) funcionam como doadores de prótons durante o ciclo catalítico (Adaptado de Adman e Murphy, 2001).

O substrato liga-se, de uma forma bidentada, ao cobre, através dos oxigénios, tornando-o pentacoordenado; o Asp98 interacciona com um dos oxigénios, estabilizando o intermediário formado. Um doador externo reduz o cobre do tipo 1 que, por sua vez, reduz o cobre do tipo 2. Um electrão é transferido, do cobre do tipo 2 para um dos átomos de oxigénio do nitrito, a ligação N-O é enfraquecida e o óxido nítrico (NO) formado sai, deixando novamente ligado um hidroxilo (Berks *et al.*, 1995; Zumft, 1997; Adman e Murphy, 2001; Moura e Moura, 2001)

Redutase do nitrito multihémica (ccNiR)

A ccNiR de *Sulfurospirillum* (*S.*) *deleyianum* (figura 19) é um homodímero contendo cinco hemos χ /subunidade, covalentemente ligados à cadeia polipeptídica por dois resíduos de cisteína,

que distam entre si de 9,3 a 12,7 Å. Um íon cálcio, localizado na proximidade do sítio activo, desempenha um papel estrutural fundamental na organização do mesmo, assegurando a orientação dos resíduos "activos". Alguns destes resíduos carregados funcionam como doadores de prótons durante o ciclo catalítico (Einsle, 2001).

A ccNiR é um dímero com predominância em hélice α , em que as três mais longas hélices de cada monómero formam a parte central; existem apenas duas folhas β , antiparalelas, na parte periférica da molécula. Cada monómero possui apenas um domínio compacto que envolve os cinco hemos, localizados relativamente próximos e na parte inferior da molécula. O sítio activo, hemo 1, situa-se na parte inferior de uma cavidade em forma de funil, definida a partir da superfície e que alberga resíduos carregados que estabelecem interac-

ções com o substrato ligado (Arg113, His282, Thr217). O íon cálcio está coordenado por um glutamato, de um modo bidentado, uma glutamina, dois oxigénios carbonilo da cadeia polipeptídica e duas moléculas de água; liga dois segmentos da proteína que contêm os resíduos envolvidos na catálise, assegurando a sua orientação adequada (Einsle, 2001).

Todos os hemos, com excepção do hemo 1, onde decorre a catálise, possuem uma coordenação bis-histidina. O hemo 1 é pentacoordenado e apresenta uma coordenação pouco vulgar, uma lisina (Lis133) em vez da usual histidina. O hemo 3 apresenta um empilhamento paralelo com os hemos mais próximos, hemos 1 e 4, possibilitando uma interacção entre as porfirinas. Os hemos 2 e 3 e os hemos 4 e 5 estão dispostos de uma forma muito semelhante e são praticamente perpendiculares entre si. Os

figura 18 Mecanismo de catálise da CuNiR de *A. cycloclastes* (Adaptado de Adman e Murphy, 2001).

figura 19 Representação esquemática da estrutura da ccNiR de *S. deleyianum*. Os hemes e o íon cálcio (a verde) estão representados por modelos "stick and ball" (Adaptado de Einsle, 2001).

figura 20 Representação e orientação relativa dos hemes na ccNiR de *S. deleyianum* (Adaptado de Einsle, 2001).

dois propionatos do hemo 1 apontam para o centro da molécula, participando na formação do sítio activo, enquanto que os propionatos do hemo 3 estabelecem ligações, por pontes de hidrogénio, com resíduos interiores da cadeia polipeptídica; os propionatos dos hemos 2, 4 e 5 estão expostos à superfície, interagindo com o solvente (figura 20) (Einsle, 2001).

Com excepção do hemo catalítico (hemo 1) o arranjo espacial dos restantes hemes define dois tipos de interacção entre os hemes: interacção entre hemos quase perpendiculares, em forma de cotovelo, e interacção entre hemos paralelos. O primeiro tipo de interacção, entre os hemos 2/3 e os hemos 4/5, é comum a uma série de ci-

tocromos multihémicos (hemos 2/3, 5/6 e 7/8 da OHA - passo 3, citocromo c3 e citocromo c_{554}); no entanto, as suas propriedades não estão ainda completamente estabelecidas. O segundo tipo de interacção, entre os hemos 3/4, é também encontrado numa variedade de enzimas (hemos 1/2, 3/5, 6/7 da OHA - passo 3, citocromo c_{554} e citocromo c split-Soret de *D. desulfuricans*) e permite uma interacção directa das porfirinas. O padrão definido é tal que as disposições perpendiculares dihémicas estão ligadas entre si por um empilhamento paralelo entre hemos (Einsle, 2001).

A estrutura de Raios-X, obtida para *Wolinella succinogenes* e mais recentemente a estrutura de Raios-X da ccNiR de *D. desulfuricans* ATCC 27774 reve-

lam uma elevada homologia com a descrita anteriormente (*S. deleyianum*) (Einsle *et al.*, 1999; Lampreia *et al.*, 2000; Moura e Moura, 2001).

A redução do nitrito (NO_2^-) ocorre no lado distal do hemo 1; vários ligandos contribuem para uma densidade positiva desta cavidade, justificando deste modo a preferência na utilização de substratos aniónicos. Os resíduos que formam o sítio activo funcionam tanto como reservatório (a reposição é efectuada por moléculas de água), como doadores de prótons na redução a amónia, para além de interagirem com o substrato, estabilizando-o. No entanto, se esta cavidade positiva facilita a entrada do substrato aniónico, o mesmo não acontece relativamente ao produto for-

figura 21 Representação esquemática da estrutura da N2OR de *Ps. nautica* 617. Os centros de cobre estão representados por modelos "stick and ball" (Adaptado de Brown et al., 2000).

mado, a amônia (NH_4^+). A existência de um segundo canal, em oposição ao anterior, preenchido com moléculas de água e com uma densidade negativa na superfície da molécula, favorece a saída do produto formado. A existência de dois canais separados, para o substrato e para o produto, permite o fluxo direcionado dos metabolitos através da proteína, evitando deste modo a inibição pelo produto e contribuindo para a elevada especificidade da ccNiR (Einsle et al., 1999; Einsle, 2001; Moura e Moura, 2001).

1.2.7. Redutase do óxido nítrico (passo 7) - NOR

A redutase do óxido nítrico (NOR) é uma enzima membrana que catalisa a conversão de duas moléculas de óxido nítri-

co (um intermediário tóxico) em óxido nítrico, de acordo com a seguinte equação:

Dada a sua instabilidade, o que torna a purificação difícil, a NOR é uma das enzimas menos caracterizadas. É um complexo *bc* semelhante à oxidase do citocromo *c* (COX), mas que não contém cobre (Girsch e de Vries, 1997; Sakurai e Sakurai, 1997; Cheesman et al., 1998). É um heterodímero que contém, na subunidade maior, dois hemos *b*, um de spin baixo (com uma coordenação Met-His) e um de spin alto, e um ferro não hémico *e*, na subunidade menor, membrana, um hemo *c* (com uma coordenação Met-His) funciona como local de entrada dos electrões na enzi-

ma. A subunidade maior possui 12 hélices transmembranares e liga o centro catalítico, um centro dinuclear de ferro, formado pelo hemo *b*, de spin alto, e o ferro não hémico (coordenado a três histidinas), acoplados antiferromagneticamente por um oxo/hidroxo em ponte (ligando do hemo *b*); o ferro não hémico ocupa a posição do cobre (CuB) nas COX. O hemo *b* de spin baixo e o hemo *c* funcionam como mediadores nas transferências intra e intermolecular, respectivamente (Girsch e de Vries, 1997; Cheesman et al., 1998; Hendriks et al., 1998).

Por semelhança com a COX, o mecanismo proposto envolve, após ligação, em ponte, da primeira molécula de óxido nítrico (NO) em ponte aos dois ferros, a redução de ambos os centros, seguida

figura 22 (A) Representação do centro catalítico CuZ e as sete histidinas que o coordenam, (B) centro binuclear de cobre, CuA e respectivos ligandos, da N2OR de *Ps. nautica* 617 (Adaptado de Brown et al., 2000).

figura 23. Mecanismo de catálise da N2OR de *Ps. nautica* 617 (Adaptado de Brown et al., 2000).

pela protonação do ligando em ponte, que sai sob a forma de água. A ligação da segunda molécula de NO resulta na quebra da ligação em ponte entre os dois ferros, pelo que cada um deles liga uma molécula de NO. A proximidade das duas moléculas de NO possibilita a formação da ligação N-N. A redução de um dos oxigénios do intermediário (N_2O_2) permite o restabelecimento da ligação em ponte e a libertação do produto (N_2O).

As diferenças estruturais entre a COX e a NOR devem em parte reflectir a diferença química da respectiva reacção de catálise. Aparentemente, a NOR não é uma bomba de prótons (Girsch e de Vries, 1997). No entanto, a NOR, isolada e purificada de *Ralstonia* (R.) *eutropha* (anteriormente denominada *Alcaligenes eutrophus*), consiste em apenas uma subunidade de 75 kDa, que contém os dois citocromos b e o ferro não hémico, mas não possui o hemo c. Dada a presença de uma extensão no N-terminal (280 aminoácidos), presente também nas oxidases do quinol, especula-se que a NOR de *Ralstonia* (R.) *eutropha* represente um novo tipo de oxidase do quinol (Cramm et al., 1999).

1.2.8. Redutase do óxido nitroso (passo 8) - N_2OR

A redutase do óxido nitroso (N_2OR), uma enzima periplasmática, catalisa o último passo da desnitrificação, de acordo com a seguinte equação:

Exceptuando a N_2OR de *Rhodobacter* (Rb.) *sphaeroides*, que contém zinco e níquel, e a de *Wolinella succinogenes*, que tem como co-factor hemo, as res-

tantes contêm apenas cobre. Na generalidade, são homodímeros que contêm dois centros binucleares de cobre (Cu_A e Cu_Z ou Cu_{cat}). O centro de cobre Cu_A (Cu I/Cu II de valência mista), semelhante à oxidase do citocromo c (COX), é responsável pela transferência electrónica, a partir de um doador externo para o centro catalítico, Cu_Z , com uma esfera de coordenação de cisteínas (Prudêncio et al., 2000; Moura e Moura, 2001).

A obtenção da estrutura de Raios-X da N_2OR de *Ps. nautica* 617 veio revelar que esta enzima não é constituída por dois centros binucleares de cobre; o centro de cobre Cu_Z pertence a uma nova classe de agregados em que quatro átomos de cobre estão coordenados a sete histidinas. Apenas um cobre (CuIV) participa na ligação do substrato, os restantes actuam como reservatórios electrónicos, assegurando a rápida transferência e evitando a formação de produtos sem saída (Brown et al., 2000; Prudêncio et al., 2000).

A N_2OR de *Ps. nautica* 617 (figura 21) é um dímero no qual o domínio C-terminal de um dos monómeros interacciona com o domínio N-terminal do outro monómero, resultando numa proximidade entre os centros Cu_A e Cu_Z de subunidades diferentes. Dois resíduos do C-terminal (Met570 e Fen564) estabelecem interacções entre as duas subunidades e provavelmente estão envolvidos na transferência intraelectrónica. Cada monómero é composto por dois domínios distintos, formados por segmentos contíguos da cadeia polipeptídica. O N-terminal forma uma hélice de sete lâminas em folha b; cada lâmina é composta por quatro folhas b, antiparalelas e torcidas, dispostas radialmente, definindo uma

cavidade central cónica. O C-terminal consiste em nove folhas b antiparalelas, com uma topologia em "Greek-key", típica das cupredoxinas (Brown et al., 2000).

O centro Cu_Z (figura 22A) está localizado numa das extremidades da estrutura em hélice a e possui quatro cobres, dispostos num arranjo tetraédrico distorcido; CuI e CuII estão ligados a dois cobres, enquanto que CuIII e CuIV estão ligados a três cobres. Três dos cobres (CuI , CuII e CuIII) estão ligados a duas histidinas e apenas uma histidina coordena CuIV . Os cobres CuIII e CuIV estão ligados em ponte por um enxofre inorgânico e um oxigénio liga em ponte os cobres CuI e CuIV (Prudêncio et al., 2000; Moura e Moura, 2001).

No centro Cu_A (figura 22B) os cobres binucleares estão ligados em ponte por duas cisteínas (Cis561 e Cis565); adicionalmente, uma histidina coordena cada um dos cobres (His526 e His569); uma metionina (Met572) e um triptofano (Trp563) completam a coordenação, quadrangular plana distorcida, do CuI e do CuII , respectivamente (Moura e Moura, 2001).

O mecanismo de redução proposto (figura 23) envolve três passos: o cobre catalítico (CuIV) permanece oxidado e, como tal, disponível para ligar o substrato (N_2O); a ligação do N_2O ao cobre CuIV ocorre através do átomo de oxigénio, sendo o átomo de azoto exterior estabilizado por interacções com a Lis397 e His376; o centro Cu_Z comporta-se como um "tampão electrónico" (Moura e Moura, 2001).

Agradecimentos

Os autores agradecem ao PRAXIS e COST apoio financeiro. Um agradecimento aos grupos de Química Bioinorgânica, Biofísica de Proteínas e Cristalografia de Proteínas do COFB/DQ por muitas contribuições. Ao Jorge Pereira pela ajuda na obtenção de inúmeras figuras.

Bibliografia

- Adman, E.T., Murphy, M.E.P. (2001) "Copper nitrite reductase" in Handbook of Metalloproteins, (A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos, K. Wieghardt, Eds), **Vol 2**, pp 1381-1390, John Wiley & Sons, LTD
- Allen, J.W.A., Ferguson, S.J., Fülöp, V. (2001) "Cytochrome cd1 nitrite reductase" in Handbook of Metalloproteins (A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos, K. Wieghardt, Eds), Vol 1, pp 424-439, John Wiley & Sons, LTD
- Averill, B.A. (1996) "Dissimilatory nitrite and nitric oxide reductases", *Chem. Rev.*, **96**, 2951-2964
- Berks, B.C., Ferguson, S.J., Moir, J.W.B., Richardson, D.J. (1995) "Enzymes and associated electron transport systems that catalyze the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions", *BBA*, **1232**, 97-173
- Brown, K., Tegoni, M., Prudêncio, M., Pereira, A.S., Besson, S., Moura, J.J.G., Moura, I., Cambillau, C. (2000) "A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase", *Nature structural biology*, **7**, 191-195
- Bursakov, S., Liu, M.-Y., Payne, W.J., LeGall, J., Moura, I., Moura J.J.G. (1995) "Isolation and preliminary characterization of a soluble nitrate reductase from the sulphate reducing organism *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774", *Anaerobe*, **1**, 55-60
- Carneiro C., Almendra M.J., Bursakov S., Liu M.-Y., Payne W.J., LeGall J., Moura J.J.G., Moura I. (1995) "Nitrate reductase from a sulfate reducing *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774", *J. Inorg. Chem.*, **59**, 738
- Cheesman, M.R., Zumft, W.G., Thomson, A.J. (1998) "The MCD and EPR of the heme centers of nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*: evidence that the enzyme is structurally related to the heme-copper oxidases", *Biochem.*, **37**, 3994-4000
- Cramm, R., Pohlmann, A., Friedrich, B. (1999) "Purification and characterization of the single-component nitric oxide reductase from *Ralstonia eutropha*", *FEBS Lett.*, **460**, 6-10
- Cutruzzolà, F., Arese, M., Grasso, S., Bellelli, A., Brunori, M. (1997) "Mutagenesis of nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*: tyrosine 10 is not involved in catalysis", *Febs lett.*, **412**, 365-369
- Dias, J.M., Bursakov, S., Carneiro, C., Moura, J.J.G., Moura, I., Romão, M.J. (1999 a) "Crystallization and preliminary X-ray analysis of a nitrate reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774", *Acta Cryst.*, **D55**, 877-879
- Dias, J.M., Than, M.E., Humm, A., Huber, R., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Bursakov, S., Calvete, J., Caldeira, J., Carneiro, C., Moura, J.J.G., Moura, I., Romão, M.J. (1999 b) "Crystal structure of the first dissimilatory nitrate reductase at 1,9 Å solved by MAD methods", *Structure*, **7**, 65-79
- Einsle, O. (2001) "Cytochrome c nitrite reductase" in Handbook of Metalloproteins, (A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos, K. Wieghardt, Eds), **Vol 1**, pp 440-453, John Wiley & Sons, LTD
- Einsle, O., Messerschmidt, A., Stach, P., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Huber, R., Kroneck, P. (1999) "Structure of cytochrome c nitrite reductase", *Nature*, **400**, 476-480
- Ferguson, S.J. (1998) "Nitrogen cycle enzymology", *Current Opinion in Chemical Biology*, **2**, 182-193
- Girsch, P., de Vries, S. (1997) "Purification and initial kinetic and spectroscopic characterization of NO reductase from *Paracoccus denitrificans*", *BBA*, **1318**, 202-216
- Hendriks, J., Warne, A., Gohlke, U., Haltia, T., Ludovici, C., Lübbers, M., Saraste, M. (1998) "The active site of the bacterial nitric oxide reductase is a dinuclear iron center", *Biochem.*, **37**, 13102-13109
- Holmes, A.J., Costello, A., Lidstrom, M.E., Murrell, J.C. (1995) "Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related", *FEMS Microbiol Lett.*, **132**, 203-208
- Igarashi, N., Tanaka, N. (2001) "Hydroxylamine oxidoreductase" in Handbook of Metalloproteins (A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos, K. Wieghardt, Eds), **Vol 1**, pp 454-470, John Wiley & Sons, LTD
- Lamprea J., Moura J.J.G., Moura, I., Romão, M.J. (2000) "Crystallisation and preliminary X-ray analysis of a membrane bound nitrite reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774", *Acta Crystallogr D*, **56**, 215-217
- Lopes, H., Besson, S., Moura, I., Moura, J.J.G. (2001) "Kinetics of inter- and intramolecular electron transfer of *Pseudomonas nautica* cytochrome *cd1* nitrite reductase: regulation of the NO-bound end product", *J. Biol. Inorg. Chem.*, **6**, 55-62
- Madigan, M.T., Martinho, J.M., Parker, J. (2000) Biology of microorganisms 9th edition, Prentice-Hall
- McTavish H., Fuchs, J.A., Hooper, A.B. (1993) "Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*", *J.Bacteriol.*, **175**, 2436-2444
- Moura, I., Bursakov, S., Costa, C., Moura, J.J.G. (1997) "Nitrate and nitrite utilization in sulfate reducing bacteria", *Anaerobe*, **3**, 279-290
- Moura, I., Moura, J.J.G. (2001) "Structural aspects of denitrifying enzymes", *Current Opinion in Chemical Biology*, **5**, 168-175
- Prudêncio, M., Pereira, A.S., Tavares, P., Besson, S., Cabrito, I., Brown, K., Samyn, B., Devreese, B., Van Beeumen, J., Rusnak, F., Fauque, G., Moura, J.J.G., Tegoni, M., Cambillau, C., Moura, I. (2000) "Purification, characterization and preliminary crystallographic study of copper-containing nitrous oxide reductase from *Pseudomonas nautica* 617", *Biochem.*, **39**, 3899-3907
- Richardson, D.J., Watmough, N.J. (1999) "Inorganic nitrogen metabolism in bacteria", *Current Opinion in Chemical Biology*, **3**, 207-219
- Richardson, D.J., Wehrfritz, J.M., Keech, A., Crossman, L.C., Roldan, M.D., Sears, H.J., Butler, C.S., Reilly, A., Moir, J.W.B., Berks, B.C., Ferguson, S.J., Thomson, A.J., Spiro, S. (1998) "The diversity of redox proteins involved in bacterial heterotrophic nitrification and aerobic denitrification", *Biochem. Soc. Trans.*, **26**, 401-408
- Romão, M.J., Dias, J.M., Moura, I. (2001) "Dissimilatory nitrate reductase" in Handbook of Metalloproteins (A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos, K. Wieghardt, Eds), **Vol 2**, pp 1075-1085, John Wiley & Sons, LTD
- Romão, M.J., Knäblein, J., Huber, R., Moura, J.J.G. (1997) "Structure and function of molybdopterine containing enzymes", *Prog. Biophys. molec. Biol.*, **68**, 121-144
- Sakurai, N., Sakurai, T. (1997) "Isolation and characterization of nitric oxide reductase from *Paracoccus halodenitrificans*", *Biochem.*, **36**, 13809-13815
- Schmid, B., Chiu, H.-J., Ramakrishnan, V., Howard, J.B., Rees, D.C. (2001) "Nitrogenase" in Handbook of metalloproteins (A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos, K. Wieghardt, Eds), **Vol 1**, pp 1025-1036, John Wiley & Sons, LTD
- Sun, P.D., Boyington, J.C., Stadtman, T. (2001) "Formate dehydrogenase H", in Handbook of Metalloproteins (A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos, K. Wieghardt, Eds), **Vol 2**, pp 1109-1120, John Wiley & Sons, LTD
- Zumft, W.G. (1997) "Cell biology and molecular basis of denitrification", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 533-616