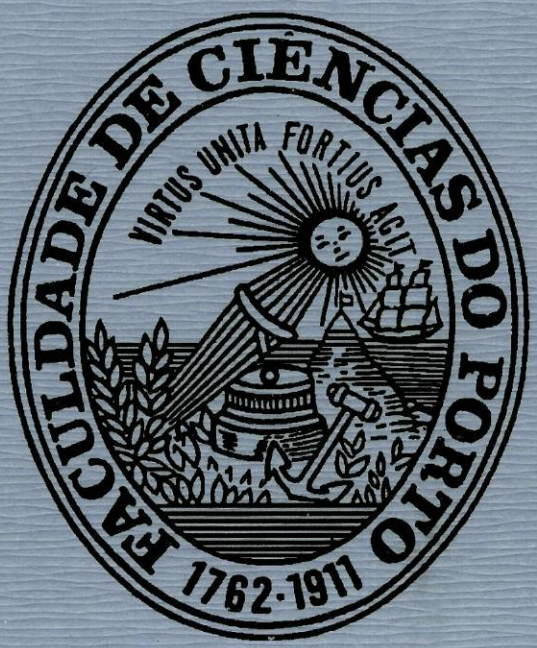
Dora Raquel da Silva Pinho

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA VIA DESNITRIFICANTE EM *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS*



Departamento de Química

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

2002

Dora Raquel da Silva Pinho

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA VIA DESNITRIFICANTE EM *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS*



Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

para obtenção do grau de Doutor em Química

Departamento de Química

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

2002

À Sofia

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, por me ter aceite como aluna de Doutoramento.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia, a concessão de uma Bolsa de Doutoramento (PRAXIS XXI/ BD /5041/ 95).

Ao Prof. Baltazar de Castro, meu orientador, que me lançou neste projecto e me incentivou a ultrapassar os obstáculos que foram surgindo.

À Prof. Isabel Moura, por me receber no seu grupo de investigação e pela frutuosa orientação no projecto.

Ao Prof. José J. G. Moura, pela ajuda e orientação na fase inicial do trabalho e por disponibilizar os meios técnicos do seu grupo de investigação.

Ao Stéphane Besson, pela amizade e pela ajuda inestimável em todo o projecto: do planeamento das experiências, até ao trabalho de bancada e à análise e crítica dos resultados. Sem a sua colaboração a minha tarefa teria sido bem mais árdua!

Ao Carlos Brondino e à Smilja Todorovic, pelo apoio nas medições de RPE e ao Hélder Lopes, pela iniciação na bioelectroquímica.

A todas pessoas dos grupos de investigação da Química Bioinorgânica e Engenharia de Proteínas e da Bioquímica Física de Proteínas do Departamento de Química da FCT-UNL, pelo acolhimento caloroso e ajuda sempre pronta.

À Cristina Freire, pela ajuda e orientação na área da Electroquímica (e não só!) e à Eulália Pereira, pela colaboração nos estudos de Microbiologia e na fase inicial de Purificação de Proteínas, bem como nas simulações dos espectros de RPE das azurinas.

Ao Miguel Vilas Boas, pela ajuda constante com os computadores e, de um modo geral, a todos os colegas de laboratório no Departamento de Química da FCUP, pela amizade, camaradagem e bom-humor.

Às Gen de Lisboa (em especial a Sofia, a Júlia, a Ana T., a Élia, a Marília, a Andreia e a Vânia), pelo apoio e hospitalidade transbordante durante as minhas estadas lá, e a todos os meus amigos e amigas, com quem partilhei as alegrias e frustrações deste projecto.

Um obrigado muito especial aos meus pais, que sempre confiaram nas minhas capacidades e ajudaram a enfrentar os desafios da vida e ultrapassar as suas dificuldades, e também aos meus avós, sogros, cunhado e restante família, pelo seu apoio, carinho e dedicação.

E principalmente ao Pedro, pela ajuda incansável, pela imensa paciência e encorajamento, e acima de tudo pelo Amor que é construção de um dia-a-dia em comum.

Dora Pinho

RESUMO

O crescimento das estirpes DSM 50135 e 50083^T de *Pseudomonas chlororaphis* em condições microaeróbicas na presença de nitrato produziu células com expressão abundante de metaloproteínas. Da estirpe DSM 50135, que se revelou um bom sistema para expressão das proteínas envolvidas na desnitrificação, isolou-se uma azurina (Az626), uma redutase do nitrito contendo cobre (CuNiR) e uma redutase membranar do nitrato (NaR). A indução da desnitrificação na estirpe DSM 50083^T revelou-se mais problemática do que na DSM 50135, tendo-se purificado desta estirpe apenas uma azurina (Az624) e, parcialmente, uma proteína com actividade de redutase do nitrito.

As azurinas das estirpes de *Ps. chlororaphis* estudadas (Az624 e Az626) apresentam vários comportamentos que as distinguem das outras azurinas conhecidas. Têm um carácter mais acídico e potenciais de redução mais elevados do que a maioria das azurinas descritas na literatura e apresentam uma dependência do potencial com o pH semelhante à observada em *Ps. aeruginosa*, mas em que os valores menores de pK das formas oxidadas sugerem maiores mudanças estruturais associadas ao processo de oxidação. Observa-se uma dependência inédita do coeficiente de difusão de Az624 com o pH, que poderá ser devida a mudanças conformacionais, ou à formação de agregados supramoleculares associados ao processo de protonação. Em ambas as azurinas detecta-se estrutura super-hiperfina no espectro de ressonância paramagnética electrónica (RPE) em banda X, comportamento descrito apenas para uma outra azurina, isolada de uma estirpe aparentada, *Ps. aureofaciens* ATCC 13985 (Zumft *et al.*, 1987).

A redutase do nitrito isolada de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 é uma enzima azul, que contém dois tipos de centros de cobre, tipo-1 (T1Cu) e tipo-2 (T2Cu), tal como as restantes CuNiRs conhecidas. Neste trabalho efectuou-se pela primeira vez uma determinação directa dos potenciais de ambos os centros de cobre numa CuNiR: T2Cu, 172 mV e T1Cu, 298 mV a pH 7.6. Embora os valores obtidos pareçam não ser

consistentes com o mecanismo de transferência electrónica estabelecido, dados de espectroscopia de RPE sugerem que a ligação do nitrito ao centro T2Cu faça aumentar o seu potencial, tornando a transferência electrónica mais favorável. Os estudos de RPE com a enzima na forma "turnover" (forma envolvida no ciclo catalítico) sugerem também que a transferência electrónica entre o T1Cu e o T2Cu seja o mais rápido dos três processos redox envolvidos na catálise: 1) redução do T1Cu; 2) oxidação do T1Cu pelo T2Cu; e 3) reoxidação do T2Cu pelo NO_2^-.

A redutase do nitrito isolada de *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T possui características espectroscópicas e cinéticas que a distinguem das redutases do nitrito típicas. Por espectroscopia de RPE na forma nativa, detecta-se apenas um sinal de spin 5/2, provavelmente devido a um hemo *c* de spin alto. O espectro de absorção electrónica corrobora esta identificação, e sugere também a presença de um hemo d_1. Ao contrário do observado nas redutases do nitrito di-hémicas, cd_1NiR, típicas a enzima isolada só parece ser susceptível de redução após ligação do substrato ao seu centro activo, sugerindo diferenças mecanísticas apreciáveis.

A redutase do nitrato solubilizada de membranas de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 possui vários agregados de FeS, quer de potencial elevado quer de potencial baixo, e um centro activo de Mo, o dinucleótido de guanina e molibdopterina. Por RPE detectam-se duas formas do centro de Mo, de pH alto e baixo. Na forma de pH baixo observa-se um desdobramento hiperfino no espectro de RPE devido a um protão, que sugere a presença de um ligando OH. Por adição de ditionito, ocorre redução do centro activo de Mo(V) a Mo(IV). O centro reduzido pode ser reoxidado por nitrato, dando origem a um novo sinal de Mo(V), idêntico à forma de pH baixo inicial. A enzima isolada contém também uma quantidade sub-estequiométrica de hemo *c* que aparentemente interage com o centro de Mo, sugerindo que esta NaR possua um hemo *c* em vez do habitual hemo *b*. Estudos de electrocatálise da NaR nas membranas sugerem que a via intramolecular de transferência electrónica na enzima é bastante eficiente.

ABSTRACT

The microaerobic growth of the DSM 50135 and 50083^T strains of *Pseudomonas chlororaphis* in the presence of nitrate yielded cells with good expression of metalloproteins. From the DSM 50135 strain, in which a good expression of the denitrification pathway was achieved, an azurin, a Cu-containing nitrite reductase and a membrane-bound nitrate reductase were isolated. From the DSM 50083^T strain only an azurin and, partially, a nitrite reductase, were purified, as the induction of denitrification in this system proved to be more difficult to achieve.

The isolated azurins (Az624 e Az626) exhibit several peculiar properties among their homologues. They have a lower pI and a higher reduction potential than most of the azurins described in the literature. As observed in *Ps. aeruginosa* azurin, their reduction potentials are pH-dependent, but the pK values of their oxidized forms are lower than previously observed, which suggests that deeper structural changes are associated with the oxidation process of the novel azurins. A hitherto undescribed pH-dependence of the diffusion coefficient was observed in Az624, which could be caused either by conformational changes, or to the formation of supramolecular aggregates associated to the protonation process. Both azurins exhibit super-hyperfine structure in the X-band electron paramagnetic resonance (EPR) spectrum, described only for the azurin from the related species, *Ps. aureofaciens* ATCC 13985 (Zumft *et al.*, 1987).

The nitrite reductase (NiR) isolated from *Ps. chlororaphis* DSM 50135 is a blue enzyme, with type-1 and type-2 copper centres, as all copper-containing NiRs described so far. For the first time, a direct determination of the reduction potentials of both copper centres in a CuNiR was performed in this work: T2Cu, 172 mV and T1Cu, 298 mV at pH 7.6. Although the obtained values seem to be inconsistent with the established electron-transfer mechanism, EPR data suggest that the binding of nitrite to

the T2Cu centre increases its potential, favouring the electron-transfer process. Analysis of the EPR spectrum of the turnover form of the enzyme also suggests that the electron-transfer process between T1Cu and T2Cu is the fastest of the three redox processes involved in the catalysis: 1) reduction of T1Cu; 2) oxidation of T1Cu by T2Cu; e 3) reoxidation of T2Cu by NO_2^-.

The nitrite reductase isolated from *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T exhibits atypical kinetic and spectroscopic properties, as compared to other nitrite reductases described in the literature. The EPR spectrum of the native form shows only a spin 5/2 signal, probably due to a high-spin haem *c*. This identification is supported by the electronic absorption spectrum, which also suggests the presence of haem d_1. Unlike typical cd_1NiRs, the isolated enzyme seems to resist reduction unless the substract is bound to the active centre, which suggests notable mechanistic differences.

The nitrate reductase (NaR) solubilised from the *Ps. chlororaphis* DSM 50135 membranes possesses several FeS clusters, which can be grouped in two classes, according to the redox properties, the high- and the low-potential clusters, and a molybdenum active centre, the molibdopterin guanine dinucleotide. Two forms of the molybdenum centre, high- and low-pH, are detectable by EPR spectroscopy. The low-pH form shows an hyperfine splitting due to a proton, that suggests the presence of a OH ligand. The active centre is reduced from Mo(V) to Mo(IV) by the addition of dithionite. The reduced centre can be reoxidised by nitrate, originating a new Mo(V) signal, identical to the oxidised low-pH form. The isolated enzyme also contains haem *c* in a sub-stoichiometric amount. This haem apparently interacts with the molybdenum centre, suggesting that this NaR may contain haem *c* instead of the usual haem *b*. Electrocatalysis studies of the NaR in the membranes suggest also that the intramolecular electron-transfer pathway of the enzyme is very efficient.

RÉSUMÉ

La croissance des souches DSM 50135 et 50083^T de *Pseudomonas chlororaphis* en conditions microaérophiles et en présence de nitrate a permis d'obtenir des cellules exprimant des métalloprotéines en abondance. À partir de la souche DSM 50135, qui s'est révélée être un bon système pour l'expression des protéines impliquées dans la dénitrification, ont été isolées une azurine, une nitrite réductase à cuivre et une nitrate réductase membranaire. L'induction de la dénitrification dans la souche DSM 50083^T s'est avérée plus délicate que pour DSM 50135, et, à partir de cette souche, n'ont été purifiées qu'une azurine et, de façon partielle, une protéine à activité nitrite réductase.

Les azurines des souches de *Ps. chlororaphis* étudiées (Az624 et Az626) présentent divers comportements qui les distinguent des autres azurines connues. Elles ont un caractère plus acide et des potentiels de réduction plus élevés que la majorité des azurines décrites dans la littérature. Leur potentiel est dépendant du pH, de façon similaire à ce qui a été observé chez *Ps. aeruginosa*, mais les valeurs plus basses de pK des formes oxydées suggèrent de plus importantes modifications structurales associées au processus d'oxydation. Il a été observé une dépendance inédite relativement au pH du coefficient de diffusion de Az624, ce qui pourrait provenir de changements structuraux, ou de la formation d'agrégats supramoléculaires associés au processus de protonation. Pour les deux azurines a été détectée une structure super-hyperfine dans le spectre RPE en bande X, un comportement seulement décrit pour une autre azurine, isolée d'une souche proche, *Ps. aureofaciens* ATCC 13985 (Zumft *et al.*, 1987).

La nitrite réductase isolée de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 est une enzyme bleue qui contient deux types de centres à cuivre, T1Cu et T2Cu, tout comme les autres CuNiRs connues. Dans ce travail, la détermination directe des potentiels des deux centres à cuivre a été effectuée pour la première fois dans une CuNiR: T2Cu, 172 mV et T1Cu, 298 mV à pH 7.6. Bien que les valeurs obtenues paraissent ne pas être en accord

avec le mécanisme établi de tansfert des électrons, les données de spectroscopie RPE suggèrent que la liaison du nitrite au centre T2Cu provoque une augmentation de son potentiel, ce qui rend le transfert d'électrons plus favorable. Les études de RPE sur l'enzyme dans sa forme "turnover" suggèrent également que le transfert d'électrons entre T1Cu et T2Cu est le plus rapide des trois processus rédox impliqués dans la catalyse: 1) réduction de T1Cu; 2) oxydation de T1Cu par T2Cu et 3) réoxydation de T2Cu par NO_2^-.

La nitrite réductase isolée de *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T possède des caractéristiques spectroscopiques et cinétiques qui la distinguent des nitrite réductases typiques. Par spectroscopie RPE de la forme native, à peine un signal, de spin 5/2, a été détecté. Ce signal est probablement dû à un hème *c*. Cette identification est confirmée par spectrophotométrie UV-visible, qui suggère aussi la présence de l'hème d_1. Contrairement à ce qui est observé pour la cd_1NiR typique, l'enzyme isolée semble ne pouvoir être réduite qu'après liaison du substrat à son centre actif, ce qui sous-entend des différences mécanistiques appréciables.

La nitrate réductase solubilisée à partir des membranes de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 possède divers centres FeS, regroupés en deux classes selon leurs propriétés rédox, ceux de potentiel élevé et ceux de bas potentiel, et un centre actif à Mo, le dinucléotide de guanine et molybdoptérine. Par spectroscopie RPE ont été détectées deux formes du centre à Mo, les formes "pH élevé" et "bas pH". Pour la forme "bas pH", un dédoublement hyperfin de proton est observé, ce qui implique la présence d'un ligand OH. Par addition de dithionite, il se produit une réduction du centre actif de Mo(V) à Mo(IV). Le centre réduit peut être réoxydé par le nitrate, ce qui conduit à un nouveau signal Mo(V), identique à la forme "bas pH" initiale. L'enzyme isolée contient également une quantité sous-stoechiométrique d'hème *c* qui interagit apparemment avec le centre à Mo, ce qui sous-entend que cette NaR possède un hème *c* au lieu de l'hème *b* habituel. Des études d'électrocatalyse de la NaR dans les membranes suggèrent aussi que la voie intramoléculaire de transfert d'électrons dans l'enzyme est assez efficace.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS V

RESUMO VII

ABSTRACT IX

RÉSUMÉ XI

ÍNDICE XIII

LISTA DE ABREVIATURAS XVIII

PREFÁCIO XXII

1 O METABOLISMO DO AZOTO INORGÂNICO EM BACTÉRIAS 1

1.1 RESPIRAÇÃO BACTERIANA: UM PROCESSO FLEXÍVEL PARA UM AMBIENTE EM CONSTANTE MUDANÇA 3

1.2 O CICLO DO AZOTO 5

1.2.1 Fixação do azoto 6

1.2.2 Nitrificação 7

1.2.3 Oxidação anaeróbica do amónio 8

1.3 DESNITRIFICAÇÃO 9

1.3.1 Redutase do óxido nítrico 13

1.3.2 Redutase do óxido nitroso 13

1.4 PEQUENAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ELECTRÕES 14

1.5 REDUTASES DO NITRITO 18

1.5.1 Redutase do nitrito de cobre (CuNiR) 19

1.5.2 Redutase do nitrito di-hémica (cd_1NiR) 25

1.6 REDUTASES DO NITRATO 27

2 DESNITRIFICAÇÃO EM ESTIRPES FLUORESCENTES DE *PSEUDOMONAS* 31

2.1 DESNITRIFICAÇÃO E *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* 33

2.2 CRESCIMENTO DE *PS.CHLORORAPHIS* DSM 50083^T 34
2.3 SELECÇÃO DE OUTRAS ESTIRPES ADEQUADAS À PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DESNITRIFICANTE 36
2.4 CRESCIMENTOS DE *PS. CHLORORAPHIS* DSM 50135 37
2.4.1 Crescimentos à escala laboratorial 37
2.4.1.1 Influência da concentração inicial de nitrato no crescimento e desnitrificação de DSM 50135 39
2.4.1.2 Ensaios enzimáticos em esferoplastos e extractos periplasmáticos 41
2.4.2 Crescimento à escala piloto 45

3 PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ELECTRÕES: AS AZURINAS 49

3.1 INTRODUÇÃO 51
3.2 A AZURINA DE *PS. CHLORORAPHIS* DSM 50135 (AZ626) 51
3.2.1 Purificação 51
3.2.2 Caracterização bioquímica 53
3.2.3 Espectroscopia de Absorção Electrónica 54
3.2.4 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica 55
3.2.5 Caracterização electroquímica 58
3.2.5.1 Variação do potencial de redução com o pH 60
3.3 A AZURINA DE *PS. CHLORORAPHIS* DSM 50083^T (AZ624) 62
3.3.1 Purificação 62
3.3.2 Caracterização bioquímica 63
3.3.3 Espectroscopia de Absorção Electrónica 65
3.3.4 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica 67
3.3.5 Caracterização electroquímica 68
3.3.5.1 Variação do coeficiente de difusão com o pH 70
3.3.5.2 Variação do potencial de redução com o pH 71
3.4 ANÁLISE COMPARATIVA DAS AZURINAS ESTUDADAS 72

4 ENZIMAS DA DESNITRIFICAÇÃO (I): AS REDUTASES DO NITRITO 75

4.1 INTRODUÇÃO 77
4.2 REDUTASE DO NITRITO DE *PS. CHLORORAPHIS* DSM 50135 77
4.2.1 Purificação 77

4.2.2 Caracterização bioquímica 78
4.2.2.1 Massa molecular e ponto isoeléctrico 78
4.2.2.2 Conteúdo em cobre 80
4.2.2.3 Ensaios enzimáticos 81
4.2.3 Espectroscopia de Absorção Electrónica 82
4.2.4 Transferência electrónica entre a redutase do nitrito e a azurina do mesmo organismo 83
4.2.5 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica 89
4.2.5.1 Titulação redox 93
4.3 REDUTASE DO NITRITO DE *PS. CHLORORAPHIS* DSM 50083^T 96
4.3.1 Purificação 96
4.3.2 Caracterização bioquímica 96
4.3.3 Espectroscopia de Absorção Electrónica 98
4.3.4 Caracterização cinética 100
4.3.5 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica 101
4.4 CONCLUSÕES 102

5 ENZIMAS DA DESNITRIFICAÇÃO (II): A REDUTASE DO NITRATO 105

5.1 INTRODUÇÃO 107
5.2 PURIFICAÇÃO 108
5.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA 110
5.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ELECTRÓNICA 112
5.5 CARACTERIZAÇÃO ELECTROQUÍMICA 113
5.5.1 Caracterização electroquímica da transferência electrónica entre diversos mediadores e a redutase do nitrato na membrana, em presença de nitrato. 115
5.5.2 Caracterização electroquímica da transferência electrónica entre o metilviologénio e a redutase do nitrato solubilizada, em presença de nitrato. 119
5.6 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA 121
5.7 CONCLUSÕES 132

6 CONCLUSÕES 135

6.1 As estirpes 137
6.2 As azurinas 137
6.3 As redutases do nitrito 138
6.4 A redutase do nitrato 140

7 Experimental 143

7.1 Estirpes bacterianas 145
7.2 Crescimento das estirpes 145
7.2.1 Condições de crescimento específicas para as escalas laboratorial e piloto 146
7.2.2 Colheita e lavagem das células 146
7.3 Preparação de extractos celulares 148
7.3.1 Lise parcial: esferoplastos e fracção periplasmática 148
7.3.2 Lise total: fracção solúvel e fracção membranar 148
7.4 Purificação de proteínas solúveis 149
7.4.1 Purificação das azurinas 149
7.4.2 Purificação da redutase do nitrito (estirpe DSM 50135) 150
7.4.3 Purificação da redutase do nitrito (estirpe DSM 50083^T) 150
7.5 Purificação de proteínas membranares 151
7.5.1 Extracção das proteínas 151
7.5.2 Purificação da redutase do nitrato (estirpe DSM 50135) 151
7.6 Electroforese em gel de poliacrilamida 152
7.6.1 Gel de concentração homogénea em acrilamida 153
7.6.2 Gel de gradiente de concentração em acrilamida 156
7.7 Coloração dos geles de poliacrilamida 157
7.7.1 Coloração com azul de Coomassie 157
7.7.2 Coloração de hemos 158
7.7.3 Coloração de actividade enzimática 158
7.8 Determinação do ponto isoeléctrico das proteínas 159
7.9 Determinação da massa molecular das proteínas 161
7.9.1 Filtração em gel (analítica) 161
7.10 Sequenciação N-terminal 162
7.11 Quantificação de proteína total: método de micro-biureto 162

7.12 Determinação do Ferro lábil com Fereno 164
7.13 Análise de hemos 165
7.13.1 Extracção de hemos 165
7.13.2 Identificação e quantificação de hemos 166
7.14 Análise de nucleótidos de pterina 167
7.15 Quantificação do cobre 168
7.15.1 Absorção atómica 168
7.15.2 Quantificação de spin 168
7.15.3 Reconstituição dos centros de cobre tipo 2 169
7.16 Ensaios de actividade enzimática 169
7.16.1 Redutase do nitrato 169
7.16.2 Redutase do nitrito 170
7.16.3 Ensaios com inibidores 170
7.17 Quantificação do nitrato: método da fluorescência 170
7.18 Quantificação do nitrito: método de Nicholas & Nason 171
7.19 Espectroscopia de Absorção Electrónica 173
7.20 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica 173
7.21 Titulações potenciométricas 174
7.21.1 Descrição do sistema experimental 174
7.21.2 Análise dos resultados 176
7.22 Electroquímica de proteínas 176
7.22.1 Descrição dos sistemas experimentais 176
7.22.2 Electroquímica de sistemas catalíticos: análise dos resultados 179

8 Bibliografia 183

Apêndices 203

Apêndice 1 Determinação do parâmetro cinético λ a partir da razão corrente catalítica/corrente de pico. Curvas de trabalho para os casos reversível e irreversível. 205

Apêndice 2 Ajuste das curvas de titulação redox com a equação de Nernst 208

Apêndice 3 Dependência do coeficiente de difusão com o pH. Dedução da equação 3.3 209

LISTA DE ABREVIATURAS

APS — Persulfato de amónio

AMO — Monoxigenase de amónio

ANAMOX — Oxidação anaeróbica do amónio

HAO — Oxidorredutase da hidroxilamina

ATCC — American Type Culture Collection

ATP — Adenosina 5'-trifosfato

Az624 — Azurina de *Pseudomonas chlororaphis* DSM 50083

Az626 — Azurina de *Pseudomonas chlororaphis* DSM 50135

BisTrisPropano — 1,3-Bis[tris(hidroximetil)amino]propano

BSA — Albumina sérica bovina

BV, BV_{ox}, BV_{red} — Benzilviologénio, forma oxidada, forma semiquinona

CD — Dicroísmo circular

CMP — Citidina 5'-monofosfato

Cyt — Citocromo

D — Coeficiente de difusão

Da — Dalton (unidade de massa atómica)

DCPIP — 2,6-Diclorofenolindofenol

DDC — Dietilditiocarbamato

DEAE — Dietilaminoetil

DNA — Ácido desoxirribonucleico

DOC — Desoxicolato de sódio

DSM(Z) — Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (und Zellkulturen)

EDTA — Ácido etilenodiaminotetracético

E_m — Potencial de meia-onda

ENDOR — Ressonância dupla electrónica-nuclear

ENH — Eléctrodo normal de hidrogénio

E_p — Potencial de pico

EPPS — Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-3-propanossulfónico

ESEEM — Modulação da envolvente de ecos de spin electrónico

FAD — Dinucleótido de flavina e adenina

FeMoco — Cofactor de ferro e molibdénio

GMP — Guanosina 5'-monofosfato

HPLC — Cromatografia líquida de alta pressão

HTP — Hidroxiapatite

i_{cat} — Intensidade de corrente catalítica

i_{pa} — Intensidade de corrente de pico anódico

i_{pc} — Intensidade de corrente de pico catódico

K — Constante de equilíbrio

k — Constante de velocidade

k' — Constante de velocidade de pseudo-primeira ordem

K_m — Constante de Michaelis

MADH — Desidrogenase da metilamina

MCD — Dicroísmo circular magnético

MES — Ácido 2-(N-morfolino)etanossulfónico

MM — Massa molecular

MV, MV_{ox} , MV_{red} — Metilviologénio, forma oxidada, forma semiquinona

N2OR, NOS — Redutase do óxido nitroso

NADH, NAD^+ — Dinucleótido de nicotinamida e adenina (formas reduzida e oxidada)

NaR — Redutase membranar do nitrato

Nap — Redutase periplasmática do nitrato

NCIB — National Collection of Industrial Bacteria

NCIMB — National Collections of Industrial and Marine Bacteria

NCTC — National Collection of Type Cultures

NEDA — N-(1-naftil)-etilenodiamina diidrocloreto

NiR, CuNiR, cd_1NiR — Redutase do nitrito, -contendo cobre, -contendo hemos *c* e d_1

NOR — Redutase do óxido nítrico

PAGE — Electroforese em gel de poliacrilamida

P_i — Fosfato inorgânico

pI — Ponto isoeléctrico

PIPES —Ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanossulfónico)

PMS — Metossulfato de fenazina

RNA — Ácido ribonucleico

RMN — Ressonância magnética nuclear

RPE — Ressonância paramagnética electrónica

RR — Ressonância de Raman

SDS — Dodecil sulfato de sódio

T1Cu — Centro de cobre tipo 1

T2Cu — Centro de cobre tipo 2

TCA — Ácido tricloroacético

TEMED — N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina

TMBZ — 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

TMPD — N,N,N',N'-Tetrametilfenilenodiamina

Tris — Tris(hidroximetil)aminometano

TSBYE — Extracto de levedura suplementado com soja tratada com tripticase

TTC — Cloreto de trifeniltetrazólio

UV-Vis — Espectroscopia de Ultravioleta e Visível

UQ, UQH_2 — Ubiquinona (formas oxidada e reduzida)

V — Velocidade de reacção catalisada por uma enzima

YE — Extracto de levedura

λ — Parâmetro electroquímico

ν — Velocidade de varrimento em voltametria cíclica

EXAFS — Estrutura alargada de espectroscopia de absorção de raio-X (estrutura fina)

XANES — Estrutura fina de raio-X na proximidade da banda de absorção

PREFÁCIO

Antes de mais, quero apresentar algumas notas que tornarão mais fácil a leitura desta dissertação. Para maior simplicidade e clareza, utilizam-se alguns termos ingleses de difícil tradução, que aparecem evidenciados entre comas. No fluir do texto, omite-se frequentemente a palavra ***anião***, quando referido aos aniões nitrato, nitrito, clorato, sulfito, azida, cianeto e ferricianeto, entre outros. São utilizados vários nomes triviais que, embora não obedeçam às regras de nomenclatura IUPAC, são comuns na literatura bioquímica (por ex: ferricianeto, azida). A separação entre o algarismo das unidades e o das décimas é assinalada à maneira anglo-saxónica, por pontos em vez de vírgulas, como seria correcto pelas regras da Língua Portuguesa.

A *Ps. chlororaphis* é um bastonete aeróbico facultativo, Gram-negativo, saprofítico, capaz de crescer em condições anaeróbicas em presença de nitrato, truncando a desnitrificação em N_2O (Greenberg & Becker, 1977). Diversas estirpes de *Ps. chlororaphis* têm sido estudadas para fins biotecnológicos, mas ao contrário de outras espécies de *Pseudomonas* (*Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*) a *Ps. chlororaphis* encontra-se pouco estudada a nível molecular. O conhecimento detalhado da sua bioquímica poderá ajudar a optimizar as suas utilizações biotecnológicas pelo que decidi isolar e caracterizar diversas proteínas envolvidas na sua via desnitrificante, com óbvio interesse no crescimento do organismo em condições anaeróbicas.

No **Capítulo 1** integra-se o processo de desnitrificação no contexto do ciclo do azoto na Terra e revêem-se alguns aspectos fundamentais do actual conhecimento da estrutura e função das proteínas envolvidas na desnitrificação.

O **Capítulo 2** descreve o estudo prévio feito para a escolha das estirpes a utilizar, bem como o processo de optimização das condições de crescimento para obtenção de biomassa.

No **Capítulo 3** é apresentado o isolamento e caracterização bioquímica, espectroscópica e electroquímica das azurinas das duas estirpes de *Ps. chlororaphis* estudadas.

No **Capítulo 4** descreve-se a purificação da redutase do nitrito contendo cobre de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 e a sua caracterização bioquímica e espectroscópica, assim como o estudo electroquímico da transferência electrónica entre esta enzima a azurina do mesmo organismo. É também apresentada a purificação parcial e caracterização preliminar de uma redutase do nitrito atípica, isolada de *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T.

No **Capítulo 5** descreve-se a solubilização da redutase do nitrato membranar de *Ps. chlororaphis* DSM 50135, bem como a sua purificação e caracterização espectroscópica e electroquímica.

No **Capítulo 6** procede-se à integração das conclusões do trabalho e lançam-se algumas pistas para possibilidades de investigações futuras na matéria.

As condições experimentais, técnicas e instrumentos utilizados são descritas no **Capítulo 7**, seguindo-se a bibliografia no **Capítulo 8** e alguns **Apêndices**.

1

O METABOLISMO DO AZOTO INORGÂNICO EM BACTÉRIAS

1.1 RESPIRAÇÃO BACTERIANA: UM PROCESSO FLEXÍVEL PARA UM AMBIENTE EM CONSTANTE MUDANÇA

Todos os organismos vivos lutam pela continuidade da existência das suas espécies, *i.e.* pela sua sobrevivência e reprodução. Em organismos unicelulares, a capacidade de sobreviver depende da possibilidade da célula adaptar o seu metabolismo às fontes de carbono e energia disponíveis no seu habitat natural, assegurando a sua manutenção e crescimento. As exigências adaptativas da célula serão tanto maiores quanto maiores forem as flutuações destes substratos no meio. Organismos com a possibilidade de exprimir diversas vias metabólicas consoante as condições do meio encontrar-se-ão portanto numa situação de vantagem evolutiva, o que conduz ao aparecimento de grande diversidade metabólica.

Um bom exemplo desta diversidade é a respiração bacteriana, um processo associado à membrana que conduz à transdução da energia livre por fosforilação oxidativa. Para que este processo possa ocorrer continuamente, é fundamental que a célula consiga ajustar a sua eficiência respiratória às mudanças ambientais. A utilização de uma ***rede*** respiratória, ao invés de uma via linear, constitui a base de um sistema flexível de geração de energia: a adaptação pode ser conseguida quer por redireccionamento dos fluxos de electrões através dos ramos existentes na rede respiratória, quer por regulação específica da expressão de certos ramos, com mudanças na própria rede (Richardson, 2000). Em muitos ramos de Bacteria e Archaea, um leque diversificado de aceitadores de electrões pode ser utilizado, incluindo enxofre elementar e oxoaniões de enxofre (Hamilton, 1998), sulfóxidos e sulfonatos orgânicos (Lie *et al.*, 1999; McAlpine *et al.*, 1998)), oxoaniões e óxidos de azoto (Berks *et al.*, 1995), N-óxidos orgânicos (Czjzek *et al.*, 1998), compostos orgânicos halogenados (Dolfing, 1990; Louie & Mohn, 1999; van de Pas *et al.*, 1999), oxoaniões metalóides como selenatos e arsenatos (Krafft & Macy, 1998; Schroder *et al.*, 1997), e metais de transição como Fe(III) e Mn(IV) (Lovley, 1991), entre outros.

O *Paracoccus denitrificans* é um exemplo paradigmático de flexibilidade respiratória (van Spanning *et al.*, 1995). Trata-se de uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica facultativa que se encontra no solo. Durante o crescimento aeróbico heterotrófico, a sua cadeia respiratória é semelhante à da mitocôndria. Em ambos os casos, mitocôndria e *Pa. denitrificans*, a geração do gradiente de potencial electroquímico transmembranar é obtido por uma translocação de protões através da membrana citoplasmática, acoplada a vias redox. Isto envolve um conjunto específico de complexos de proteínas redox: a cadeia respiratória de transferência electrónica. Electrões provenientes do NADH dirigem-se para o oxigénio através da desidrogenase do NADH, de quinonas, do complexo citocromo bc_1, do citocromo *c* e da oxidase (do tipo aa_3) do citocromo *c*. Embora um sistema assim, relativamente simples, sirva bastante bem as necessidades de uma mitocôndria, que está na confortável posição de operar num ambiente sem grandes variações, não serve todos os propósitos de uma bactéria independente. O *Pa. denitrificans*, no seu ambiente natural, tem que lidar com condições em contínua variação no que diz respeito à disponibilidade de fontes de carbono e de energia livre, e de aceitadores finais de electrões. A sua sobrevivência depende da sua grande flexibilidade metabólica, que é consequência do seu potencial (genético) de adaptar o metabolismo às condições de crescimento, especialmente ao nível da rede respiratória. Em condições aeróbicas, a respiração que utiliza o oxigénio como aceitador terminal de electrões tem prioridade: o rendimento em ATP por electrão é assim máximo. Sob tensões normais de oxigénio, o organismo sintetiza uma oxidase com baixa afinidade para o oxigénio, a oxidase do citocromo aa_3. No entanto, sob menores tensões de oxigénio, o citocromo de alta afinidade cbb_3 oxidase torna-se mais abundante e é também expressa uma peroxidase do citocromo *c*, permitindo a eliminação de peróxido de hidrogénio (espécie tóxica parcialmente reduzida do oxigénio) num processo com conservação de energia. Sob condições anaeróbicas, são expressas enzimas capazes de reduzir oxoaniões e óxidos de azoto, em reacções que

podem ser acopladas à via central de transporte de electrões ao nível da reserva de ubiquinol ou do complexo citocromo bc_1, permitindo o crescimento e metabolismo do organismo em ambientes de anóxia. Esta via metabólica, a desnitrificação, é a principal responsável pela conversão de nitrato em azoto atmosférico, constituindo um processo-chave no ciclo de azoto na Terra.

1.2 O CICLO DO AZOTO

O ciclo do azoto manifesta a química redox inerente às principais espécies de azoto inorgânico: dinitrogénio (N_2), nitrato (NO_3^-) e amónio (NH_4^+). O azoto atmosférico é a forma esmagadoramente predominante sob que se encontra o azoto na Terra, seguida do nitrato na água do mar, e do amónio e aminas em solos e ecossistemas terrestres.

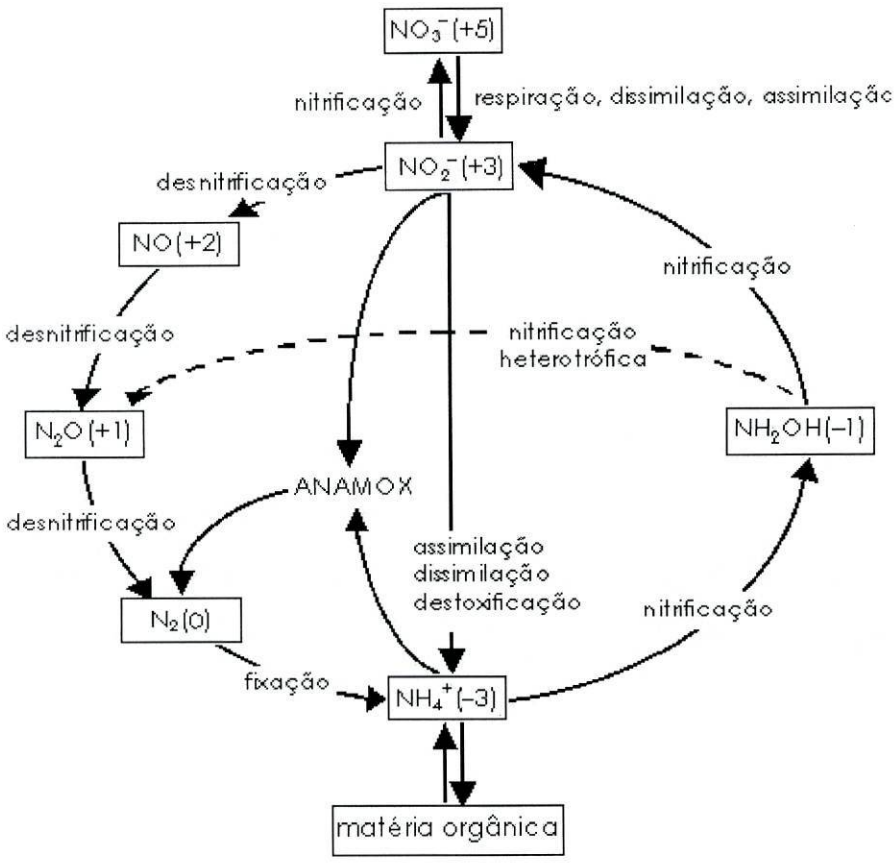


Figura 1.1 O ciclo biogeoquímico do azoto. Assinala-se entre parênteses o estado de oxidação das espécies de azoto. (Adaptado de Richardson & Watmough, 1999)

Na Figura 1.1 apresenta-se o ciclo biogeoquímico do azoto. Como se pode observar, este envolve uma grande variedade de reacções de oxidação e redução. Estas reacções, com a excepção da fixação do azoto atmosférico, estão associadas a sistemas de transporte electrónico através da membrana citoplasmática, com consequente síntese de ATP. Os passos oxidativos, do amónio a nitrito e nitrito a nitrato, envolvem a doação de electrões através de sistemas de transporte electrónico para o oxigénio ligados à membrana, enquanto que os passos de redução envolvem a aceitação de electrões de várias fontes através de cadeia transportadora de electrões. Pelo contrário, o sistema de fixação do azoto envolve uma enzima citoplasmática solúvel que requer quantidades consideráveis de ATP.

1.2.1 Fixação do azoto

A fixação do azoto é efectuada por diferentes grupos de bactérias e particularmente por bactérias que formam associações simbióticas com raízes de certas plantas (leguminosas). Globalmente, apenas cerca de 3% da produção primária bruta de matéria orgânica envolve azoto derivado do N_2 (Brock & Madigan, 1991). A restante produção primária utiliza formas "fixadas" de azoto (azoto combinado com outros elementos). Contudo, porque o N_2 constitui de longe o maior reservatório de azoto disponível para os organismos vivos, a capacidade de o utilizar reveste-se de grande importância ecológica.

No processo de fixação, o azoto é reduzido a amónio. O processo de redução é catalisado pelo complexo enzimático nitrogenase, composto por duas proteínas. Uma delas, um homodímero chamado proteína de Fe, possui um agregado de FeS, liga duas moléculas de ATP e, provavelmente, recebe os electrões de uma proteína dadora (como a flavodoxina) para os entregar à segunda proteína, a proteína de FeMo, que contém o local de ligação e redução do azoto. Esta segunda proteína tem dois novos tipos de agregados de FeS: um destes, responsável pela transferência electrónica intramolecular, denomina-se agregado P e o outro, responsável pela redução do diazoto, incorpora

também molibdénio (agregado FeMoco) (Burgess & Lowe, 1996; Howard & Rees, 1996). Em algumas formas variantes de nitrogenase, o molibdénio pode ser substituído por vanádio ou ferro adicional (Eady, 1996). Vários estudos bioquímicos permitiram estabelecer que duas moléculas de ATP são hidrolisadas por cada electrão que passa da proteína de Fe para a proteína de FeMo. A hidrólise do ATP está associada à dissociação do complexo entre as duas proteínas: a proteína de Fe sozinha não catalisa a reacção de hidrólise (Ferguson, 1998).

Tendo em conta que a redução do N_2 é exergónica, o papel exacto da hidrólise de ATP intrigou os estudantes da fixação do azoto durante muitos anos. É tentador supor que a inércia cinética da ligação tripla azoto-azoto é tal que a energia da hidrólise do ATP é necessária para promover a quebra da ligação, mas esta ideia, intuitivamente apelativa, está longe de ser provada a nível molecular (Seefeldt & Dean, 1997). Em todo o caso, há evidência de que a formação de intermediários parcialmente reduzidos envolva excursões termodinâmicas desfavoráveis ao longo da coordenada reaccional, e por isso a provisão de energia resultante da hidrólise do ATP pode ajudar a baixar as barreiras cinéticas da reacção.

A fixação do azoto ocorre também quimicamente na atmosfera, em pequena escala, por descargas eléctricas, e em maiores quantidades, nos reactores de Haber-Bosch, na produção industrial de fertilizantes de azoto (Brock & Madigan, 1991).

1.2.2 Nitrificação

O amónio produzido por fixação do azoto é rapidamente convertido em aminas bioquímicas (proteínas, ácidos nucleicos, glucosaminas) nas bactérias e plantas hospedeiras. Estes compostos eventualmente regressam à forma de amónio como resultado da decomposição das plantas e animais, e excreções de animais. Parte deste amónio secundário é novamente assimilado, mas o restante é oxidado a nitrito e nitrato pelas bactérias nitrificantes, que usam a oxidação do amónio por oxigénio como fonte de energia para a produção de ATP. A nitrificação é efectuada principalmente por dois

grupos de bactérias quimioautotróficas, largamente distribuídas pelo solo e água: um dos grupos (constituído por espécies de *Nitrosomonas*) oxida aerobicamente o amónio a nitrito, enquanto o outro grupo (*Nitrobacter*) catalisa a oxidação de nitrito a nitrato; a oxidação completa de amónio a nitrato é assim levada a cabo por membros destes dois grupos de organismos actuando em sequência (Brock & Madigan, 1991).

A oxidação do amónio a nitrito envolve duas enzimas: a primeira é monooxigenase de amónio (AMO), que insere directamente um átomo de oxigénio proveniente do O_2 no amónio produzindo hidroxilamina (NH_2OH). Como em todas as reacções de monooxigenases, são necessários dois electrões por mole de substrato para a redução do segundo átomo de oxigénio de O_2 a H_2O. Uma vez que estes dois equivalentes redutores provêm da oxidação da hidroxilamina, esta não se acumula e existe em concentrações de estado estacionário muito baixas. A AMO é irreversivelmente inactivada por acetileno, sendo também inibida por quelantes de metais, especialmente aqueles que mostram uma elevada afinidade para o cobre. Sendo uma enzima membranar extremamente lábil, ainda não foi suficientemente purificada para ser bem caracterizada. Sabe-se, contudo, que tem perfis de inibição e especificidades de substratos semelhantes às da monooxigenase membranar do metano de algumas bactérias metilotróficas, o que sugere semelhanças na estrutura do centro activo (Ferguson, 1998).

A segunda enzima envolvida na formação de nitrito é a oxidorredutase da hidroxilamina (HAO). Trata-se de uma enzima periplasmática homotrimérica, estando cada subunidade covalentemente ligada a 8 hemos (Igarashi *et al.*, 1997). Os hemos encontram-se distribuídos em cada subunidade como um agregado de 3 hemos, dois agregados de 2 hemos e um hemo magneticamente isolado (Arciero *et al.*, 1998).

1.2.3 Oxidação anaeróbica do amónio

A **ox**idação **an**aeróbica do **am**ónio (ANAMOX) é uma das reacções do ciclo do azoto descobertas mais recentemente. As bactérias que catalisam este processo

conseguem crescer em condições quimiolitoautotróficas utilizando o catião amónio como dador de electrões e o nitrito como aceitador de electrões (van de Graf *et al.*, 1998). Schalk *et al.* (1998) identificaram alguns dos produtos intermediários da reacção, entre os quais se inclui a hidrazina. Estes autores sugeriram a possibilidade do processo gerar um gradiente transmembranar de protões se a oxidação da hidrazina e a redução do nitrito ocorrerem em faces opostas da membrana. No entanto, a enzimologia do processo ainda se encontra pouco estudada.

1.3 DESNITRIFICAÇÃO

O termo "desnitrificação" foi utilizado originalmente, ainda no séc. XIX, para descrever o fenómeno de perda do azoto fixado, sendo depois mantido por Kluyver quando ele formulou o seu conceito unificador de bioenergética celular e reconheceu que a desnitrificação permite ao organismo respirar anaerobicamente (Kluyver & Donker, 1926). Na desnitrificação um óxido de azoto, em vez do oxigénio, é utilizado como aceitador de electrões de modo a gerar um gradiente electroquímico através da membrana citoplasmática. A desnitrificação encontra-se difundida em diversos ramos de Bacteria (Zumft, 1997), em Archaea (Volkl *et al.*, 1993) e até mesmo em certos fungos (Kobayashi *et al.*, 1996), sendo provável que tenha aparecido antes da separação dos três domínios na evolução (Castresana & Saraste, 1995).

Os factores que afectam os níveis de N-óxidos no meio ambiente têm uma grande interesse ecológico. Por exemplo, o óxido nitroso parece estar envolvido no processo de aquecimento global (Dickinson & Cicerone, 1986) e na destruição fotoquímica da camada de ozono na estratosfera (Crutzen, 1970). A desnitrificação constitui uma via pela qual se pode perder o azoto do solo, com implicações para a produtividade agrícola (Hauck, 1984). Além da contribuição dos nitratos para a poluição e eutrofização de águas subterrâneas (Olson, 1977), os níveis de nitrato e nitrito no meio podem também influenciar a saúde pública através de situações como a

methemoglobinémia (Levallois & Phaneuf, 1994) e alguns tipos de cancro de estômago, causado pela conversão de nitritos em compostos N-nitroso (Calmels *et al.*, 1996). O papel da desnitrificação no ciclo geoquímico do azoto e na bioenergética celular tornam pois essencial o seu estudo detalhado.

Os organismos desnitrificantes reduzem o nitrato a N_2 através de quatro enzimas dissimilatórias (as redutases do nitrato, do nitrito, do NO e do N_2O, respectivamente) que actuam em série. Em alguns organismos a última enzima não é sintetizada, sendo o produto final N_2O (Greenberg & Becker, 1977). Apesar da desnitrificação estar bastante difundida existe informação bioquímica detalhada apenas para um número relativamente restrito de organismos. O modelo actual de organização da cadeia respiratória da desnitrificação (cf. Figura 1.2) baseia-se em estudos efectuados em *Pa. denitrificans*, mas é provavelmente similar noutras bactérias, particularmente *Pseudomonas aeruginosa* e *Ps. stutzeri*. Durante o crescimento anaeróbico em condições desnitrificantes, a célula utiliza o ciclo normal dos ácidos tricarboxílicos para gerar NADH e succinato. A membrana citoplasmática contém portanto enzimas homólogas dos complexos respiratórios clássicos: complexo I (NADH-ubiquinona oxidorredutase), complexo II (succinato-ubiquinona oxidorredutase) e complexo III (ubiquinol-citocromo *c* oxidorredutase), além das redutases membranares do nitrato e do óxido nítrico. Ao contrário da redutase do nitrato, que provavelmente recebe electrões da reserva de ubiquinol, as outras três redutases da desnitrificação poderão receber electrões do complexo citocromo bc_1 através de pequenas proteínas periplasmáticas transportadoras de electrões (citocromos ou cupredoxinas). As actividades do complexo I e do complexo citocromo bc_1 resultam em translocação de protões através da membrana, e consequente formação de um gradiente electroquímico (Trumpower, 1990).

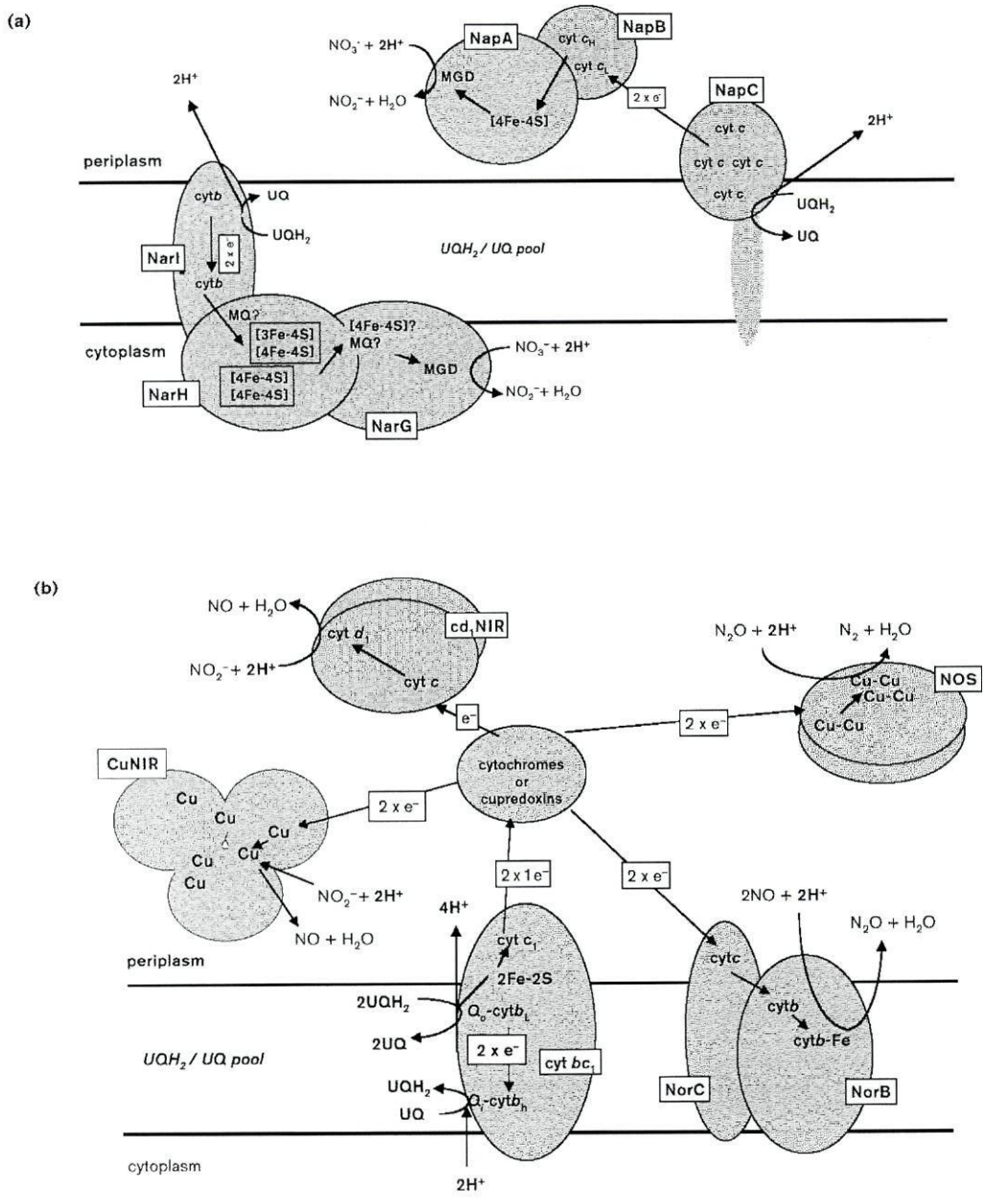
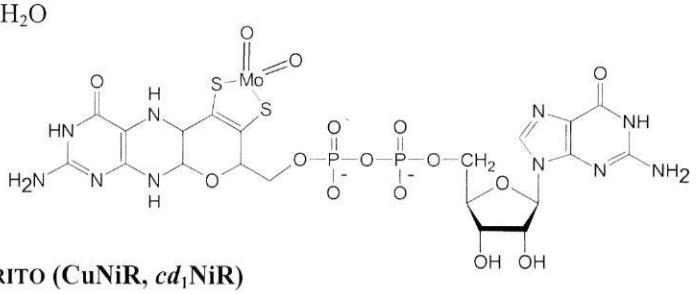


Figura 1.2 Organização estrutural das redutases bacterianas dos oxoaniões e óxidos de azoto. (a) Redutases do nitrato. NarGHI: redutase membranar do nitrato, na qual o transporte de electrões do quinol para o nitrato está acoplado à formação de um gradiente protónico através de um "loop" redox electrogénico. NapABC: redutase periplasmática do nitrato. (b) Redutases do nitrito (CuNiR e cd_1NIR), do óxido nítrico (NorBC) e do óxido nitroso (NOS). O transporte de electrões do ubiquinol para estes sistemas encontra-se muitas vezes dependente do complexo citocromo bc_1, ficando assim acoplado à geração de gradiente protónico. (Adaptado de Richardson & Watmough, 1999).

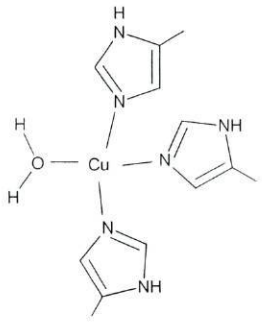
REDUTASE DO NITRATO (NaR)

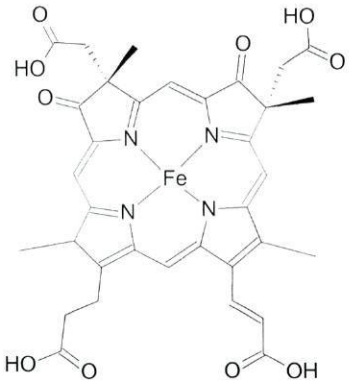
$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NO_2^- + H_2O$



REDUTASES DO NITRITO (CuNiR, cd_1NiR)

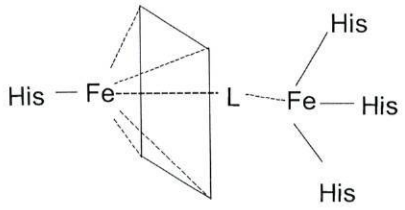
$NO_2^- + 2H^+ + 1e^- \rightarrow NO + H_2O$

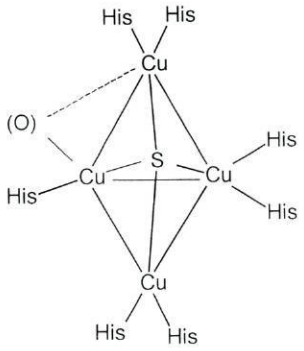




REDUTASE DO ÓXIDO NÍTRICO (NOR)

$2NO + 2H^+ + 2e^- \rightarrow N_2O + H_2O$





REDUTASE DO ÓXIDO NITROSO (N_2OR)

$N_2O + 2H^+ + 2e^- \rightarrow N_2 + H_2O$

Figura 1.3 Estruturas dos centros catalíticos das enzimas da via desnitrificante. **NaR**: cofactor de molibdopterina e guanina (Johnson *et al.*, 1990); **NiR**: T2Cu (CuNiR) (Godden *et al.*, 1991) e hemo d_1 (cd_1NiR) (Weeg-Aerssens *et al.* 1991); **NOR**: hemo *b*/Fe (Hendriks *et al.*, 1998) **N_2OR**: CuZ (Brown *et al.* 2000).

O estudo das redutases do óxido nítrico e do óxido nitroso, analisado brevemente de seguida, atrai especial atenção uma vez que estas enzimas poderão ser as proteínas ancestrais de oxidases terminais, tal como a oxidase do citocromo *c* e a oxidase do ubiquinol (Saraste & Castresana, 1994; van der Oost *et al.*, 1994). As redutases do nitrato e do nitrito, bem como as pequenas proteínas transportadoras de electrões serão analisadas com mais pormenor nas secções 1.4, 1.5 e 1.6, por serem o objecto de estudo do presente trabalho

1.3.1 Redutase do óxido nítrico

A redutase do óxido nítrico bacteriana (NOR) foi a última enzima da via desnitrificante a ser purificada (Heiss *et al.*, 1989). Trata-se de uma proteína membranar constituída por duas subunidades, uma de 53 kDa e outra de 17 kDa (Zumft *et al.*, 1994) (cf. Figura 1.2). A subunidade catalítica (53 kDa) apresenta uma elevada homologia estrutural com a subunidade catalítica da oxidase do citocromo *c* (van der Oost *et al.*, 1994): em ambas se prevê a existência de doze hélices transmembranares e ambas contêm dois hemos *b*, encontrando-se um deles acoplado a outro metal (um cobre, no caso da oxidase e um ferro não-hémico, no caso da NOR, cf. Figura 1.3). A subunidade pequena contém um hemo *c*. Estudos bioquímicos realizados em NOR de *Ps. stutzeri* solubilizada em vesículas de detergente sugerem que o dador fisiológico da enzima seja o citocromo c_{550} (Carr & Ferguson, 1990).

1.3.2 Redutase do óxido nitroso

A redutase do óxido nitroso é uma enzima periplasmática que catalisa o último passo na desnitrificação. Trata-se de uma proteína homodimérica (2×65 kDa), que contém seis átomos de cobre por monómero, organizados em dois centros: um agregado de 2 átomos de cobre, CuA, envolvido na transferência electrónica e semelhante ao encontrado na subunidade pequena da oxidase do citocromo *c* (centro binuclear de

valência mista, com 2 ligandos em ponte, μ-S^{γ}Cys) e um segundo agregado de cobre, CuZ, onde se dá a catálise (Zumft, 1997). O centro CuZ é constituído por 4 cobres dispostos num tetraedro distorcido e sete resíduos de histidina (cf. Figura 1.3). Os cobres I, II e III estão coordenados por 2 His, enquanto que o cobre IV está coordenado por 1 His apenas, pelo que constitui um possível local de ligação do substrato. Na estrutura cristalina observa-se também um enxofre em ponte entre os cobres III e IV e um ligando –OH no cobre IV, que provavelmente está a ocupar a posição do substrato (Brown *et al.*, 2000).

1.4 PEQUENAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ELECTRÕES

O periplasma das bactérias Gram-negativas contém uma grande variedade de pequenas proteínas redox, envolvidas na transferência electrónica entre complexos redox ligados à membrana, tal como o complexo citocromo bc_1, e enzimas periplasmáticas, incluindo as da desnitrificação. Estas proteínas podem agrupar-se em dois tipos: os citocromos *c* pequenos e as cupredoxinas.

Os citocromos *c* periplasmáticos envolvidos em transferências electrónicas (citocromos *c* classe I, cf. Moore & Pettigrew, 1990) são geralmente proteínas pequenas (80-120 aminoácidos) que têm um único hemo do tipo *c*, de spin baixo, coordenado por uma histidina e uma metionina e covalentemente ligado à proteína perto do seu N-terminal. Apresentam uma estrutura em α-hélice, com o grupo hemo localizado numa cavidade, em redor da qual se encontra uma região carregada positivamente, envolvida em interacções electrostáticas com os parceiros redox (Hall *et al.*, 1987).

As cupredoxinas são uma família de pequenas proteínas (≈13 kDa), que contêm um centro de cobre tipo 1 (T1Cu), envolvido na transferência electrónica com outras proteínas, e apresentam características espectroscópicas e electroquímicas especiais: absorvem intensamente na região dos 600 nm, o que lhes confere uma cor azul intensa;

em RPE, exibem um pequeno desdobramento hiperfino na zona paralela e têm um potencial de redução relativamente elevado.

O átomo de cobre tem uma esfera de coordenação assimétrica e altamente conservada entre as cupredoxinas (Huber, 1989), constituída por duas histidinas (2 N^{δ}) e uma cisteína (S^{γ}), numa estrutura trigonal plana (plano N_2S). Diferenças nos ligandos axiais permitem a classificação das cupredoxinas em três classes distintas. Nas proteínas da classe-I (por exemplo, a amicianina, a plastocianina e a pseudoazurina), o centro T1Cu contém uma metionina (S^{δ}) coordenada axialmente, sendo a geometria normalmente descrita como trigonal piramidal ou tetraédrica distorcida, conforme o ião cobre se mantém ou afasta do plano N_2S. Na classe-II, a posição axial não está ocupada por uma metionina, mas por outro aminoácido (por exemplo, a glutamina em estelocianina). A geometria do cobre na classe-III é exclusiva das azurinas: para além da metionina, as azurinas contêm um segundo ligando axial, constituído pelo oxigénio do grupo carbonilo de uma glicina, numa geometria de bipirâmide trigonal.

As cupredoxinas têm estruturas 3D semelhantes, contendo um barril-β com motivo em chave grega. Resíduos hidrofóbicos no meio das folhas-β contribuem para manter a estabilidade e rigidez da proteína, formando uma bolsa hidrofóbica (Kalverda *et al.*, 1999). Tal como com os citocromos *c*, foram definidas regiões na superfície das proteínas envolvidas nas interacções intra- e intermoleculares (Dodd *et al.*, 1998).

Os centros T1Cu têm sido estudados por diversas técnicas espectroscópicas, entre as quais ressonância paramagnética electrónica (Groeneveld *et al.*, 1987), ressonância dupla electrão-núcleo (Werst *et al.*, 1991), ESEEM (Coremans *et al.*, 1997), ressonância magnética nuclear (paramagnética) (Groeneveld *et al.*, 1988), absorção electrónica (McMillin, 1978), dicroísmo circular (Mei *et al.*, 1996), dicroísmo circular magnético (Solomon *et al.*, 1976), fluorescência (Finazzi-Agrò *et al.*, 1970), ressonância de Raman (Andrew *et al.*, 1997) e espectroscopia de absorção de raio-X (Cheung *et al.*, 2000). Consoante as características espectroscópicas apresentadas, as

proteínas da a classe-I das cupredoxinas (com um ligando axial S^{δ} (Met)) podem dividir-se em dois grupos: um ***axial*** e um ***rômbico***. Esta classificação baseou-se inicialmente em RPE, sendo depois estendida a outras espectroscopias (p. ex., UV-Vis e RR). Trata-se de uma classificação não absoluta: as características espectroscópicas dos diferentes centros T1Cu variam desde completamente axiais (p. ex., amicianina) até completamente rômbicas (p. ex., redutase verde do nitrito).

O espectro de RPE dos centros T1Cu caracteriza-se por apresentar um pequeno desdobramento hiperfino (A_z) na região g_z quando comparado com compostos de coordenação de cobre "normais" (Solomon *et al.*, 1992). O desdobramento hiperfino é causado pela interacção do electrão desemparelhado com o spin nuclear do Cu(II) (I=3/2), resultando em (2I+1=) 4 linhas de igual intensidade. O valor de A_z para os centros T1Cu é relativamente baixo devido à deslocalização do electrão desemparelhado sobre metal e ligandos, o que reduz a sua interacção com o núcleo (Shadle *et al.*, 1993). O electrão deslocalizado encontra-se deslocalizado principalmente sobre o S^{γ} da cisteína (≈40%), o que indica que a ligação Cys-Cu(II) possui bastante carácter covalente (Pierloot *et al.*, 1998).

Todas as azurinas e bastantes cupredoxinas de classe-I apresentam um espectro de RPE axial, *i.e.*, $g_x \approx g_y$ (Solomon *et al.*, 1992). No entanto, os centros de cobre coordenados por um resíduo de glutamina (classe-II) apresentam espectros rômbicos ($g_x \neq g_y$) em que A_x é suficientemente alto para ser resolvido em banda X, ao contrário do que acontece normalmente nos espectros axiais. Esta diferença poderá ser devida a uma interacção mais forte do ligando axial (Gln) com o Cu(II), embora a influência desta interacção na estrutura electrónica do cobre ainda seja matéria de debate (de Kerpel *et al.*, 1998; LaCroix *et al.*, 1998).Também se verifica que os valores de A_z nos centros de cobre classe-II são mais baixos e os valores de g_z mais elevados do que os apresentados pelos espectros axiais da classe-I.

Além dos centros classe-II, também alguns centros T1Cu classe-I, tais como os presentes nas redutases verdes do nitrito, exibem características rômbicas. Provavelmente, esta rombicidade está relacionada com a orientação da cadeia lateral R-CH_2-S-CH_3 da metionina axial relativamente ao plano N_2S (Inoue *et al.*, 1998; Dodd *et al.*, 1998). Ao contrário dos espectros rômbicos das cupredoxinas classe-II, os espectros rômbicos da classe-I apresentam um ligeiro aumento no valor de A_z e uma diminuição no valor de g_z, relativamente aos centros de cobre axiais (Kukimoto *et al.*, 1994; Solomon *et al.*, 1992).

As cupredoxinas também são conhecidas como "proteínas azuis de cobre", por apresentarem uma intensa cor azul. A absorção de luz a ≈600 nm é devida à transferência de carga do ligando para o metal Cys $S^{\gamma}\ \pi \rightarrow Cu(II)(d_{x^2-y^2})$ (Solomon *et al.*, 1992). No entanto, nem todos os centros T1Cu são azuis. Algumas redutases do nitrito são verdes, devido a uma segunda absorção intensa a ≈460 nm (Kukimoto *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1986). Também esta absorção é devida a transferência de carga da cisteína para o metal, neste caso das orbitais pseudo-sigma $CysS^{\gamma}\ \pi\sigma \rightarrow Cu(II)(d_{x^2-y^2})$ (LaCroix *et al.*, 1996; Pierloot *et al.*, 1998). Para cupredoxinas de classe-I observa-se uma correlação entre a rombicidade do espectro de RPE e a razão A_{460}/A_{600}. Esta correlação também se verifica nas azurinas, que possuem um espectro de RPE axial e uma baixa absorção a ≈460 nm. Os espectros de UV-Vis de azurinas diferem dos observados nas classes I e II na posição da absorção principal, que ocorre a ≈630 nm em vez dos habituais 600 nm.

O pH influencia de maneiras distintas a conformação de várias proteínas azuis de cobre. Nas plastocianinas a protonação de uma das histidinas coordenadas ao cobre (pK_a≈6) provoca o seu afastamento do centro metálico. A nova coordenação do cobre favorece o estado de oxidação +1, impedindo a actividade redox da proteína (Guss *et al.*, 1986). O efeito observado nas azurinas é de natureza diferente. Em *Pseudomonas aeruginosa*, verifica-se que a actividade redox da azurina com pequenas proteínas como

o citocromo c_{551} ou derivados de flavocitocromo b_2 depende do pH (Silvestrini *et al.*, 1981; Silvestrini *et al.*, 1986), não ocorrendo contudo inactivação. Esta propriedade foi relacionada com a protonação/desprotonação de um resíduo de histidina específico (His35), que não é ligando do cobre, mas se encontra na segunda esfera de coordenação do metal. A desprotonação deste resíduo provoca uma reorientação apreciável na sua cadeia lateral (Groeneveld & Canters, 1988) e subsequente reorganização da estrutura 3D da proteína, com mudanças na segunda esfera de coordenação do cobre, estudadas por RMN, EXAFS e RPE (Adman *et al.*, 1982; Canters *et al.*, 1984; Groeneveld *et al.*, 1986, 1987). Na azurina de *Alcaligenes denitrificans*, porém, a protonação da His35 só ocorre a pH muito mais baixo ($pK_a \approx 4.8$ em *Al. denitrificans vs.* $pK_a \approx 7.1$ em *Ps. aeruginosa*) e não é acompanhada pelas mudanças conformacionais observadas na azurina de *Ps. aeruginosa* (Groeneveld *et al.*, 1988). Na estrutura de ambas as azurinas a referida histidina está localizada numa cavidade, mas no caso de *Al. denitrificans* esta está isolada do solvente por uma ponte salina entre um glutamato e uma lisina. O baixo valor de pK_a da histidina neste organismo pode assim indicar que esta protonação só ocorre quando a ponte salina é quebrada por protonação do resíduo de glutamato (o glutamato tem um valor de $pK_a \approx 4.3$).

1.5 REDUTASES DO NITRITO

A redutase do nitrito é a enzima-chave das quatro redutases dissimilatórias da via desnitrificante, uma vez que é neste ponto do processo que ocorrem perdas significativas do azoto fixado, dos solos para a atmosfera. Em bactérias desnitrificantes encontram-se dois tipos de NiRs completamente diferentes, distinguíveis pelos seus grupos prostéticos: um contém citocromo cd_1 e outro contém cobre. Os dois tipos parecem ser mutuamente exclusivos, mas ambos estão presentes em estirpes distintas dos géneros *Pseudomonas* e *Alcaligenes*. A maioria das estirpes desnitrificantes estudadas possui redutases hémicas do nitrito, mas as redutases de cobre encontram-se

presentes num maior número de géneros (Coyne *et al.*, 1989). As redutases do nitrito podem ser facilmente distinguidas pelos seus perfis de inibição: a CuNiR é inibida pelo quelante de cobre dietilditiocarbamato (DDC), por CN^- e por CO, enquanto que a cd_1NiR é inibida por CN^- e não por CO (Zumft, 1997).

1.5.1 Redutase do nitrito de cobre (CuNiR)

As redutases do nitrito de cobre constituem um grupo bastante heterogéneo, especialmente no que diz respeito às suas propriedades moleculares. Todas apresentam uma estrutura quaternária trimérica e contêm dois tipos de centros de cobre, tipo 1 (T1Cu) e tipo 2 (T2Cu). Cada subunidade tem uma massa molecular de ≈40 kDa e, embora o número total de átomos de cobre encontrado em enzimas de diferentes organismos varie consideravelmente, dependendo do processo de purificação e armazenamento, em todas as estruturas cristalinas determinadas até agora têm-se encontrado seis átomos de cobre. O T1Cu tem a função de transferência electrónica enquanto que o T2Cu é o centro catalítico, onde ocorre a ligação e redução do substrato, conforme determinado por estudos espectroscópicos e de mutagénese dirigida (Zumft, 1997). As CuNiRs podem ser classificadas em dois grupos, azul e verde, consoante as propriedades espectroscópicas dos respectivos centros de cobre tipo 1 (cf. secção1.4). As redutases azuis (por ex. de *Ps. aureofaciens* ou de *Al. xylosoxidans*) exibem uma banda de absorção muito intensa a ≈590 nm e sinais de RPE com simetria axial. As redutases verdes (por ex. de *Achromobacter cycloclastes* ou de *Al. faecalis*) apresentam duas bandas de absorção intensas (≈460 e 600 nm) e sinais rômbicos de RPE.

As CuNiRs cristalizam como homotrímeros (Godden *et al.*, 1991; Kukimoto *et al.*, 1994; Dodd *et al.*, 1998), consistindo cada monómero de dois domínios com estrutura em barril-β com motivo em chave grega, semelhantes aos encontrados em cupredoxinas. Cada monómero possui um centro de cobre tipo 1 (T1Cu) no seu interior e cada interface entre subunidades possui um centro de cobre tipo 2 (T2Cu), com um

dos ligandos do cobre proveniente do monómero adjacente (cf. figura 1.4). Na NiR de *Al. xylosoxidans* GIFU 1051, os dois átomos de cobre estão situados a uma distância de 12.6 Å, directamente ligados pelos resíduos His129 e Cys130. A cadeia polipeptídica entre His89 a His94, que contém um resíduo com potencial função em catálise ácido-base (Asp92) constitui uma segunda ligação entre os dois centros de cobre.

O átomo de cobre tipo 1 está coordenado por duas histidinas (His89 $N^{\delta 1}$ e His139 $N^{\delta 1}$), uma cisteína (Cys130 S^{γ}) e uma metionina (Met144 S^{δ}) numa geometria trigonal plana distorcida (cf. centros T1Cu da classe-I, na secção 1.4). O ligando His139 encontra-se exposto ao solvente numa pequena depressão da superfície da proteína, numa localização semelhante ao resíduo His117 nas azurinas, que funciona como mediador da transferência electrónica intermolecular. Esta histidina provavelmente constitui o local de entrada dos electrões para este centro redox.

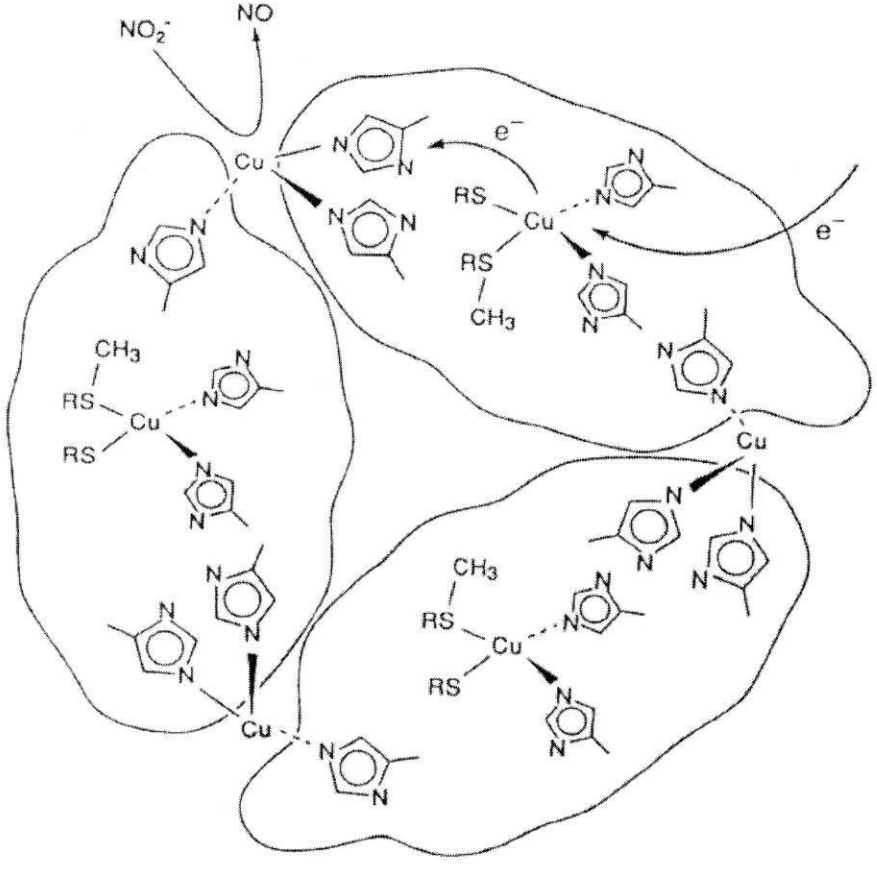


Figura 1.4 Representação esquemática da redutase do nitrito de cobre. (Adaptado de Averill, 1996)

O cobre tipo 2 (Figura 1.5) encontra-se coordenado por três resíduos de histidina, dois do domínio I (His94 e His129) e um do domínio II do monómero adjacente (HisB300). Existe também um ligando exógeno, que na forma nativa da proteína é uma molécula de solvente (água ou hidróxido). O átomo de cobre encontra-se ligeiramente deslocado do plano das histidinas, na direcção do ligando exógeno. Existem ainda dois outros resíduos potencialmente importantes neste centro, o Asp92 e a HisB249. Estudos de mutagénese dirigida com a NiR de *Al. faecalis* S-6 sugerem que ambos os resíduos estejam envolvidos no mecanismo de reacção (Boulanger *et al.*, 2000). Na estrutura nativa (Figura 1.5A) a HisB249 forma uma ligação de hidrogénio através de uma molécula de água com o Asp92, que por sua vez também forma uma ponte de hidrogénio

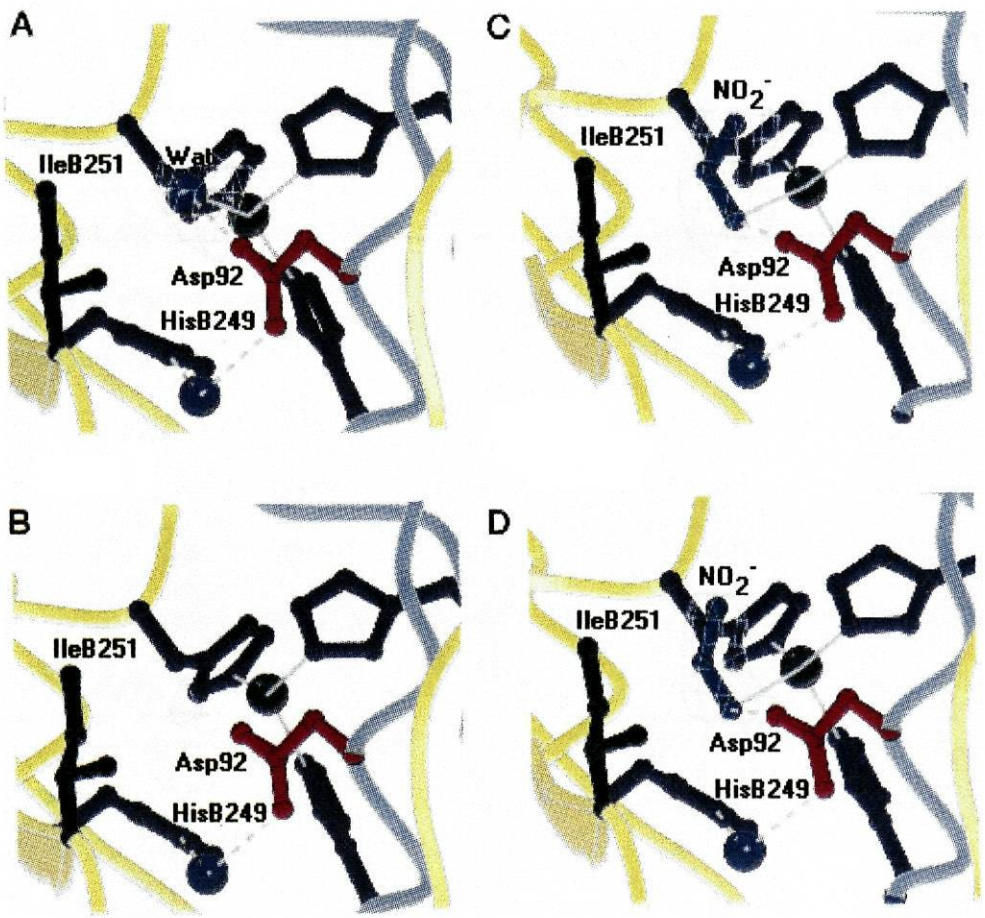


Figura 1.5 Centro activo da CuNiR nas suas formas (A) oxidada, sem substrato; (B) reduzida, sem substrato; (C) oxidada, com substrato e (D) reduzida, com substrato. (Adaptado de Murphy *et al.*, 1997)

com a água ou com o oxigénio do nitrito ligado no centro activo. Mutações nestes resíduos afectam a rede de ligações de hidrogénio no centro activo, resultando em reduções significativas da actividade enzimática.

Por redução, o centro activo perde o ligando exógeno, embora a conformação dos restantes ligandos não se modifique, o que resulta numa geometria tri-coordenada tetraédrica. A conformação dos resíduos Asp92 e HisB249 não é perturbada pela ausência do solvente coordenado (Figura 1.5B).

O nitrito coordena o cobre por um dos oxigénios, substituindo o solvente (Figura 1.5C). Este oxigénio forma uma ponte de hidrogénio com o Asp92 $O^{\delta 1}$, enquanto que o outro forma pontes de hidrogénio com duas moléculas de água. As conformações dos resíduos HisB249 e IleB251 não mudam por coordenação do substrato. O nitrito liga-se à proteína reduzida com uma orientação semelhante à encontrada na estrutura oxidada (Figura 1.5D).

As CuNiRs revelam uma certa especificidade nas suas interacções com cupredoxinas potencialmente dadoras de electrões, azurinas ou pseudoazurinas. Assim, as CuNiRs verdes revelam um fraco acoplamento com azurinas reduzidas como dadoras de electrões, as quais, pelo contrário, são dadoras de electrões efectivas para as NiRs azuis. Por análise das estruturas cristalográficas, verificou-se que os dois tipos de CuNiRs diferem bastante na distribuição de carga na sua superfície, o que pode fornecer uma explicação estrutural para as diferentes reactividades destas NiRs com pseudoazurina ou azurina como dadores de electrões, e apoia a ideia de que a transferência electrónica se processa ***via*** formação de um complexo específico proteína-proteína (Dodd *et al.*, 1998). Estudos de mutagénese dirigida em *Al. faecalis* S-6 (Kukimoto *et al.*, 1996) também apoiam esta hipótese.

Em *Ac. cycloclastes*, a transferência electrónica entre a pseudoazurina e as redutases do nitrito foi estudada por voltametria cíclica (Kohzuma *et al.*, 1993). A pseudoazurina aceita os electrões do eléctrodo, doando-os à NiR em presença de nitrito.

Nestas condições, a forma do voltamograma torna-se sigmoidal, com aumento da corrente catódica (corrente catalítica) devido à regeneração da pseudoazurina oxidada na camada de difusão junto do eléctrodo. Em *Al. xylosoxidans* GIFU 1015, porém, a resposta voltamétrica das duas azurinas do organismo mantém-se praticamente inalterada em presença da NiR e de nitrito, o que indica um processo de transferência electrónica muito lento (Suzuki *et al.*, 1999a). Estudos recentes efectuados com citocromo c_{551} parecem indicar que este poderá ser o dador de electrões da referida NiR (Deligeer *et al.*, 2000), ao contrário do que inicialmente se pensava.

O electrão fornecido pelo dador de electrões ao centro T1Cu é transferido para o centro catalítico, possivelmente através do segmento Cys130-His129. Este processo de transferência electrónica intramolecular foi estudado por radiólise de impulsos (Suzuki *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1997; Farver *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 1999). Estudos de mutagénese dirigida nos resíduos Asp92 e HisB249 mostraram que ambos controlam o processo de transferência electrónica intramolecular pela formação de uma rede de ligações de hidrogénio, podendo também estar envolvidos do fornecimento dos protões necessários à redução do substrato. Por estudo da dependência da velocidade de transferência electrónica com o pH, em presença e ausência de substrato observou-se que na ausência de nitrito a variação da velocidade de transferência electrónica com o pH é suave, mas na presença deste substrato a referida velocidade diminui abruptamente quando se aumenta o pH (Kobayashi *et al.*, 1999). Estes resultados sugerem que a ligação de nitrito à enzima provoca a quebra das pontes de hidrogénio que rodeiam o centro T2Cu. A forma desta dependência é idêntica à variação de actividade com o pH, sugerindo que o processo catalítico e a transferência electrónica intramolecular estão intimamente ligados.

No modelo actual do mecanismo catalítico da CuNiR (Figura 1.6) supõe-se que o nitrito se liga à forma oxidada do centro T2Cu, deslocando uma molécula de solvente e estabelecendo uma ponte de hidrogénio entre um dos seus átomos de oxigénio e um

resíduo de aspartato (Asp92). Após redução do centro de T2Cu com um electrão proveniente do centro T1Cu, o protão desta ponte de hidrogénio é transferido do resíduo de Asp92 para o átomo de oxigénio do substrato, dando origem a um intermediário O=N-O-H. Seguidamente a ligação N–O neste átomo de oxigénio quebra-se, formando o produto NO, cuja libertação restabelece a coordenação original do centro activo. A HisB249 poderá estar envolvida em pontes de hidrogénio adicionais, de forma a estabilizar a forma desprotonada do resíduo Asp92 (Adman *et al.*, 1995) ou o próprio intermediário O=N-O-H (Suzuki *et al.*, 2000)

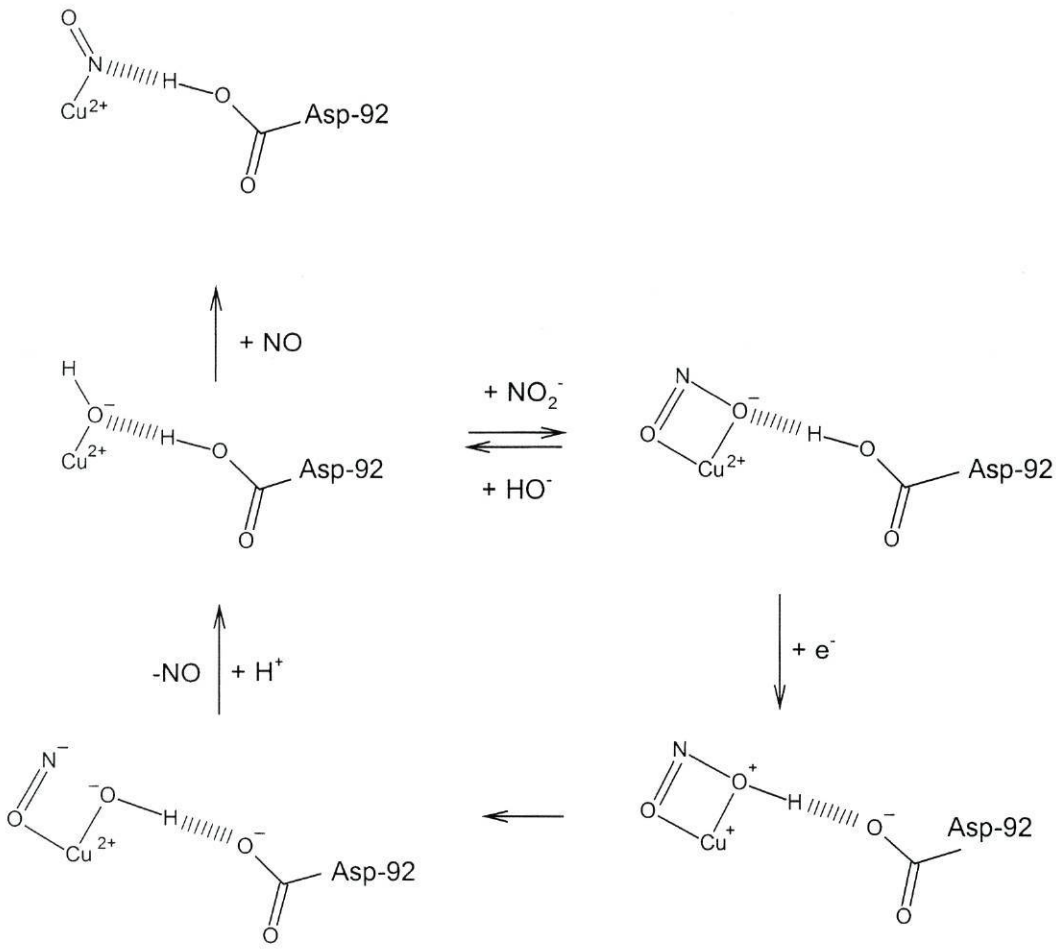


Figura 1.6 Proposta de mecanismo catalítico da CuNiR. (Adaptado de Murphy *et al.*, 1997)

1.5.2 **Redutase do nitrito di-hémica (cd_1NiR)**

O citocromo cd_1 é um homodímero periplasmático em que cada subunidade apresenta uma massa de 60 kDa, contendo como grupos prostéticos um hemo *c* e um hemo d_1, não covalentemente ligado. No espectro de UV-Vis da proteína oxidada o hemo *c* apresenta máximos de absorção a 520 e 411 nm, enquanto que o hemo d_1 exibe um 'shoulder' largo a ≈470 nm e uma banda centrada em 640 nm. Na forma reduzida, os máximos de absorção do hemo *c* aparecem a 548, 520 e 417 nm, e do hemo d_1 e 650 e 456 nm (Cutruzzolà, 1999). Por RPE detectam-se dois ferros hémicos hexacoordenados de spin baixo na forma oxidada da cd_1NiR. Por redução com ascorbato, o ferro do hemo d_1 torna-se pentacoordenado, de spin alto, enquanto que o ferro do hemo *c* permanece hexacoordenado de spin baixo (dados de RMN e MCD revistos em Zumft, 1997).

As estruturas de alta resolução obtidas para as proteínas de *Pa. denitrificans* e *Ps. aeruginosa* mostram que cada monómero está organizado em dois domínios distintos. O domínio mais pequeno contém o hemo *c*, que actua como centro de transferência electrónica aceitando os electrões da cadeia respiratória através de pequenos citocromos *c* e proteínas de cobre e transferindo-os para o hemo d_1. O hemo d_1 está localizado no domínio maior e é o local de ligação e redução do nitrito (Cutruzzolà, 1999). No estado oxidado, o hemo *c* da cd_1NiR de *Pa. denitrificans* encontra-se coordenado por 2 histidinas axiais. O hemo d_1 possui também dois ligandos axiais, um proximal, N-His, e um distal, o oxigénio proveniente de uma tirosina que se encontra apenas a 8 resíduos de distância de uma das histidinas axiais do hemo *c* (His17). A perda do ligando distal do hemo d_1 por redução provoca uma troca nos ligandos axiais do hemo *c*, de modo que a His17 é substituída por uma metionina. Pelo contrário, na forma oxidada da enzima em *Ps. aeruginosa*, o hemo *c* encontra-se coordenado por uma histidina e por uma metionina, não sofrendo alterações por redução, e o ligando distal do hemo d_1 é um ião OH^-. Após incubação com nitrito, os

cristais reduzidos de ambas as enzimas mostram o substrato ligado ao ferro do hemo d_1 através do azoto, deixando um dos oxigénios ligado por pontes de hidrogénio a duas histidinas conservadas que se encontram na bolsa distal do hemo d_1. Na presença de excesso de redutor, a cd_1NiR é inibida pela formação de um complexo estável entre o NO e a forma reduzida do hemo d_1 (Silvestrini *et al.*, 1990). Apesar de haver várias diferenças importantes na estrutura 3D da forma oxidada das enzimas de *Ps. aeruginosa* e *Pa. denitrificans*, as formas reduzida e "ligada ao produto" são bastantes semelhantes, o que pode sugerir que uma ou ambas as formas oxidadas sejam estados de repouso da enzima que não participam na catálise (cf. Figura 1.7, esquema proposto por Richardson & Watmough, 1999).

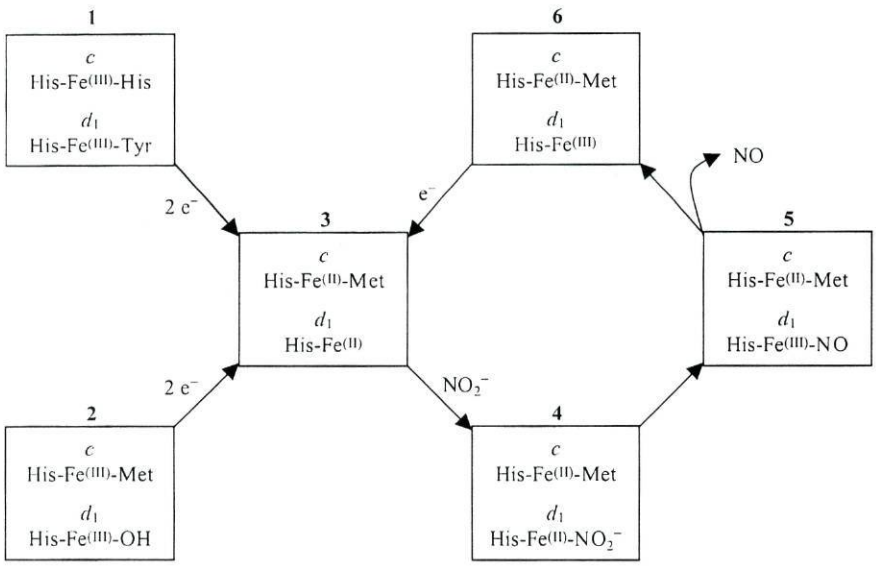


Figura 1.7 Ciclos de reacção possíveis para as cd_1NIRs de *Pa. denitrificans* e *Ps. aeruginosa*. (1) e (2) Formas nativas (oxidadas) das cd_1NIRs de *Pa. denitrificans* e *Ps. aeruginosa*, respectivamente. (3) Intermediário completamente reduzido, comum a ambas as enzimas. (4) e (5) A ligação e redução do NO_2^- é semelhante em ambas as enzimas, de acordo com dados estruturais. (6) A libertação do NO após a catálise com interrupção da transferência electrónica, de modo a impedir a inactivação da enzima é ainda matéria de investigação e debate, podendo ou não ser comum a ambas as enzimas. A formulação do ciclo de reacção deste modo sugere que as formas nativas das enzimas são apenas estados de repouso, que requerem activação por 2 electrões para poderem entrar no ciclo catalítico (esquema de Richardson & Watmough, 1999).

1.6 REDUTASES DO NITRATO

A capacidade de utilizar o nitrato como substrato respiratório encontra-se amplamente difundida em bactérias, tendo sido encontradas duas formas de redutases dissimilatórias do nitrato bioquimicamente distintas, uma periplasmática (Nap), e uma membranar (NaR) (Richardson, 2000). Estas enzimas distinguem-se pela sua localização celular, a sua estrutura oligomérica e pelo número e tipo de centros redox, embora ambas contenham um cofactor de molibdopterina, que catalisa a redução de nitrato a nitrito.

A redutase do nitrato periplasmática é uma enzima dimérica que contém normalmente dois hemos *c*, um agregado FeS e um cofactor de molibdopterina (Berks *et al.*, 1995). É expressa predominantemente em condições aeróbicas (Bell *et al.*, 1990) e está acoplada à oxidação do quinol através de um citocromo *c* tetra-hémico membranar, da família NapC quinol desidrogenase (Roldan *et al.*, 1998; Richardson & Watmough, 1999). Pensa-se que o seu papel consiste na regeneração da forma oxidada do ubiquinol, impedindo a paragem do metabolismo causada pela saturação deste aceitador de electrões, desempenhando assim um papel importante na manutenção do balanço redox da célula (Berks *et al.*, 1995).

A redutase membranar do nitrato (NaR) é expressa em condições anaeróbicas e conserva a energia livre do par QH_2/NO_3^- sob a forma de um gradiente electroquímico transmembranar. É um complexo composto por três subunidades, ancorado à face citoplasmática da membrana, com o seu centro activo localizado no compartimento citoplasmático (cf. Figura 1.8). Duas subunidades, α e β, constituem o domínio citoplasmático enquanto que a terceira subunidade, γ, constitui o domínio membranar requerido para a ligação das subunidades α e β à face citoplasmática da membrana.

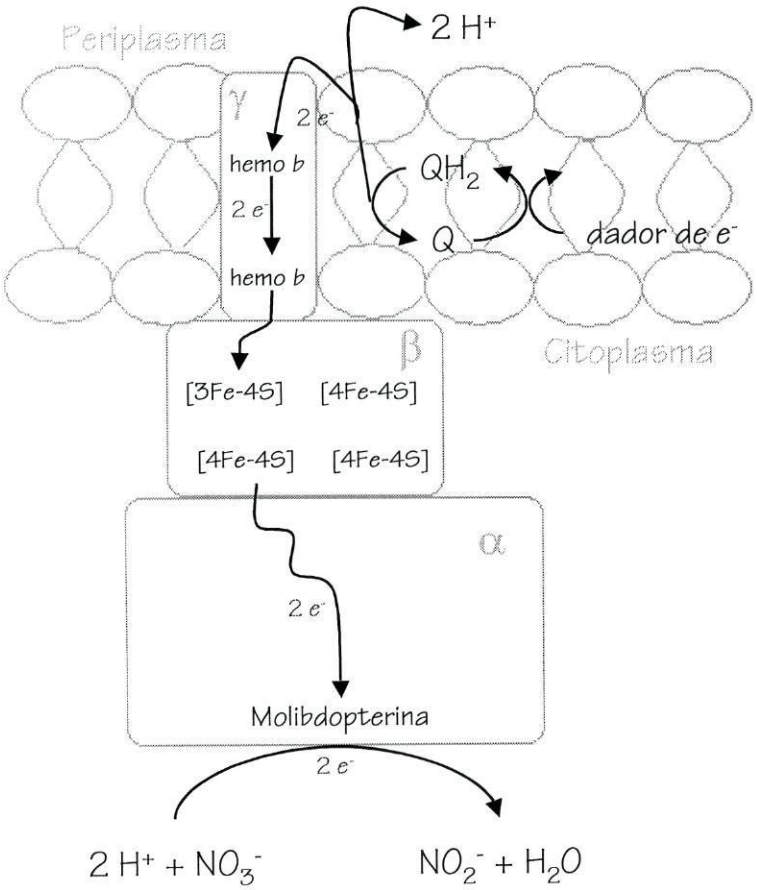


Figura 1.8 Representação esquemática da estrutura da redutase do nitrato membranar, NarGHI, de *E. coli* (adaptado de Philippot & Højberg, 1999).

A subunidade γ (19-28 kDa) é uma proteína hidrofóbica, que provavelmente adopta uma estrutura em α-hélice transmembranar. Possui dois hemos do tipo *b*, cada um deles coordenado axialmente por duas histidinas. Esta subunidade aceita os electrões da reserva de quinol e tranfere-os para a subunidade β através dos hemos, que têm potenciais de redução razoavelmente afastados (+17 mV e +122 mV, respectivamente), encontrando-se o hemo de potencial mais baixo próximo da face periplásmica da membrana e o hemo de potencial mais elevado próximo da superfície citoplasmática da mesma (Magalon *et al.*, 1997). A oxidação da reserva de quinol na face periplasmática da membrana, com libertação de 2 H^+ no compartimento periplasmático, leva à formação de um gradiente electroquímico transmembranar, que pode conduzir a formação de ATP por uma ATPase. Na ausência da subunidade γ (por ex., por

aquecimento das membranas), o complexo αβ torna-se solúvel e é activo somente na presença de dadores de electrões não fisiológicos, como por exemplo os compostos bipiridílicos (Morpeth & Boxer, 1985).

A subunidade β é uma proteína globular (43-63 kDa), que contém um agregado de [3Fe-4S] e três agregados de [4Fe-4S]. Estes centros de FeS podem ser agrupados em duas classes, consoante as suas propriedades redox: uma classe de potencial elevado, que inclui um dos centros de [4Fe-4S] (80 mV) e o centro de [3Fe-4S] (60 mV), e outra de potencial baixo, que inclui os restantes centros de [4Fe-4S] (–200 mV e –400 mV). Sendo o dador de electrões uma menaquinona de potencial –80 mV (Morpeth & Boxer, 1985), apenas os centros de potencial elevado serão capazes de transferir electrões para o centro catalítico. A mutação de alguns resíduos de cisteína envolvidos na coordenação dos agregados de baixo potencial impede a incorporação de todos os centros metálicos da subunidade β (Augier *et al.*, 1993; Guigliarelli *et al.*, 1996) sugerindo que estes centros (ou as cisteínas envolvidas na sua coordenação) desempenham um papel importante na manutenção da estrutura e/ou no enrolamento correcto da proteína.

A subunidade α (104-150 kDa) possui um átomo de molibdénio associado a um dinucleótido de molibdopterina e guanina, que constitui o centro catalítico, e possivelmente um agregado de [4Fe-4S]. O molibdénio pode existir em três estados de oxidação, Mo(IV), Mo(V) e Mo(VI), sendo os potenciais redox dos pares Mo(VI)/Mo(V) e Mo(V)/Mo(IV), respectivamente +220 e +180 mV, a pH 7 (Philippot & Højberg, 1999). Estudos espectroscópicos mostraram que consoante o pH, o centro de Mo(V) pode existir em duas formas, que formam um par conjugado ácido/base (Vincent & Bray, 1978). A forma de pH baixo apresenta um desdobramento devido a um protão fortemente acoplado ao átomo de molibdénio (George *et al.*, 1985), possivelmente de um grupo OH. Também na forma de pH alto existe um protão acoplado, embora neste caso o desdobramento não se encontre resolvido em banda X: a sua constante de acoplamento é bastante mais fraca, pelo que provoca apenas

alargamento do sinal. Este protão foi atribuído a um grupo –NH(R) (George *et al.*, 1989). Ambas as formas parecem estar envolvidas no ciclo catalítico e a transição entre elas pode fornecer um dos protões necessários para a redução do nitrato (Magalon *et al.*, 1998). O segundo H^+ poderá ser fornecido por um resíduo protonável situado na vizinhança do cofactor de molibdénio. A transição entre as duas formas parece ser devida à protonação da proteína (George et al., 1989). A mutação de um resíduo de histidina bastante conservado perturba o pK da transição, sugerindo o seu envolvimento directo ou indirecto no processo (Magalon *et al.*, 1998). Este resíduo de histidina faz também parte de uma sequência muito conservada de aminoácidos, que em redutases periplásmicas do nitrato parece poder coordenar um agregado de FeS. Este agregado não se encontra presente na redutase membranar de *E. coli*, e está provavelmente ausente também das outras redutases membranares do nitrato (Magalon *et al.*, 1998). O papel do cofactor de pterina encontra-se ainda em investigação: a pterina poderá mediar a transferência electrónica do centro de molibdénio para outro centro redox sem que haja mudanças no seu estado redox durante a catálise. Poderá também estar envolvido na modulação do potencial de redução do centro de molibdénio (Berks *et al.*, 1995).

A *Ps. chlororaphis* é um bastonete aeróbico facultativo, Gram-negativo, saprofítico, que produz clororafina (pigmento verde, não fluorescente) e apresenta tempos de duplicação curtos (Palleroni, 1984). É um organismo capaz de crescer em condições anaeróbicas, em presença de nitrato, truncando a desnitrificação em N_2O (Greenberg & Becker, 1977). Ao contrário de outras espécies de *Pseudomonas* (*Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*) a *Ps. chlororaphis* encontra-se pouco estudada quer a nível molecular, quer biotecnológico. Todas estas características lhe conferem um interesse potencial inegável, que contribuiu de forma decisiva na escolha deste sistema biológico para proceder ao isolamento e caracterização de diversas proteínas envolvidas na via desnitrificante.

2

DESNITRIFICAÇÃO EM ESTIRPES FLUORESCENTES DE *PSEUDOMONAS*

2.1 DESNITRIFICAÇÃO E *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS*

Stanier *et al.* (1966) mostraram que existe uma série de *Pseudomonas* anaeróbicas facultativas que só consegue crescer anaerobicamente se existir nitrato disponível no meio. Em alguns casos, este crescimento é acompanhado de libertação abundante de gás. Greenberg & Becker (1977) confirmaram estes resultados e demonstraram ainda que culturas de várias estirpes de *Ps. fluorescens* e *Ps. chlororaphis* produzem N_2O como único produto gasoso da redução, enquanto outras estirpes produzem N_2. A formação de bolhas de gás não era observada durante o crescimento anaeróbico das estirpes que produzem N_2O, enquanto que era frequentemente observada nos crescimentos das estirpes que produzem N_2. Esta diferença é devida à elevada solubilidade do N_2O em água.

Uma das estirpes que truncam a desnitrificação em N_2O é *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T (ou B-560). A *Ps. chlororaphis* é um bastonete aeróbico Gram-negativo, saprofítico, que produz um pigmento verde, não fluorescente — a clororafina (Palleroni, 1984). Ao contrário de outras espécies de *Pseudomonas* (*Ps. aeruginosa, Ps. fluorescens*) a *Ps. chlororaphis* encontra-se menos estudada quer a nível molecular, quer biotecnológico. O restrito número de proteínas isoladas desta espécie inclui uma ferribactina (Taraz *et al.*, 2000), uma lipase extracelular (Stern & Howard, 2000), porinas induzidas por glucose (Adewoye *et al.*, 1998), uma hidratase do nitrilo (Nagasawa *et al.*, 1987; Nishiyama *et al.*, 1991) e uma dioxigenase do 1,2-clorocatecol (Potrawfke *et al.*, 2001). Esta dioxigenase apresenta características bastante diferentes das isoladas de outros organismos, o que lhe permite degradar um espectro significativamente mais alargado de substratos, incluindo o 1,2,3,4-tetraclorobenzeno (Potrawfke *et al.*, 1998), um poluente bastante resistente à biodegradação e que normalmente só consegue ser degradado por consórcios microbianos. A presença da hidratase do nitrilo foi utilizada no desenvolvimento de um novo processo biocatalítico de hidratação do adiponitrilo a 5-ciaovaleramida, que apresenta elevada

regiosselectividade e um maior rendimento do que os processos químicos alternativos (Hann *et al.*, 1999). A escassa informação disponível apresenta-nos, assim, um microorganismo com bastante interesse bioquímico e biotecnológico.

Conforme já foi referido, a *Ps. chlororaphis* B-560 é capaz de crescer em condições anaeróbicas, em presença de nitrato, condições em que exibe um crescimento monofásico, com produção de gás durante a fase logarítmica (Greenberg & Becker, 1977). O facto de truncar a desnitrificação em N_2O reveste o seu estudo de particular importância em termos ecológicos, pois este contribui activamente para o efeito de estufa na troposfera (Dickinson & Cicerone, 1986), podendo também contribuir para a destruição fotoquímica da camada de ozono na estratosfera, através da produção de NO (Crutzen, 1970). Além disso, quando crescida em TSBYE, a *Ps. chlororaphis* B-560 tem tempos de duplicação curtos: 1h30min, em condições aeróbicas, e 2h30min, em condições anaeróbicas (Greenberg & Becker, 1977).

As características referidas levaram à escolha deste microorganismo para o estudo de proteínas da via metabólica de desnitrificação.

2.2 CRESCIMENTO DE *PS. CHLORORAPHIS* DSM 50083^T

A estirpe de *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T foi crescida conforme descrito na secção experimental, em presença de 12 mM de nitrato. A bactéria apresentou tempos de duplicação de 1h 5min e 4h 15min, respectivamente em condições aeróbicas e microaeróbicas. Comparando estes valores com os obtidos por Greenberg & Becker, é notória uma menor capacidade de resposta em condições desnitrificantes. Uma possível explicação é a diferença de meios de crescimento: Greenberg & Becker usaram um meio complexo complementado com 30 mM de nitrato, enquanto neste trabalho se usou um meio definido, mais pobre mas mais reprodutível (cf. secção 7.2) e uma menor concentração de nitrato disponível. Durante a desnitrificação, tal como no crescimento descrito na literatura, não ocorreu libertação visível de bolhas de gás, o que indicia uma

desnitrificação truncada em N_2O. Durante a fase exponencial de crescimento, a quantidade de nitrato diminuiu até se esgotar, ocorrendo uma concomitante formação de nitrito, ausente no início do crescimento, que rapidamente foi também consumido. Este comportamento sugere uma passagem sequencial das condições aeróbicas para as anaeróbicas, com expressão sucessiva das diversas enzimas envolvidas na via da desnitrificação (Aida *et al*, 1986).

Ensaios enzimáticos preliminares em extractos celulares do microorganismo (actividades de redutase do nitrato, NaR, e redutase do nitrito, NiR), em presença de alguns inibidores sugerem a existência de uma redutase do nitrito sensível ao quelante de cobre dietilditiocarbamato, DDC, e insensível ao cianeto e à azida. Os ensaios enzimáticos revelaram também que a NaR desta estirpe é inibida por azida, o que sugere que se trata de uma proteína membranar, uma vez que as redutases periplásmicas do nitrato são insensíveis a esta substância (Bell *et al.*, 1990; McEwan *et al.*, 1984).

Quando se tentou fazer um crescimento em grande escala, para obtenção de biomassa, verificaram-se diferenças no comportamento da estirpe, que provocaram um deficiente crescimento e reduzida desnitrificação. A quantidade de nitrito no meio aumentou durante a fase exponencial, de acordo com os resultados obtidos nos crescimentos em pequena escala; contudo não se obteve o esperado decréscimo de nitrito no fim da fase exponencial, pelo que se procedeu imediatamente à colheita por centrifugação, a 4 °C. Obteve-se um rendimento celular de ≈0.6 g peso húmido de células/L de meio (nos crescimentos pequenos obtinha-se normalmente rendimentos de pelo menos 2 g/L), e uma fraca expressão da via desnitrificante. Estas problemas são comuns nas passagens de pequena para grande escala, e solucioná-los implica fazer uma passagem gradual para volumes maiores, ter um conhecimento bastante sólido da estirpe e fazer uma monitorização contínua de vários parâmetros durante o crescimento em larga escala, por forma a poder agir a tempo de salvar a fermentação, caso surjam problemas.

Apesar destas dificuldades, o extracto celular obtido possibilitou o isolamento de uma azurina (cf. capítulo 3) e de uma redutase do nitrito (cf. capítulo 4). O extracto apresentava uma cor avermelhada, o que indica uma abundância de metaloproteínas. De facto, durante o isolamento, foram também detectadas, por espectroscopia de UV-vis, várias fracções contendo citocromos e flavoproteínas.

2.3 SELECÇÃO DE OUTRAS ESTIRPES ADEQUADAS À PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DESNITRIFICANTE

Como já se viu, o estudo das proteínas da via desnitrificante num dado microorganismo requer que este obedeça a duas condições fundamentais: primeiro, que haja expressão das proteínas em causa, *i.e.*, que o organismo cresça em condições que favorecem a desnitrificação e, segundo, que o organismo seja facilmente cultivável, permitindo assim a obtenção de biomassa. Com vista à escolha de novas estirpes fluorescentes de *Pseudomonas* com as características referidas, foram escolhidas quatro estirpes com potencial actividade desnitrificante, taxonomicamente próximas daquela já estudada, as *Ps. clororaphis* DSM 50082, DSM 50135 e DSM 50139, bem como a *Ps. fluorescens* DSM 6607.

Para seleccionar as estirpes mais promissoras entre as escolhidas, realizaram-se crescimentos preliminares em condições microaeróbicas na presença de 15 mM de nitrato, tendo-se obtido os resultados apresentados na Tabela 2.1. A avaliação das estirpes baseou-se nos rendimentos celulares (medidos através da turbidez do meio de crescimento), no aspecto das células e no desaparecimento sequencial do nitrato e nitrito no meio de crescimento. Como termo de comparação, incluem-se os resultados do crescimento da estirpe DSM 50083^T, em condições de crescimento semelhantes.

Duas estirpes de *Ps. chlororaphis*, DSM 50082 e 50139, têm uma baixa produção de biomassa, e foram por isso preteridas. As estirpes *Ps. fluorescens* DSM 6607 e *Ps. chlororaphis* DSM 50135 proporcionam uma boa produção de biomassa e

esgotam completamente o nitrato e o nitrito no meio de crescimento, tendo uma melhor capacidade desnitrificativa do que a estirpe DSM 50083^T. Como, porém, se encontraram dificuldades com as pré-culturas da estirpe de *Ps. fluorescens*, que apresentam tempos de reanimação muito longos, optou-se por prosseguir os estudos com a estirpe de *Ps. chlororaphis* 50135.

Tabela 2.1 Resultados dos crescimentos de estirpes de P*seudomonas* fluorescentes com potencial actividade desnitrificante, seleccionadas da colecção da DSMZ.

Estirpe DSMZ	Absorvância final (660 nm)	Observação ao Microscópio Óptico de Contraste de Fase	Desnitrificação
50083^T	0.441	bastonetes médios, activas	+ +
50082	0.335	bastonetes longos, aglomerados	+
50135	0.513	bastonetes grossos, muito activas	+ + +
50139	0.226	bastonetes grossos, cadeias longas	–
6607	0.439	bastonetes médios	+ + +

Notas: Estes crescimentos foram efectuados a 28 °C, com agitação orbital, em frascos fechados de 100 mL com septos de borracha, em 75 mL de meio de cultura; concentração inicial de nitrato: 15 mM. As células foram colhidas após 30 h de crescimento, ainda durante a fase exponencial.

2.4 CRESCIMENTOS DE *PS. CHLORORAPHIS* DSM 50135

2.4.1 Crescimentos à escala laboratorial

A fim de conhecer melhor o comportamento da estirpe, por forma a minimizar os problemas na passagem para larga escala e melhorar o binómio produção de biomassa – desnitrificação, realizou-se uma série de crescimentos da estirpe, em diversas condições e vários volumes, antes de usar o fermentador de 500 L. Efectuaram-se também

medições de actividades enzimáticas da via desnitrificante (NaR e NiR), em presença e ausência de inibidores e substratos análogos.

O crescimento foi efectuado conforme descrito na secção experimental, em presença de 35 mM de nitrato. Apresentou tempos de duplicação de 1h 10min e 4h 40min, respectivamente em condições aeróbicas e desnitrificantes. Estes valores são idênticos aos obtidos para a estirpe DSM 50083^T. Também não ocorreu libertação visível de bolhas de gás, o que sugere uma desnitrificação truncada em N_2O, tal como na estirpe tipo de *Ps. chlororaphis*. Na Figura 2.1 apresenta-se uma curva típica dum crescimento de 2 L da estirpe, obtida numa fase intermédia da optimização das condições experimentais.

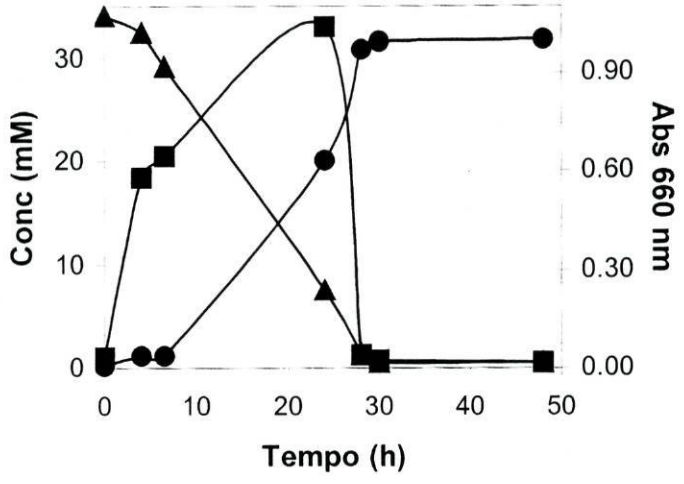


Figura 2.1 Curva de crescimento típica de *Ps. chlororaphis* DSM 50135. Os crescimentos foram efectuados a 28 °C, com agitação com barra magnética, em frascos fechados de 2.5 L com septos de borracha, utilizando 2 L de meio de cultura; concentração inicial de nitrato: 35 mM. Rendimento celular: 2.1 g/L. (■) concentração de nitrito (×50), (▲) concentração de nitrato, (●) absorvância a 660 nm.

Durante a fase exponencial de crescimento, verificou-se um consumo de nitrato e produção de nitrito, embora em nenhuma fase do crescimento se tenha verificado acumulação significativa de nitrito no meio, uma vez que a quantidade máxima de nitrito medido corresponde apenas a ≈2% da quantidade estequiométrica de nitrato

inicial. Ao esgotamento do nitrato disponível seguiu-se o esgotamento do nitrito e uma paragem do crescimento do microrganismo (fim da fase exponencial). Isto sugeriu que o nitrato fosse um factor limitante no crescimento, pelo que se experimentou-se então aumentar a sua inicial no meio, de modo a prolongar a fase exponencial do crescimento e obter uma maior quantidade final de biomassa.

2.4.1.1 Influência da concentração inicial de nitrato no crescimento e desnitrificação de DSM 50135

Tal como na selecção de estirpes para estudo, o critério de escolha das condições de crescimento baseou-se na dualidade obtenção de biomassa – expressão da via desnitrificante. Experimentaram-se duas concentrações iniciais de nitrato no meio de crescimento: 35 e 70 mM. Para evitar uma possível toxicidade provocada por excesso de nitrato ou acumulação dos seus produtos, experimentou-se também um crescimento com duas adições de 35 mM de nitrato, num total de 70 mM.

Os resultados dos crescimentos são apresentados na Figura 2.2 e Tabela 2.2. A produção de biomassa no crescimento em presença de 35 mM de nitrato inicial é inferior à obtida nos outros crescimentos. No crescimento com 70 mM, apesar de haver uma boa produção de biomassa, apresenta uma menor expressão da via desnitrificante (cf. Figura 2.2, em que é evidente a acumulação de nitrito no meio). A adição de nitrato imediatamente após o esgotamento do nitrato inicial constitui um bom compromisso, pois prolonga a fase exponencial de crescimento, permitindo uma elevada produção de biomassa, e mantém altos os níveis de expressão das redutases do nitrato e do nitrito.

No entanto, uma vez que a adição de soluções ao fermentador no meio de um crescimento constitui um risco agravado de contaminação optou-se pela utilização de uma quantidade inicial de 53 mM de nitrato no crescimento em larga escala (300 L), a fim de aumentar a produção de biomassa sem problemas de toxicidade nem repressão da redutase do nitrito.

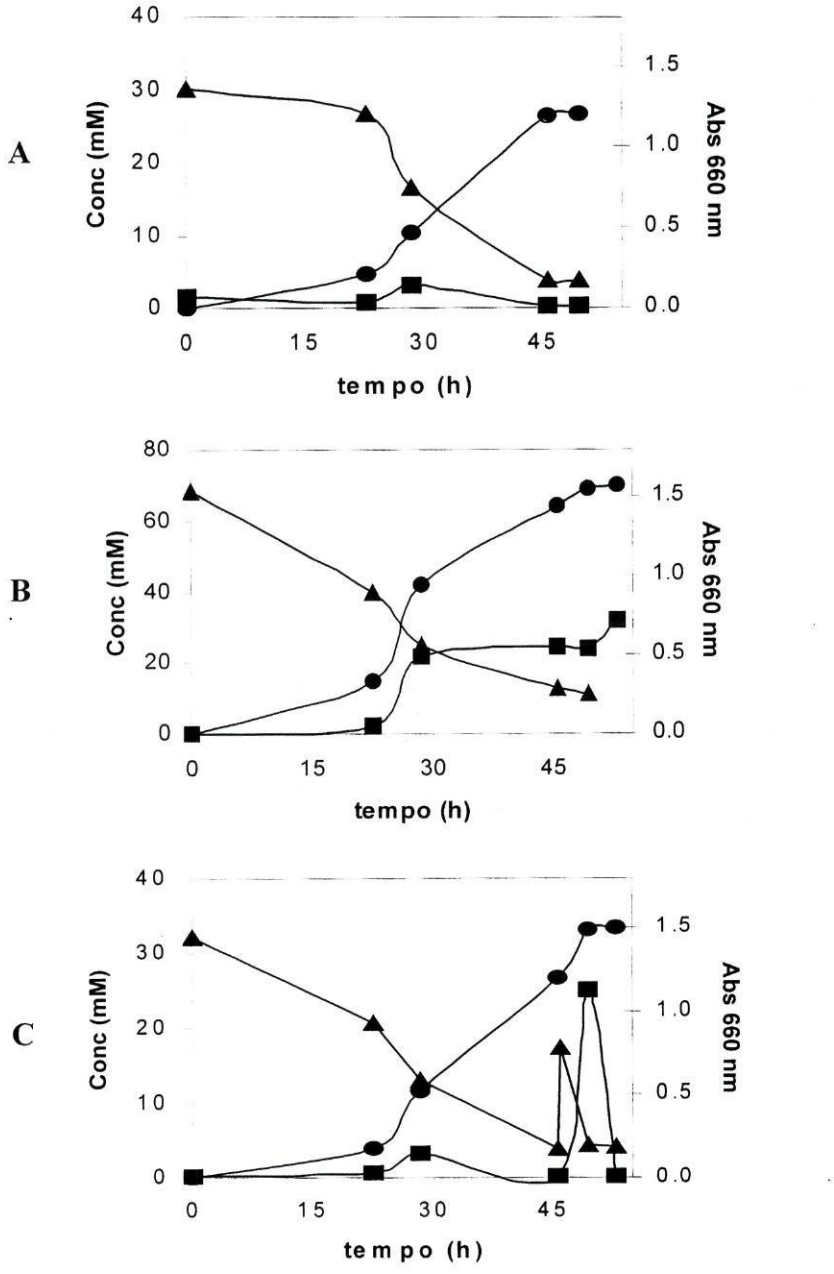


Figura 2.2 Estudo da influência da concentração inicial de nitrato no crescimento de *Ps. chlororaphis* DSM 50135. Os crescimentos foram efectuados a 28 °C, com agitação com barra magnética, em frascos fechados de 600 mL com septos de borracha, utilizando 500 mL de meio de cultura; concentração inicial de nitrato: (A) e (C) 35 mM, (B) 70 mM; em (C) adicionaram-se 35 mM de nitrato após esgotamento do nitrato inicial. (■) concentração de nitrito (×30), (▲) concentração de nitrato, (●) absorvância a 660 nm.

Tabela 2.2 Rendimentos celulares e actividades enzimáticas em crescimentos de *Ps chlororaphis* DSM 50135 com diferentes quantidades iniciais de nitrato.

Concentração inicial de nitrato (mM)	Rendimento celular (A_{660})	Actividade NaR [a] (U [b]/mL de meio)	Actividade NiR [a] (U [c]/mL de meio)
35	1.20	0.462	2.83
70	1.57	0.260	1.26
35 + 35	1.51	0.448	2.23

[a] As actividades foram determinadas em extractos totais, usando o ditionito/BV como dador de electrões. As condições experimentais estão indicadas na legenda da Figura 2.2; [b] 1 U=1 μmol NO_2^- min^{-1}; [c] 1 U=1 μmol NO min^{-1}

2.4.1.2 Ensaios enzimáticos em esferoplastos e extractos periplasmáticos

As actividades enzimáticas detectáveis nas células, a sua localização em esferoplastos ou extractos periplasmáticos bem como os comportamentos observados em presença de inibidores, de quelantes ou de diferentes substratos fornecem indicações sobre o tipo de enzimas existentes no organismo. A análise comparativa das actividades das enzimas do organismo em estudo com as de outros organismos permite ainda avaliar o nível de expressão das enzimas, de modo a seleccionar as condições de crescimento mais adequadas.

Conforme referido na secção experimental, nestes ensaios utilizaram-se dois dadores artificiais de electrões: o metilviologénio, MV, e o benzilviologénio, BV. Porém, como se observou uma apreciável oxidação directa do MV^+ pelo nitrito, este composto não foi utilizado para efectuar estudos cinéticos com a NiR.

Realizaram-se ensaios enzimáticos na fracção periplasmática (Tabela 2.3) e nos esferoplastos (Tabela 2.4) de células crescidas em condições desnitrificantes, conforme descrito na secção experimental.

Tabela 2.3 Actividades enzimáticas de NaR e NiR determinadas no periplasma de *Ps. chlororaphis* DSM 50135.

enzima	viologénio	substrato	actividade (U [a]/g célula)
NaR	MV	nitrato	6
		clorato	12
NiR	BV	nitrito	534

[a] 1 U=1 μmol NO_2^- ou NO min^{-1}

Tabela 2.4 Actividades enzimáticas de NaR e NiR determinadas em esferoplastos de *Ps. chlororaphis* DSM 50135.

enzima	viologénio	substrato	actividade (U [a]/g célula)
NaR	BV	nitrato	58
		clorato	104
	MV	nitrato	41
		clorato	74
NiR	BV	nitrito	20

[a] 1 U=1 μmol NO_2^- ou NO min^{-1}

Os valores descritos na literatura (cf. Tabela 2.5 e Tabela 2.6) referem-se principalmente a actividades específicas em extractos celulares ou membranas, por unidade de massa de proteína total. Sabendo que ≈10% da biomassa de *Ps. chlororaphis* crescida nas referidas condições é proteína (resultados obtidos no crescimento à escala piloto), pode fazer-se uma estimativa grosseira dos valores de actividade específica no sistema em estudo, de modo a poder comparar os valores obtidos com os da literatura.

A actividade específica obtida para a NaR é da mesma ordem de grandeza das medidas em *Ps. stutzeri*, *Bacillus halodenitrificans* e *Haloferax denitrificans* e uma ordem de grandeza superior à medida em *Ps. aeruginosa*. Os valores relativos à actividade de NiR são da mesma ordem de grandeza dos obtidos em *Achromobacter*

cycloclastes e *Fusarium oxysporum* e duas ordens de grandeza superiores aos obtidos em *Alcaligenes xylosoxidans* NCBI 11015. Estes resultados permitem confirmar que as condições de crescimento utilizadas são claramente adequadas à expressão das enzimas da via desnitrificante.

Tabela 2.5 Actividades das redutases do nitrato presentes em extractos membranares de alguns organismos desnitrificantes.

Organismo	Actividade (U [a]/mg de proteína) (dador de electrões)
Ps. chlororaphis [b]	0.6 (ditionito/BV)
Ps. stutzeri [c]	1.14 (ditionito/MV)
Ps. aeruginosa [d]	0.065 (ditionito//BV)
Bacillus halodenitrificans [e]	0.27 (ditionito/MV)
Haloferax denitrificans [f]	0.34 (ditionito/MV)

[a] 1 U=1 μmol NO_2^- min^{-1}; [b] valor aproximado calculado supondo que 10% da massa celular é proteína; [c] Blümle & Zumft, 1991; [d] Carlson *et al.*, 1982; [e] Ketchum *et al.*, 1991; [f] Hochstein & Lang, 1991

Tabela 2.6 Actividades das redutases do nitrito presentes em extractos solúveis de alguns organismos desnitrificantes.

Organismo	Actividades (U [a]/mg de proteína) (dador de electrões)
Ps. chlororaphis [b]	5 (ditionito/BV)
Achromobacter cycloclastes [c]	1.3 (ascorbato/PMS)
Fusarium oxysporum [d]	1.2 (NADH/PMS)
Alcaligenes xylosoxidans [e]	0.084 (ditionito/MV)

[a] 1 U=1 μmol NO min^{-1}; [b] valor aproximado calculado supondo que 10% da massa celular é proteína; [c] Iwasaki *et al.*, 1975; [d] Kobayashi & Shoun, 1995; [e] Masuko *et al.*, 1984

A actividade de NiR aparece principalmente na fracção periplasmática, enquanto que a actividade da NaR se localiza fundamentalmente nos esferoplastos. Estas observações sugerem uma localização periplasmática para a NiR e membranar para a NaR, situação já descrita na literatura (Berks *et al.*, 1995). Verifica-se também que a NaR pode catalisar a redução quer do nitrato quer do clorato, característica já descrita na literatura e atribuída à enzima membranar, que reduz clorato a uma taxa normalmente superior à do nitrato (Bell *et al.*, 1990).

Os resultados da acção dos inibidores e quelantes sobre estas enzimas são apresentados na Tabela 2.7. Estes dados permitem-nos concluir que a NiR periplasmática contém cobre no seu centro activo, pois é inibida pelo quelante de cobre DDC (Shapleigh & Payne, 1985) e por cianeto (Denariaz et al.,1991). A NaR é inibida por azida, tanto na redução de nitrato como de clorato, observando-se igual eficiência de inibição utilizando quer o metilviologénio, quer o benzilviologénio. Nem o DDC nem o cianeto inibem a NaR. Estes resultados vêm corroborar a hipótese de se tratar de uma enzima membranar (Berks *et al.*, 1995), hipótese que foi confirmada por isolamento da enzima a partir da membrana do organismo (cf. capítulo 5).

Tabela 2.7 Inibição das actividades enzimáticas de NaR e NiR em extractos de *Ps. chlororaphis* DSM 50135, por acção de bases de Lewis e quelantes.

inibidor [a]	**NiR**	**NaR**
azida	13%	93%
DDC [b]	72%	*não inibe*
cianeto	99%	*não inibe*

[a] utilizaram-se concentrações finais de 500 μM;
[b] DDC, dietilditiocarbamato.

Os resultados das medições de actividade de NaR-BV e NaR-MV realizados em esferoplastos, porém, sugerem uma localização periplasmática para a referida enzima. Segundo Jones & Garland (1977) as membranas biológicas são permeáveis ao benzilviologénio mas não ao metilviologénio. Sendo a NaR uma proteína membranar voltada para o citoplasma, o valor de actividade NaR com BV deverá ser bastante superior ao de NaR com MV, desde que a membrana citoplasmática esteja intacta. Contudo, a razão das actividades com BV é apenas cerca de 1.4 vezes superior às medidas com MV, o que revela um igual acesso à enzima por parte de ambos os dadores de electrões e é, por isso, característico de NaRs periplasmáticas. Esta aparente contradição poderá ser devida ao método de choque osmótico utilizado para libertar as proteínas periplasmáticas causar a extrusão parcial da NaR (Beacham, 1979).

2.4.2 Crescimento à escala piloto

O crescimento à escala piloto de DSM 50135 (Figura 2.3) foi realizado nas condições descritas na secção experimental. Obteve-se um rendimento celular de 1.7 g peso húmido/L de meio de crescimento. A pasta celular colhida apresentava uma intensa cor avermelhada, indício claro de abundante expressão de metaloproteínas. Segue-se uma descrição breve do crescimento e alguns problemas que surgiram e se ultrapassaram.

O crescimento teve uma fase de arranque muito longa (32h), provavelmente devido à passagem precoce para condições anaeróbicas (fluxo de azoto). Só após a reposição do oxigénio deficitário (e manutenção de algum oxigénio na fase gasosa do fermentador) teve início a fase exponencial de crescimento. Um comportamento semelhante encontra-se descrito na literatura (Aida *et al*, 1986) para *Pseudomonas* sp. G59. Aparentemente, nesta estirpe, o arranque inicial do crescimento requer condições aeróbicas, mesmo em presença de nitrato. O atraso no início do crescimento pode também ser devido ao facto de o inóculo aeróbico utilizado não possuir ainda a

maquinaria enzimática para respirar o nitrato, facto que poderia ser ultrapassado se se usasse um inóculo anaeróbico.

Ultrapassada a fase de arranque, conforme se pode verificar na Figura 2.3, a par do crescimento exponencial houve consumo de nitrato e ácido e a concomitante produção de nitrito. Após o início da fase estacionária, a concentração de nitrato manteve-se num nível baixo, sem ocorrer esgotamento deste ião. Manteve-se um consumo constante de ácido e a concentração de nitrito baixou até se anular. Note-se que a quantidade máxima de nitrito observada em solução foi de apenas 5% da quantidade inicial de nitrato. As variações observadas nas concentrações de nitrato e nitrito em solução sugerem uma expressão sequencial das várias enzimas da via de desnitrificação, conforme observado em *Pseudomonas* sp. G59 (Aida *et al*, 1986). O consumo exponencial de ácido durante o crescimento explica-se pelo facto de a desnitrificação implicar consumo de H^+ (cf. equações da redução dos óxidos de azoto na Figura 1.3, Capítulo 1)

Uma das maiores dificuldades na passagem de volumes pequenos para volumes grandes é a agitação do meio e, efectivamente, a agitação utilizada revelou-se insuficiente, pois não permitiu o conveniente arejamento do meio de cultura nem manteve todas as células em suspensão. No fim da colheita das células, verificou-se que havia ainda bastante biomassa no fundo do fermentador, abaixo do nível da saída de colheita. Este problema é bastante comum, mas pôde ser facilmente resolvido por adição de uma solução salina (0.9% NaCl) para ressuspender e colher as células depositadas.

A análise da fase gasosa do fermentador por espectroscopia de massa permitiu esclarecer melhor alguns aspectos do crescimento, concretamente obter informações sobre os produtos finais da desnitrificação no organismo em estudo. Analisou-se a variação ao longo do tempo dos seguintes gases: azoto, árgon, oxigénio e dióxido de carbono + óxido nitroso (m/z=44 em ambos os casos). Por não ser produzido nem

consumido pelas células, usou-se o árgon como referência para analisar a variação relativa dos outros gases. Observou-se um grande aumento de dióxido de carbono + óxido nitroso, sendo esta espécie claramente dominante no final do crescimento. As quantidades de azoto e de oxigénio não variaram significativamente. Estes resultados confirmam que na presença de nitrato este organismo cresce anaerobicamente utilizando uma via desnitrificante incompleta, reduzindo o nitrato apenas até ao nível do N_2O.

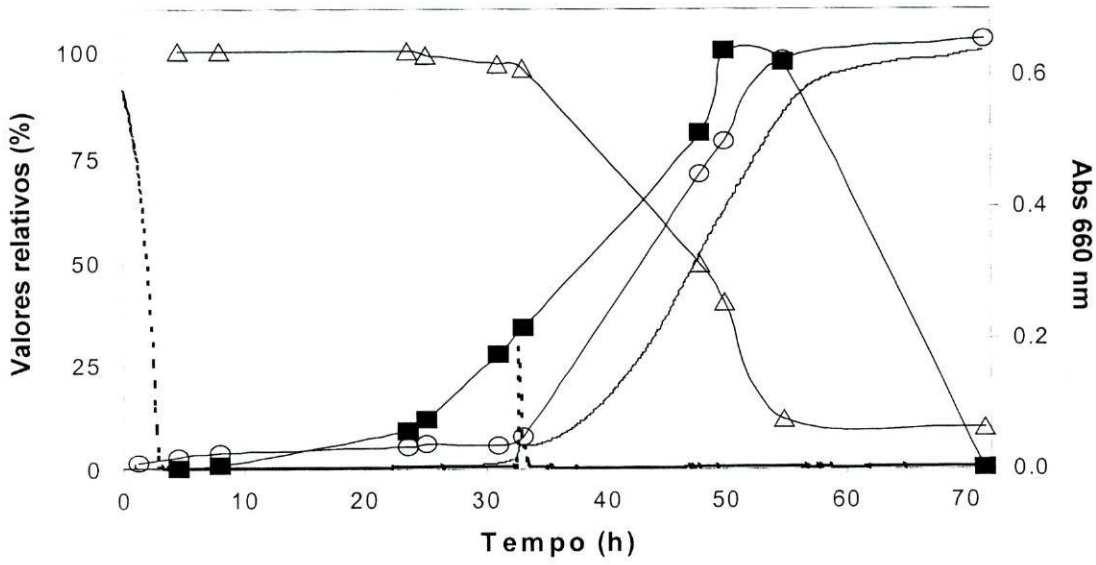


Figura 2.3 Curva de crescimento de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 em fermentador de 500 L (volume de meio usado, 300 L). A concentração inicial de nitrato no meio foi de 53 mM. O rendimento do crescimento foi de 1.7 g células/L meio. Observações: 9–23 h, fluxo de azoto através do meio de crescimento; 23 h, biomassa arrastada para as paredes do fermentador; 27 h, adição de 10 L de meio fresco, para recuperar as células arrastadas; 32 h, fluxo breve de oxigénio através do meio de crescimento. (■) % nitrito, (△) % nitrato, (○) absorvância a 660 nm, (—) % ácido adicionado, (---) % pO_2.

Tratou-se portanto de um crescimento com boa produção de biomassa e uma boa expressão das proteínas da via desnitrificante. Do extracto celular obtido isolou-se uma azurina (cf. capítulo 3), uma redutase do nitrito de cobre, CuNiR (cf. capítulo 4), e uma redutase do nitrato membranar (cf. capítulo 5). Durante o isolamento foram também detectadas, por espectroscopia de UV-Vis, várias fracções contendo citocromos e flavoproteínas.

3

PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ELECTRÕES: AS AZURINAS

3.1 INTRODUÇÃO

O periplasma das bactérias Gram-negativas contém uma grande variedade de pequenas proteínas redox, envolvidas na transferência electrónica entre complexos redox ligados à membrana e enzimas periplasmáticas, incluindo as da desnitrificação. Uma destas proteínas é a azurina, que contém um centro de cobre tipo 1 (T1Cu) envolvido na transferência electrónica com as outras proteínas e apresenta características espectroscópicas especiais: absorve intensamente a 620 nm, o que lhe confere uma cor azul intensa e, em RPE, exibe uma pequeno desdobramento hiperfino na zona paralela.

Esta proteína é facilmente detectada nos extractos celulares das estirpes DSM 50135 e 50083^T de *Ps. chlororaphis*. Neste capítulo descreve-se o isolamento e caracterização das referidas azurinas, que se podem distinguir pela posição do pico de absorção. A azurina de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 absorve a 626 nm e será portanto denominada Az626 (cf. secção 3.2.3), enquanto que a azurina de *Ps. chlororaphis* DSM 50083, absorve a 624 nm, sendo denominada Az624 (cf. secção 3.3.3).

3.2 A AZURINA DE *PS. CHLORORAPHIS* DSM 50135 (AZ626)

3.2.1 Purificação

A azurina de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 foi isolada de células crescidas em condições desnitrificantes, conforme descrito na secção experimental. A proteína, que é abundantemente expressa pelo organismo nas condições de crescimento utilizadas, exibe uma cor azul, o que facilita a monitorização do processo de purificação. É detectada no extracto celular solúvel, sendo provavelmente periplasmática, como já foi observado noutros organismos (Zhu *et al.*, 1999).

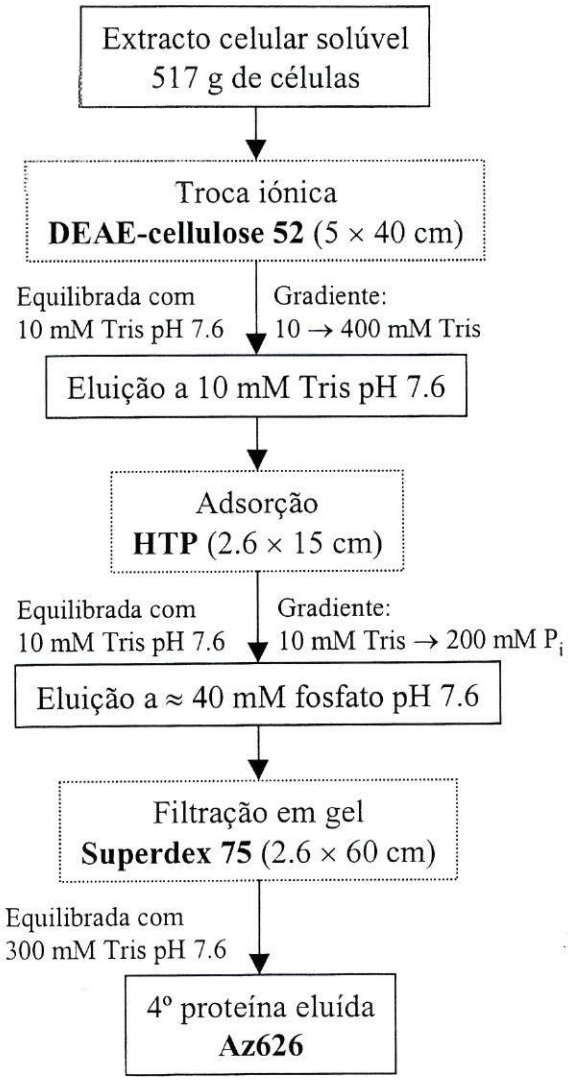


Figura 3.1 Esquema de purificação da azurina Az626 de *Ps. chlororaphis* DSM 50135.

O seu isolamento foi efectuado em três passos cromatográficos (Figura 3.1). Apesar de ao pH utilizado (pH 7.6) a proteína estar carregada negativamente (cf. valor de pI na secção seguinte), não se liga nem a resinas de troca aniónica, nem catiónica. Este comportamento deve-se, provavelmente, à existência de uma densidade de carga muito fraca à superfície da azurina. Após o processo de purificação obteve-se 130 mg de proteína electroforeticamente pura (Figura 3.2), apresentando uma razão espectral A_{626}/A_{280}=0.31.

3.2.2 Caracterização bioquímica

A azurina foi submetida a uma filtração em gel analítica, tendo sido determinada uma massa molecular, em condições nativas, de 17.8 kDa. Analisou-se o seu comportamento electroforético em condições desnaturantes (Figura 3.2), o qual permitiu obter uma massa molecular de 15.7 kDa. A razão dos valores de massa molecular obtidos em condições nativas e desnaturantes é praticamente unitária, o que permite concluir que se trata de uma proteína monomérica. Permite também verificar que a proteína não forma agregados nas condições usadas na filtração em gel (cf. secção experimental 7.9.1).

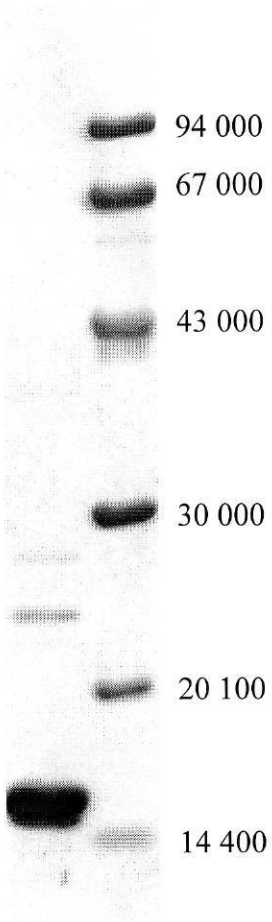


Figura 3.2 Electroforese em gel de poliacrilamida (12 %) em condições desnaturantes. Azurina Az626 de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 (à esquerda); padrões de peso molecular (à direita).

A proteína foi submetida a focagem isoeléctrica, tendo focado numa banda única, a pI 6.23. Algumas azurinas referenciadas na literatura apresentam duas bandas de igual intensidade em focagem isoeléctrica, a valores de pI ligeiramente alcalinos (Dodd *et al.*, 1995). No entanto, a azurina de *Ps aureofaciens* apresenta uma banda única a pI 6.5 (Zumft *et al.*, 1987), bastante semelhante à azurina em estudo.

O conteúdo em cobre da azurina foi determinado por espectroscopia de absorção atómica e, assumindo que a massa molecular da proteína é de 15.7 kDa, obtém-se um valor de 0.89 mol Cu/mol azurina, o qual revela ocupação quase total pelo cobre dos locais de ligação ao metal (Adman, 1991).

3.2.3 Espectroscopia de Absorção Electrónica

A azurina apresenta um espectro de absorção (Figura 3.3) típico de uma proteína azul de cobre, apresentando na sua forma oxidada uma banda de transferência de carga $S_{Cys}\,\pi \rightarrow Cu\ d_{x^2-y^2}$, a 626 nm, que identifica a proteína como uma azurina (Solomon *et al.*, 1992). Assumindo uma massa molecular de 15.7 kDa, o valor do coeficiente de absorção desta banda é de ε_{626}=3.40 $mM^{-1}cm^{-1}$ e o da banda de proteína é de ε_{280}=11.1 $mM^{-1}cm^{-1}$. A análise do espectro revela ainda a existência de um pico satélite a 291 nm, que em outras azurinas foi atribuído ao ambiente hidrofóbico do triptofano-48 (Finazzi-Agrò *et al.*, 1970) e de uma banda larga a ≈780 nm. Observa-se ainda um pico a 409 nm que se deve, provavelmente, a uma contaminação de um citocromo, avaliada em ≈3% em massa de proteína total.

Por adição de ascorbato ou ditionito, a proteína é imediatamente reduzida, tornando-se incolor, podendo ser reoxidada por nitrito, em presença da redutase do nitrito do mesmo organismo (cf. capítulo 4).

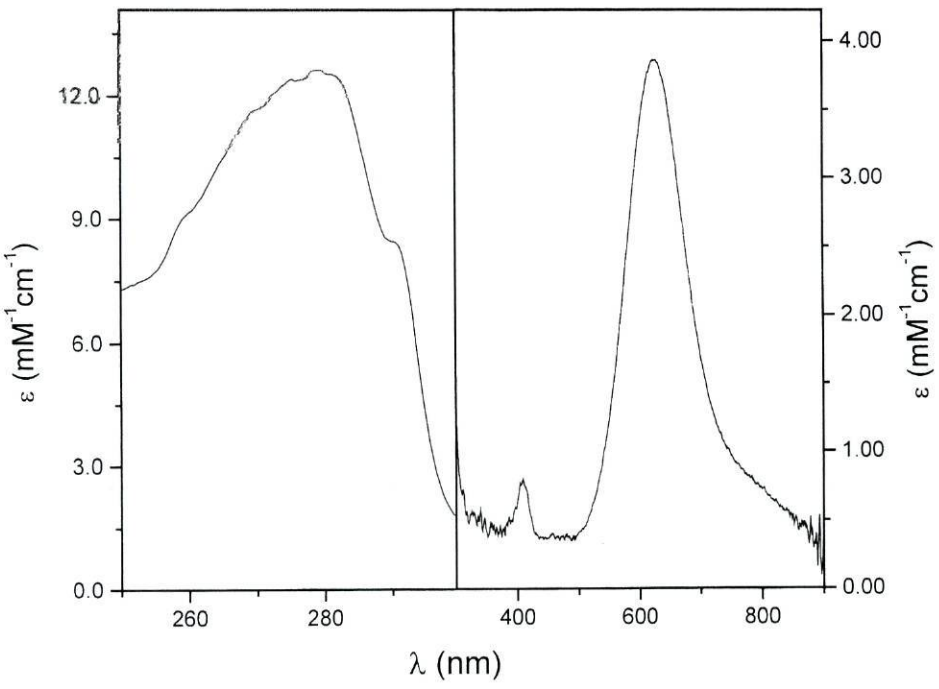


Figura 3.3 Espectro de UV-vis da azurina Az626 de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 na sua forma nativa. Condições: [azurina]=80 μM em 50 mM Tris pH 7.6.

3.2.4 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica

Na Figura 3.4 é apresentado o espectro de RPE da forma oxidada da azurina. Tem o aspecto de um sistema d^9 com momento magnético nuclear, I=3/2.

Trata-se de um espectro axial, com $g_{\|}$=2.270 e $g_{\perp}$=2.046, com estrutura hiperfina na região de $g_{\|}$ (4 linhas) e de $g_{\perp}$ (8 linhas). O desdobramento devido ao acoplamento do electrão desemparelhado com o núcleo de cobre ao longo do eixo de simetria ($g_{\|}$) apresenta uma constante, $^{Cu}A_{\|}$=5.28 mT. Este valor é típico dos centros de cobre tipo 1, T1Cu, que se caracterizam não só pela já referida intensa cor azul, como também pelos valores de $^{Cu}A_{\|}$ inferiores a 7 mT (Solomon *et al.*, 1992). Ao contrário do que é normalmente observado em T1Cu, a estrutura na zona de campo alto está bem resolvida (Figura 3.4 B e Figura 3.5). Até agora, existia apenas uma descrição de uma tal resolução em banda X na literatura bioquímica (a azurina de *Ps. aureofaciens* ATCC

13985, Zumft *et al.*, 1987), havendo contudo estudos de RPE feitos a baixas frequências (banda L e banda S) que apresentavam estruturas semelhantes (Antholine *et al.*, 1993).

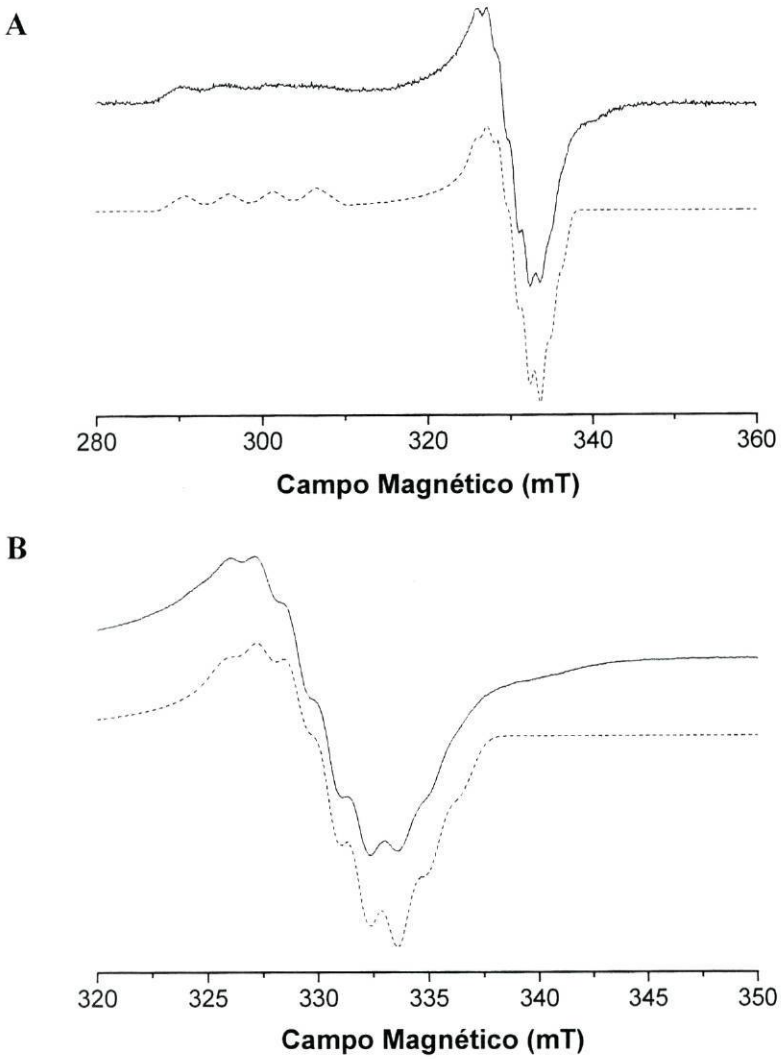


Figura 3.4 Espectros de RPE da azurina Az626 de *Ps. chlororaphis* DSM 50135. (A) espectro total; (B) detalhe: região perpendicular do espectro; (—) experimental; (---) simulado. Utilizou-se uma amostra de concentração 860 μM em 300 mM Tris pH 7.6. Parâmetros instrumentais: frequência das microondas, 9.49 GHz; potência, 2 mW; modulação de amplitude, 0.1 mT (detalhe, 0.4 mT); temperatura, 60 K. Parâmetros de simulação: valores de $g_{\|}$=2.270, $g_{\perp}$=2.046; $^{Cu}A_{\|}$=5.28 mT, $^{Cu}A_{\perp}$=1.30 mT e o acoplamento super-hiperfino de 2 átomos de azoto não equivalentes, com constantes $^{N}A_{\perp}$=1.30 mT e 1.50 mT; larguras de banda, 1.2, 1.3 e 1.3 mT; 400 orientações.

Baseando-se em dados de ENDOR (banda Q) (Werst *et al.*, 1991) e na estrutura cristalina de raio X de azurinas bacterianas (Baker, 1988; Nar *et al.*, 1991), estes autores atribuiram a referida estrutura a dois átomos de azoto de duas histidinas coordenadas e a dois protões metilénicos adjacentes ao enxofre de uma cisteína coordenada. A resolução nesta região depende das magnitudes dos acoplamentos hiperfinos do cobre e dos ligandos, e dos padrões de sobreposição resultantes. Supondo, por exemplo, dois azotos equivalentes, espera-se um padrão super-hiperfino de 5 linhas com intensidade 1:2:3:2:1 por cada uma das 4 transições hiperfinas do cobre na região perpendicular, *i.e.*, 4 conjuntos sobrepostos de 5 linhas cada um. Para a Az626, obtém-se uma simulação razoável supondo uma constante $^{Cu}A_{\perp}$ de 1.30 mT e o acoplamento super-hiperfino de 2 átomos de azoto não equivalentes, com constantes $^{N}A_{\perp}$ de 1.30 mT e 1.50 mT. A comparação da segunda derivada do espectro de absorção de RPE com a segunda derivada da simulação (Figura 3.5) confirma a boa qualidade dos parâmetros obtidos. Incluindo 1 ou 2 H, não se obtêm simulações tão boas. Uma vez que poderá existir uma

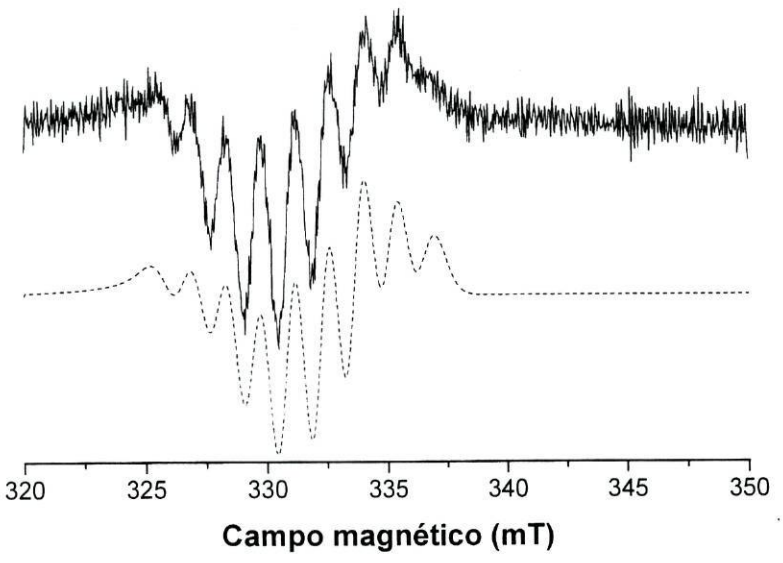


Figura 3.5 2ª derivada do espectro de absorção de RPE da azurina Az626 de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 (região perpendicular do espectro). (—) experimental; (---) simulado. Condições experimentais: ver Figura 3.4.

outra combinação de parâmetros igualmente satisfatória, a determinação inequívoca dos parâmetros calculados exigiria a obtenção de espectros a outras frequências.

A redução da proteína de Cu^{2+} a Cu^{+} provoca o desaparecimento do sinal de RPE. Não são detectados novos sinais no estado reduzido da proteína.

3.2.5 Caracterização electroquímica

Os voltamogramas obtidos a pH 7.5 (Figura 3.6) revelam uma resposta faradaica bem definida e quasi-reversível electroquimicamente. As correntes de pico (i_p) são proporcionais à raíz quadrada da velocidade de varrimento ($\nu^{1/2}$) em toda a gama de velocidades utilizadas e a razão das correntes de pico anódica e catódica (i_{ox}/i_{red}) é de 0.9, independentemente da velocidade de varrimento. Trata-se portanto de um processo monoelectrónico, controlado por difusão. A separação de pico, porém, apresenta valores superiores ao valor teórico de 60 mV (≈80 mV), aumentando com a velocidade de varrimento. O potencial de meia-onda, E_m, a pH 7.5 é de 297 mV *vs* eléctrodo normal de hidrogénio, ENH.

A variação da intensidade das correntes anódica e catódica com a velocidade de varrimento permite calcular, através da equação de Randles-Sevcik (cf. Equação 3.1), um valor médio do coeficiente de difusão da azurina (D_0) de 2.44×10^{-7} cm^2s^{-1} a pH 7.5, bastante inferior ao determinado para outras azurinas (cf. Tabela 3.1, adiante).

Equação 3.1: equação de Randles-Sevcik

$$i_{pa} = 0.4463nFA\left(\frac{nF}{RT}\right)^{1/2} C_{red} D_{red}^{1/2} \nu^{1/2}$$

$$i_{pc} = -0.4463nFA\left(\frac{nF}{RT}\right)^{1/2} C_{ox} D_{ox}^{1/2} \nu^{1/2}$$

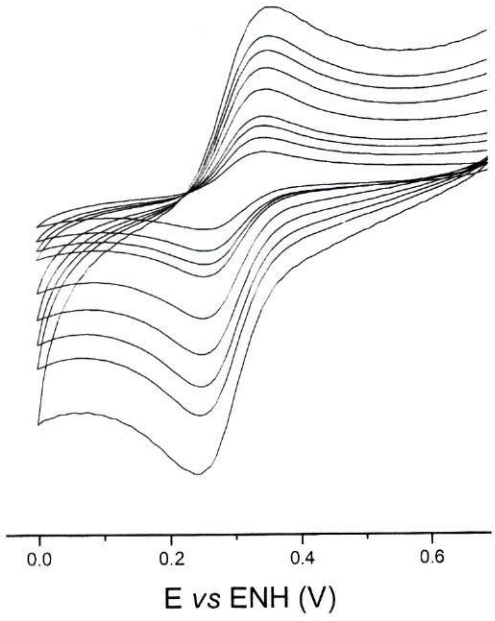


Figura 3.6 Voltamogramas cíclicos da azurina Az626 de *Ps chlororaphis* DSM 50135, obtidos a velocidades de varrimento entre 5 e 200 mV/s, em eléctrodo de ouro modificado (4,4'-ditiodipiridina). [CuAz]=270 μM, em tampão 100 mM BisTrisPropano pH 7.5, 50 mM KCl.

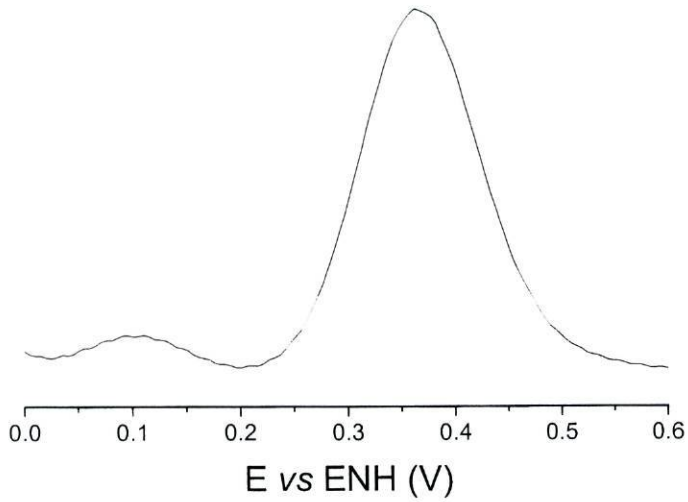


Figura 3.7 Voltamograma de onda quadrada da azurina Az 626 de *Ps chlororaphis* DSM 50135, em eléctrodo de ouro modificado (4,4'-ditiodipiridina). [CuAz]≈370 μM, em tampão 100 mM citrato pH 5.5, 50 mM KCl. Amplitude de modulação, 50 mV e frequência, 8 Hz.

O estudo do comportamento electroquímico da azurina (por voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada) a diversos valores de pH compreendidos entre 4 e 9 revelou a existência de mais do que uma espécie electroactiva em condições ácidas. Assim, a pH<6 surge uma nova espécie, a um potencial próximo de 100 mV, provavelmente sem significado fisiológico (Figura 3.7). A espécie fisiológica revela uma forte dependência do potencial de meia-onda com o pH, embora mantenha o carácter quasi-reversível e monoelectrónico. O valor aparente do coeficiente de difusão desta espécie não depende do pH.

3.2.5.1 Variação do potencial de redução com o pH

A dependência com o pH do potencial de meia-onda da proteína (espécie fisiológica) revela a existência de dois equilíbrios de ácido-base (Figura 3.8). Isto deve-se a uma interacção entre o centro de cobre e o grupo ionizável de um aminoácido, cujo pK depende do estado de oxidação do cobre. De facto, quando existe um resíduo protonável no, ou perto do, centro activo de uma proteína com actividade redox, os potenciais tornam-se dependentes do pH. Isto deve-se ao facto de as energias relativas dos estados oxidado e reduzido serem influenciadas pela carga positiva do protão, ou pela carga negativa do ácido desprotonado. Consequentemente, o pK_a do grupo será modificado pela carga do electrão, resultando num pK mais baixo para a forma oxidada e num pK mais alto para a forma reduzida, $pK_{ox} < pK_{red}$ (Clark, 1960). A partir da diferença entre os valores de pK_a do aminoácido nos dois estados de oxidação da proteína, pode determinar-se o efeito da protonação ou desprotonação desse aminoácido no potencial redox da proteína (Figura 3.9).

A valores de pH inferiores a 5.5 a espécie de baixo pH não permite a determinação dos valores de E_m para a espécie em titulação. Assim, o ajuste da curva $E_m=f(pH)$ foi feito com a equação apresentada na Figura 3.9 (equação 3.2). Na Figura

3.8 pode ver-se a curva do referido ajuste, bem como os valores de pK_{ox}, pK_{red}, potencial da forma desprotonada e respectivos erros associados.

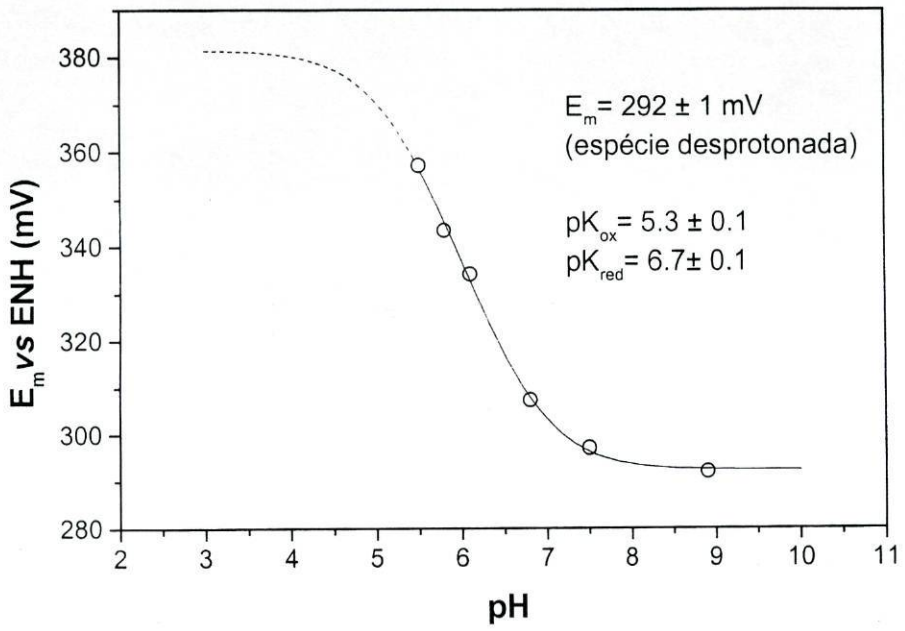
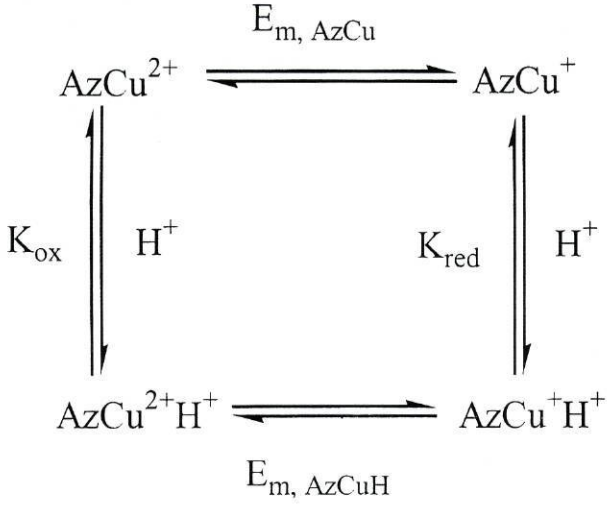


Figura 3.8 Variação do potencial de meia onda, E_m, da azurina com o pH. As medições foram efectuadas em eléctrodo de ouro modificado (4,4'-ditiodipiridina), por voltametria cíclica, a velocidades de varrimento entre 5 e 200 mVs^{-1}. Fez-se o estudo para valores de pH entre 4 e 9 (tampões usados: citrato, MES ou BisTrisPropano 100 mM / KCl 50 mM). Os valores experimentais foram ajustados usando a equação da Figura 3.9 (equação 3.2). Os valores de pK_{ox}, pK_{red}, potencial da forma desprotonada e respectivos erros associados foram obtidos no referido ajuste.

Na forma reduzida, o pK do grupo ionizável da azurina é de pK_{red}=6.7±0.1. O valor de pK_{ox} não pode ser determinado com exactidão por não ser possível medir os valores de E_m por voltametria a pH muito ácido. No entanto, por simulação, obteve-se o valor máximo de 5.3±0.1 para este pK. A diferença de potencial entre as formas protonada e desprotonada é de pelo menos 89 mV. Este comportamento é semelhante ao observado na azurina de *Ps. aeruginosa* (Canters *et al.*, 1984), onde foi atribuído às propriedades de ácido-base de uma histidina próxima do centro activo da proteína. Groeneveld *et al.* (1988) observaram que a desprotonação da histidina provoca uma

reorientação apreciável da sua cadeia lateral, com subsequente reorganização da estrutura 3D da proteína. O valor de pK_{ox} obtido para a Az626, porém, é bastante inferior ao descrito para a azurina de *Ps. aeruginosa* (cf. Tabela 3.1). É possível que esta variação seja devida a uma maior aproximação da histidina ao cobre na forma oxidada de Az626.



$$E_{m,pH} = E_{m,AzCu} - \frac{RT}{nF}\ln\left(\frac{K_{red}(K_{ox}+H^+)}{K_{ox}(K_{red}+H^+)}\right)$$

Figura 3.9 Esquema reaccional da dependência do potencial de redução da azurina com o pH (Clark, 1960). K_{ox} e K_{red} são, respectivamente, as constantes de dissociação das formas oxidada e reduzida da azurina e $E_{m,AzCuH}$ e $E_{m,AzCu}$ são, respectivamente, os potenciais de meia-onda a pH baixo e alto. Az é a apoproteína da azurina. Mostra-se também a equação obtida a partir do esquema (equação 3.2), pelas definições convencionais de K_a e E_m, usada para fazer o ajuste dos valores experimentais (Clark, 1960).

3.3 A AZURINA DE *PS. CHLORORAPHIS* DSM 50083^T (AZ624)

3.3.1 Purificação

A azurina de *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T foi isolada de células crescidas conforme descrito na secção experimental. Tal como Az626, é abundantemente expressa pelo organismo, exibe cor azul e é detectada no extracto celular solúvel.

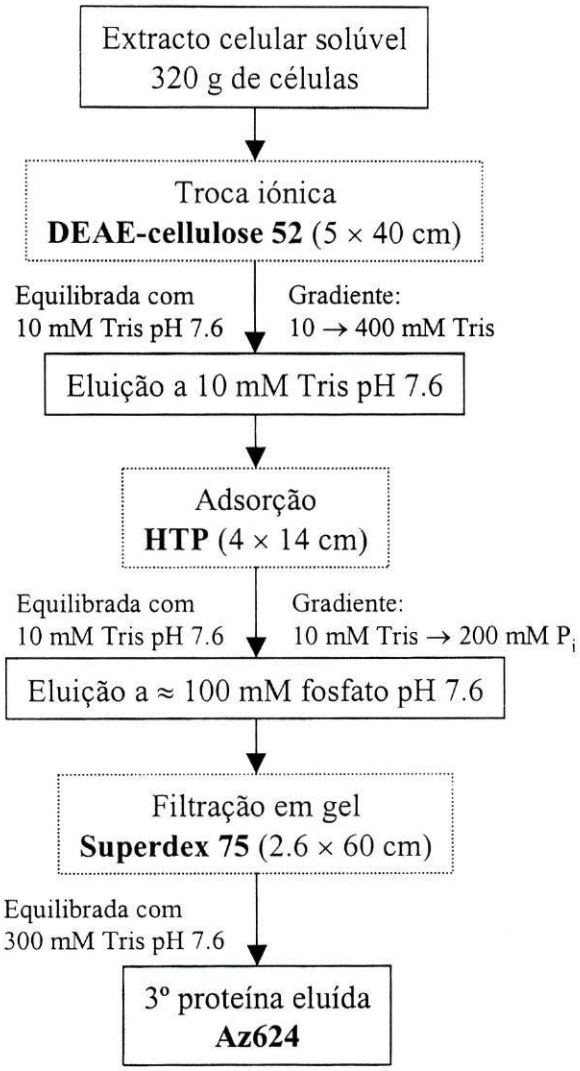


Figura 3.10 Esquema de purificação da azurina Az624 de *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T.

O seu isolamento (Figura 3.10) foi efectuado em três passos cromatográficos. Após o processo de purificação obteve-se 100 mg de proteína electroforeticamente pura (Figura 3.11), apresentando uma razão espectral A_{624}/A_{280}=0.35.

3.3.2 Caracterização bioquímica

A azurina de DSM 50083 apresenta propriedades bioquímicas muito análogas às de Az626. Em condições nativas (filtração em gel) e desnaturantes (SDS-PAGE) apresenta, respectivamente, massas moleculares de 16.6 kDa e 15.4 kDa, valores que são praticamente idênticos, pelo que se trata também de uma proteína monomérica. A

proteína apresenta um pI de 6.27. Assumindo uma massa molecular de 15.4 kDa, o seu conteúdo em cobre é de 1.00 mol Cu/mol azurina, o que revela a total ocupação pelo cobre dos locais de ligação ao metal.

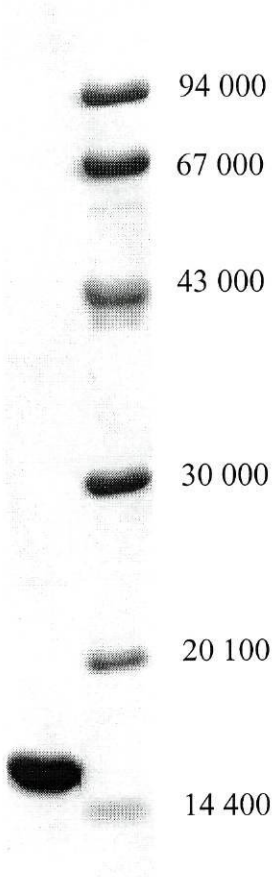


Figura 3.11 Electroforese em gel de poliacrilamida (12 %) em condições desnaturantes. Azurina Az624 de *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T (à esquerda); padrões de peso molecular (à direita).

Por sequenciação parcial do N-terminal da proteína determinaram-se sete aminoácidos: AECLVDV. Esta sequência assemelha-se à sequência determinada para a azurina I de *Alcaligenes xylosoxidans* (Li *et al.*, 1998). O resíduo de cisteína na posição 3 é altamente conservado entre as azurinas conhecidas e está envolvido na formação de uma ponte dissulfureto característica da família das azurinas. A curta extensão do N-terminal determinado não permite, contudo, retirar conclusões seguras quanto à filogenia desta azurina.

3.3.3 Espectroscopia de Absorção Electrónica

O espectro de absorção UV-vis da azurina na forma nativa (Figura 3.12) apresenta a banda de transferência de carga $S_{Cys}\,\pi \rightarrow Cu\ d_{x^2-y^2}$, característica das proteínas azuis de cobre, a 624 nm (Solomon *et al.*, 1992). Assumindo para a azurina uma massa molecular de 15.4 kDa, obtêm-se os valores dos coeficientes de extinção ε_{276}=8.75 $mM^{-1}cm^{-1}$ e ε_{624}=3.36 $mM^{-1}cm^{-1}$. A análise do espectro revela ainda a existência de uma banda satélite a 291 nm e de uma banda larga a ≈780 nm, tal como na Az626.

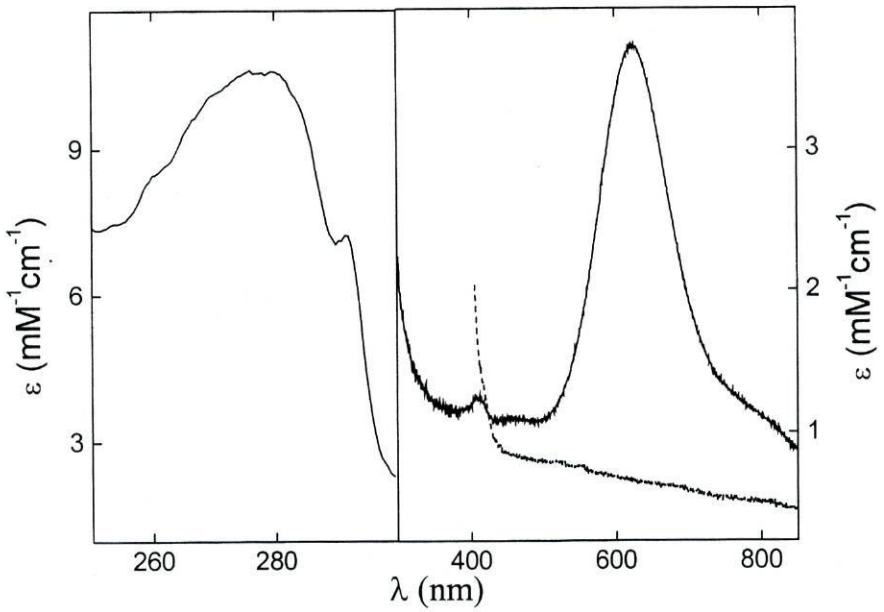


Figura 3.12 Espectro de UV-vis da azurina Az624 de *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T nas suas formas nativa (—) e reduzida com ditionito (---). Condições: [azurina]=34 μM em 20 mM Tris pH 7.6.

Por redução com ditionito desaparece a banda de transferência de carga, sendo as restantes bandas (abaixo dos 400 nm) ocultadas pela elevada absorvância do ditionito nessa zona (Figura 3.12).

Por reoxidação com ferricianeto, reaparece a banda de transferência de carga, embora com diminuição da razão espectral, A_{624}/A_{280}, que diminui de 0.35 para 0.11. O processo de redução com ditionito conduz, portanto, à saída de ião cobre dos centros

metálicos. O conteúdo em cobre destes centros pode ser regenerado por diálise contra uma solução de $CuSO_4$, conforme verificado por aumento da absorção da banda de transferência de carga a 624 nm.

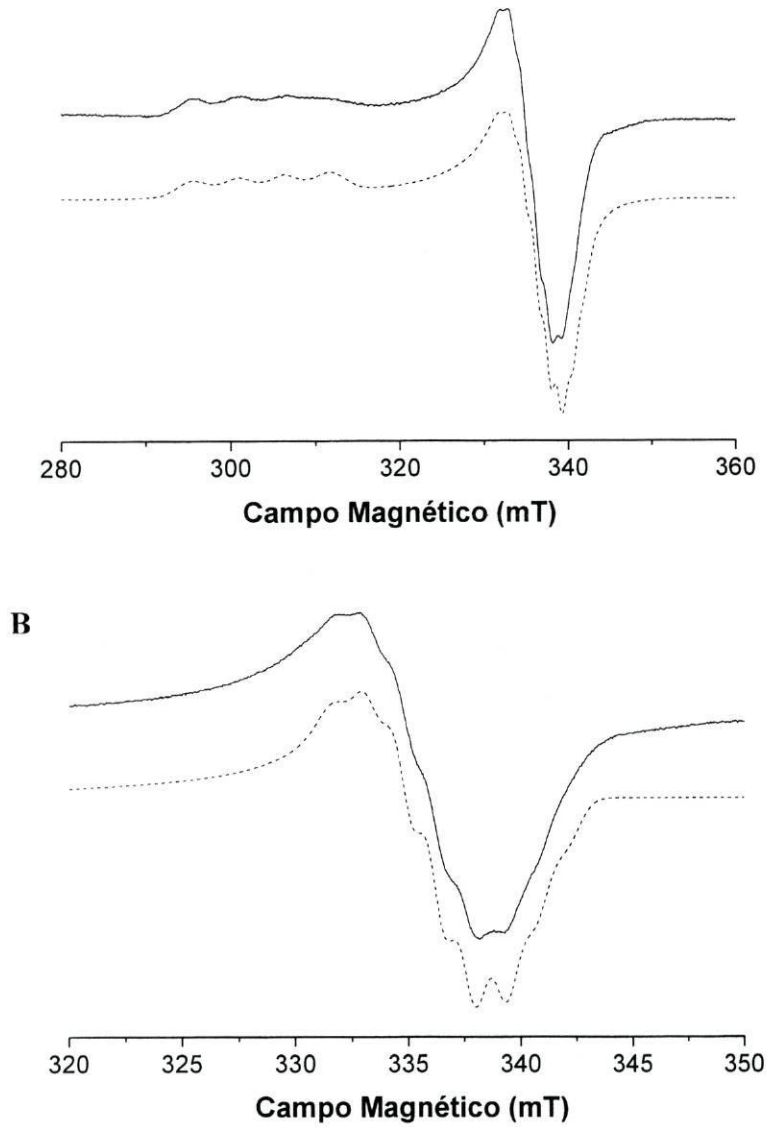


Figura 3.13 Espectro de RPE da azurina Az624 de *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T. (A) espectro total; (B) detalhe: região perpendicular do espectro; (—) experimental; (---) simulado. Utilizou-se uma amostra de concentração 800 μM em 300 mM Tris pH 7.6. Parâmetros instrumentais: frequência das microondas, 9.65 GHz; potência, 2 mW; modulação de amplitude, 0.4 mT (detalhe, 0.4 mT); temperatura, 60 K. Parâmetros de simulação: valores de $g_{\|}$=2.271, $g_{\perp}$=2.046; $^{Cu}A_{\|}$=5.38 mT, $^{Cu}A_{\perp}$=1.44 mT e o acoplamento super-hiperfino de 2 átomos de azoto equivalentes, com constantes $^{N}A_{\perp}$=1.26 mT; larguras de banda, 1.2, 1.3 e 1.3 mT; 300 orientações.

3.3.4 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica

O espectro de RPE de Az624 (Figura 3.13) é um espectro típico de T1Cu (Solomon *et al.*, 1992). É axial, com $g_{\|}$=2.271 e $g_{\perp}$=2.046, com estrutura hiperfina nas regiões de $g_{\|}$ (4 linhas) e de $g_{\perp}$ (7-9 linhas). A constante de acoplamento com o núcleo de cobre é de $^{Cu}A_{\|}$=5.38 mT.

Tal como na Az626, observa-se estrutura super-hiperfina, possivelmente devida a dois átomos de azoto. Na Figura 3.13.B apresenta-se uma simulação em que se supõe $^{Cu}A_{\perp}$=1.44 mT e $^{N}A_{\perp}$=1.26 mT. A comparação da segunda derivada do espectro de RPE com a segunda derivada da simulação (Figura 3.14) confirma a boa qualidade dos parâmetros obtidos.

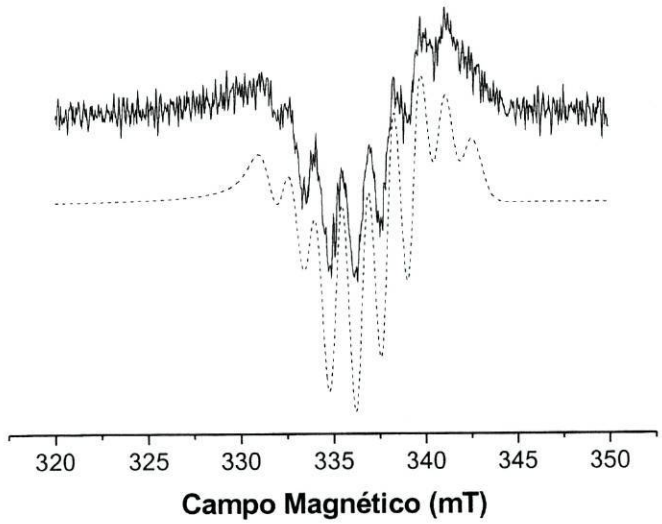


Figura 3.14 2ª derivada do espectro de absorção de RPE da azurina Az624 de *Ps. chlororaphis* DSM 50083 (região perpendicular do espectro). (—) experimental; (---) simulado. Condições experimentais e parâmetros de simulação: ver Figura 3.13.

Numa gama de temperaturas desde 10 até 80 K, o sinal de RPE é sempre detectado. A estrutura hiperfina apresenta melhor resolução a temperaturas mais altas, sendo este efeito mais visível nos acoplamentos com ligandos: abaixo de 20 K não se observa qualquer estrutura super-hiperfina. Antholine *et al.* (1993) observaram, pelo

contrário, que na azurina de *Ps. aeruginosa* a resolução da estrutura super-hiperfina em RPE de banda S aumentava à medida que se baixava a temperatura de 123 K para 20 K.

3.3.5 Caracterização electroquímica

Tal como na Az626, os voltamogramas obtidos a pH 7.0 são reprodutíveis e bem-definidos (Figura 3.15); i_p é proporcional a $\nu^{1/2}$ em toda a gama de velocidades utilizada; i_{ox}/i_{red} varia entre 0.9 e 1.1 e ΔE varia entre 66 e 76 mV em toda a gama de velocidades utilizadas. Trata-se de um processo reversível, monoelectrónico e controlado por difusão. O potencial de meia-onda a pH 7.0 é de 322 mV *vs* ENH. O valor médio do coeficiente de difusão da azurina, a pH 7.0, é de $D_0=9.10\times10^{-7}$ cm^2s^{-1}.

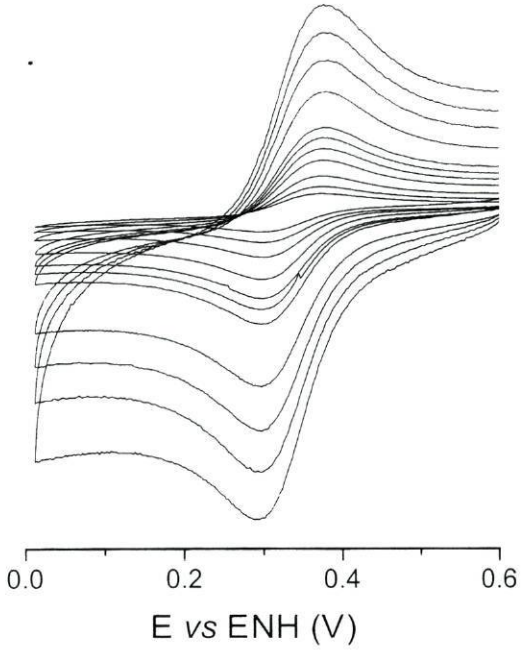


Figura 3.15 Voltamogramas cíclicos da azurina Az624 de *Ps chlororaphis* DSM 50083^T, obtidos a velocidades de varrimento entre 5 e 500 mV/s, em eléctrodo de ouro modificado (4,4'-ditiodipiridina). [CuAz]≈380 μM, em tampão 100 mM PIPES pH 7.0, 100 mM KNO_3.

O estudo do comportamento electroquímico de Az-624 (voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada) a diversos valores de pH compreendidos entre 3 e 9,

revelou a existência de mais do que uma espécie electroactiva em condições ácidas. Assim, a pH<5.5 surge uma nova espécie, a um potencial de ≈90 mV, provavelmente sem significado fisiológico (Figura 3.16). Observa-se uma forte dependência do potencial de meia-onda da espécie fisiológica com o pH, embora mantenha o carácter reversível e monoelectrónico (secção 3.3.5.2). O valor do coeficiente de difusão desta espécie revela também uma dependência com o pH (secção 3.3.5.1).

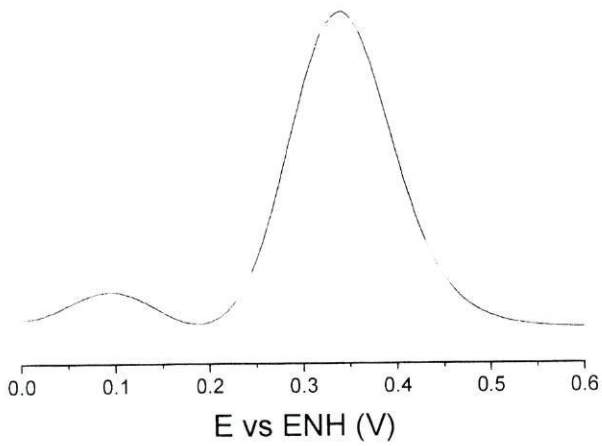


Figura 3.16 Voltamograma de onda quadrada da azurina Az624 de *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T, em eléctrodo de ouro modificado (4,4'-ditiodipiridina). [CuAz]≈320 μM, em tampão 100 mM citrato pH 4.6, 100 mM KNO_3. Amplitude de modulação, 50 mV e frequência, 8 Hz.

Estudos feitos com diferentes concentrações de electrólito suporte a pH 6.2 não revelaram qualquer variação significativa do potencial de meia-onda da azurina com a força iónica. Este comportamento pode ser facilmente explicado pela teoria de Debye-Hückel, a qual prediz que o potencial será independente da força iónica se a carga da espécie for igual nos estados oxidado e reduzido. Isto pode verificar-se se, concomitantemente à redução, ocorrer também protonação da espécie electroactiva (e estes processos envolverem igual número de electrões / protões). No caso em estudo, como o valor de pH utilizado se encontra entre os valores de pK_{ox} e pK_{red} (secção 3.3.5.2), e quer a redução quer a protonação envolvem cargas unitárias, há manutenção

da carga da espécie e, portanto, será de esperar independência do potencial relativamente à força iónica.

3.3.5.1 Variação do coeficiente de difusão com o pH

Ao contrário do esperado, observou-se que o coeficiente de difusão de Az624 varia com o pH (Figura 3.17). Esta variação foi simulada supondo a existência de duas formas da azurina, protonada e desprotonada, que apresentam diferentes valores de coeficiente de difusão. Fazendo o ajuste dos valores experimentais com a equação deduzida desta hipótese (Equação 3.3, cf. Apêndice 3), obtém-se para essa protonação um valor de pK_a de 6.7±0.2, sugerindo um processo associado a uma histidina. Não é óbvio como é que uma protonação pode afectar as características hidrodinâmicas de uma proteína. O processo de protonação poderá causar uma mudança conformacional, ou a formação de agregados supramoleculares.

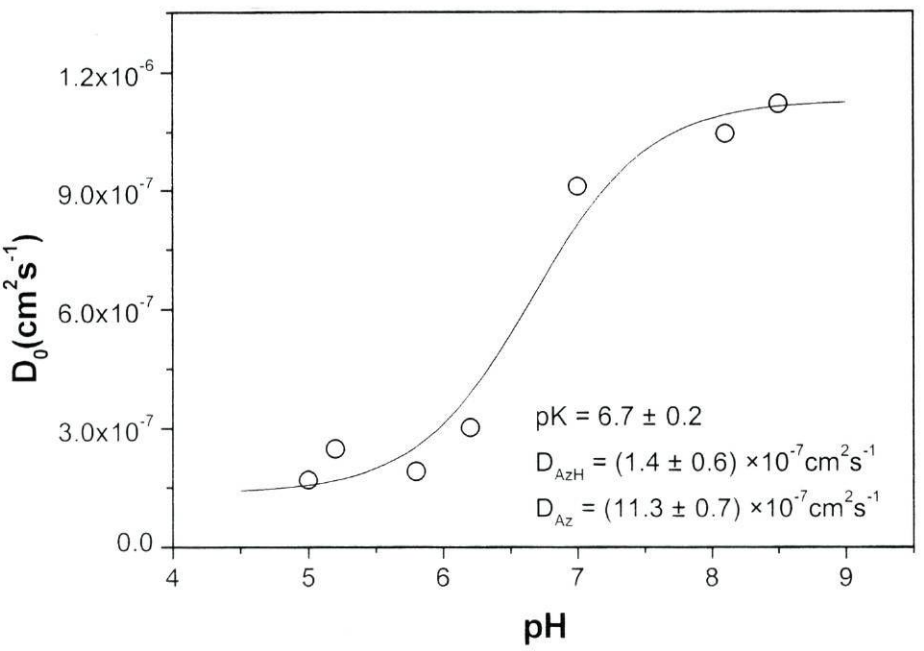


Figura 3.17 Variação do coeficiente de difusão da azurina Az624 de *Ps chlororaphis* DSM 50083 com o pH. Condições experimentais: ver Figura 3.18. Estão indicados os valores dos coeficientes de difusão das espécies protonada e desprotonada, o pK_a associado e respectivos erros.

$$D_0 = \frac{K_a D_{Az} + H^+ D_{AzH}}{K_a + H^+}$$ **Equação 3.3**

3.3.5.2 Variação do potencial de redução com o pH

A dependência de E_m de Az624 com o pH (Figura 3.18) revela também interacção entre o centro de cobre e um grupo ionizável, cujo pK depende do estado de oxidação do cobre. Por simulação (cf. secção 3.2.5.1), obteve-se os seguintes valores de pK: pK_{ox}=5.6±0.1 e pK_{red}=6.8±0.1. Estes valores são semelhantes aos obtidos para Az626, podendo ser atribuídos à protonação de um resíduo de histidina perto do centro activo, acompanhada de mudanças estruturais (cf. secção 3.2.5.1). A variação do potencial entre as espécies protonada e desprotonada é de 76 mV.

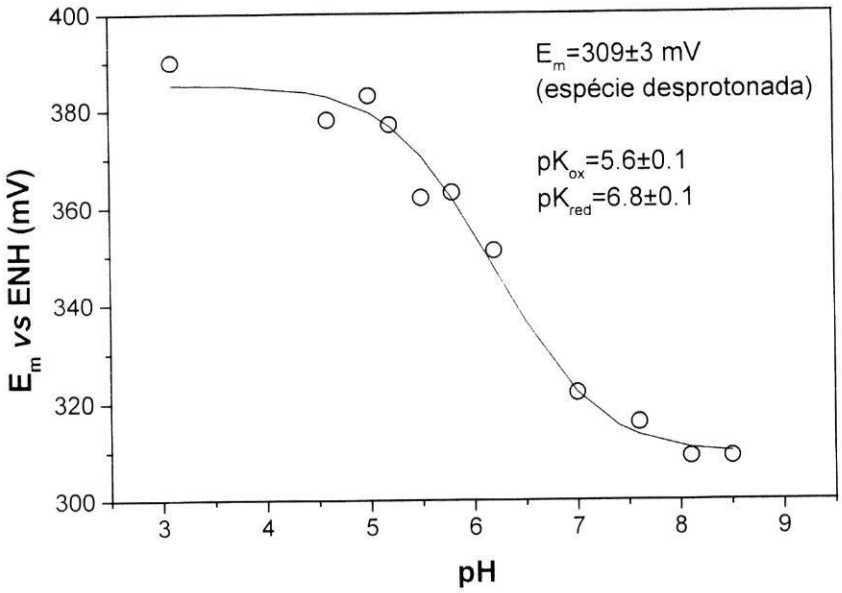


Figura 3.18 Variação do potencial de meia-onda da azurina Az624 de *Ps. chlororaphis* DSM 50083 com o pH. As medições foram efectuadas em eléctrodo de ouro modificado (4,4'-ditiodipiridina), por voltametria cíclica, a velocidades de varrimento entre 5 e 500 mVs^{-1}. Fez-se o estudo para valores de pH entre 3 e 9 (tampões usados: citrato, MES, PIPES ou BisTrisPropano 100 mM /KNO_3 100 mM). Estão indicados os valores de pK obtidos e respectivos erros associados, bem como o valor do potencial da espécie desprotonada.

3.4 ANÁLISE COMPARATIVA DAS AZURINAS ESTUDADAS

Na Tabela 3.1 estão sumarizadas as propriedades bioquímicas, espectroscópicas e electroquímicas das azurina isoladas e de outras descritas na literatura. As azurinas das estirpes de *Ps. chlororaphis* estudadas apresentam características ligeiramente diferentes da maioria das outras azurinas, já que são proteínas distintamente mais acídicas do que as outras azurinas descritas, e os seus potenciais a pH 7.0 estão entre os mais elevados determinados em azurinas. Estas características afectarão provavelmente a sua capacidade de transferir electrões de / para os sistemas em que intervêm em condições fisiológicas uma vez que o carácter ácido das proteínas reflecte a distribuição de carga à sua superfície (um factor determinante na formação de complexos intermoleculares dador/aceitador de electrões) e o potencial de redução é um dos factores que mais influencia a velocidade da transferência electrónica entre dois sistemas.

Uma diferença notável encontra-se no facto de nas azurinas de *Ps. chlororaphis* ser detectável estrutura super-hiperfina no espectro de RPE em banda X. Este comportamento foi descrito apenas para uma outra azurina, isolada de uma estirpe aparentada, *Ps. aureofaciens* ATCC 13985 (Zumft *et al.*, 1987) e reflecte, provavelmente, diferenças subtis na geometria do centro activo destas proteínas relativamente à generalidade das suas congéneres. As azurinas com estas características espectroscópicas peculiares poderão constituir sistemas experimentais prometedores para estudar a influência de factores externos (p. ex. agentes desnaturantes), mutações, etc. no acoplamento das histidinas com o centro activo de cobre. As estirpes de *Ps. chlororaphis* apresentam vantagens para este estudo, uma vez que, pelo menos nas condições de crescimento experimentadas, produzem maiores quantidades de azurina (entre 20 e 25 mg/100 g de células) do que *Ps. aureofaciens* (10 mg/100 g de células).

Embora estejam disponíveis menos dados sobre a variação do potencial das proteínas com o pH (o que torna mais difícil uma comparação significativa), os

Tabela 3.1 Propriedades de algumas azurinas.

Propriedade	*Ps. chlororaphis* DSM 50135 Az626[a]	*Ps. chlororaphis* DSM 50083[T] Az624[a]	*Ps. aeruginosa* azurina[b]	*Ps. aureofaciens* ATCC 13985[T] azurina[c]	*Methylomonas* sp. strain J Az-iso1[d]	*Methylomonas* sp. strain J Az-iso2[d]	*Alc. denitrificans* NCTC 8582 azurina[e]	*Alc. xylosoxidans* NCIMB 11015 azurina I[f]
Massa molecular (kDa)								
filtração em gel	17.8	16.6	14.0	16	i	i	i	13.94
SDS-PAGE	15.7	14.6		15	i	i	i	
Ponto isoeléctrico	6.23	6.27	i	6.5	9.6	7.7	i	8.8, 7.1
Conteúdo em metais	0.89 Cu/15.7 kDa	1.00 Cu/14.6 kDa	i	0.8 Cu/15kDa	i	i	i	0.73 Cu, 0.27 Zn/ 13.5 kDa
Espectro electrónico $\lambda_{máx}$ (nm) (ε ($mM^{-1}cm^{-1}$))	280 (11.1), 291, 626 (3.40)	280 (8.75), 291, 624 (3.36)	280, 625 (5.3)	280 (6.4), 291, 624 (2.5)	280, 621 (4.5)	280, 460 (0.73), 616 (3.9)	280, 619	280 (17.76), 291, 619 (6.27)
Índice de pureza	0.31 (626/280)	0.35 (624/280)	0.50 (625/280)[g]	0.4 (624/280)	i	i	0.30 (625/280)	0.36 (620/280)
Parâmetros de RPE								
valores de *g*	2.270, 2.046	2.271, 2.046	2.259, 2.059	2.26(6), 2.05(6)	2.243, 2.039	2.237, 2.053, 2.016	2.255, 2.059	2.26, 2.06
constantes de acoplamento (mT)	5.28; 1.30, 1.50	5.38, 1.26	5.0	5.8, 1.25	5.90	4.22, 2.17, 2.24	5.70	6.01
Parâmetros electroquímicos								
$E_{m,pH\ 7}$ (mV *vs* ENH)	303	322	310	i	321	278	276	270[d]
ΔE (mV)	80	66	i	i	77	61	i	61[d]
$D \times 10^7$ (cm^2s^{-1})	2.44 (pH 7.5)	9.10 (pH 7.0)	12[h]	i	5.99 (pH 7.0)	6.18 (pH 7.0)	i	5.25 (pH 7.0)[d]
pK_{ox}, pK_{red}	<5.3, 6.7	5.6, 6.8	6.2, 7.1	i	i	i	<4.5, 4.8[k]	
Reacções	dador de e^- para a CuNiR	j	transferência de e^- de/para cyt. c_{551} e cd_1NiR	dador de e^- para a CuNiR	i	aceitador de e^- da MADH	i	dador de e^- para a CuNiR

[a] Este trabalho; [b] Pascher *et al.*,1993; [c] Zumft *et al.*, 1987; [d] Suzuki *et al.*, 1999b; [e] Ainscough *et al.*, 1987; [f] Dodd *et al.*, 1995; [g] Pettigrew *et al.*,1983; [h] van Pouderoyen *et al.*,1994; [i] não indicado; [j] não determinadas; [k] Groeneveld *et al.*, 1988

mecanismos responsáveis por esta dependência em Az624 e Az626 parecem ser semelhantes aos observados na azurina de *Ps. aeruginosa*, embora aparentemente impliquem maiores mudanças estruturais. Isto manifesta-se nos valores nitidamente mais baixos para o pK das formas oxidadas das azurinas de *Ps. chlororaphis*. A elucidação das razões dos comportamentos peculiares destas azurinas dependerá provavelmente da resolução das suas estruturas por métodos espectroscópicos (RMN) ou cristalografia.

Também se observa uma dependência inédita do coeficiente de difusão da azurina de DSM 50083^T com o pH, que não é detectada na azurina de DSM 50135. A variação associada ao processo de protonação poderá ser devida a mudanças conformacionais, ou à formação de agregados supramoleculares. Estudos de espectroscopia de RMN e determinação da massa molecular da espécie por equilíbrio de sedimentação ou por filtração em gel a vários valores de pH poderão ajudar a elucidar o mecanismo subjacente a este processo. Apesar das grandes semelhanças apresentadas entre as duas azurinas estudadas, a variação do coeficiente de difusão da azurina de DSM 50083^T com o pH sugere a existência de diferenças estruturais (com possíveis implicações fisiológicas) entre as duas proteínas.

4

ENZIMAS DA DESNITRIFICAÇÃO (I): AS REDUTASES DO NITRITO

4.1 INTRODUÇÃO

A redutase do nitrito é a enzima-chave das quatro redutases dissimilatórias da via desnitrificante, uma vez que é neste ponto do processo que ocorrem perdas significativas do azoto fixado, dos solos para a atmosfera. Em bactérias desnitrificantes encontram-se dois tipos de NiRs completamente diferentes, distinguíveis pelos seus grupos prostéticos: um contém citocromo cd_1 e outro contém cobre. O citocromo cd_1 é um homodímero periplasmático que possui como grupos prostéticos um hemo *c*, que actua como centro de transferência electrónica, e um hemo d_1, não covalentemente ligado, onde ocorre a catálise. As CuNiR apresentam uma estrutura quaternária trimérica e contêm dois tipos de centros de cobre, tipo 1 (T1Cu) e tipo 2 (T2Cu). O T1Cu tem a função de transferência electrónica enquanto que o T2Cu é o centro catalítico, onde ocorre a ligação e redução do substrato.

4.2 REDUTASE DO NITRITO DE *PS. CHLORORAPHIS* DSM 50135

4.2.1 Purificação

Uma proteína com actividade de redutase do nitrito foi isolada de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 crescida em condições desnitrificantes (conforme descrito na secção 7.4.3). A enzima exibe uma cor azul e é detectada no extracto celular solúvel, tal como previsto pelos resultados dos ensaios enzimáticos descritos na secção 2.4.1.2, que permitiram determinar uma localização periplasmática para a enzima.

A sua purificação está esquematicamente representada na Figura 4.1. Este processo permitiu a obtenção de ≈40 mg de proteína activa e electroforeticamente pura (Figura 4.2), com um índice de pureza (A_{280}/A_{598})=18.8. Na literatura, as razões A_{280}/A_{590} apresentadas para outras redutases azuis do nitrito são normalmente inferiores a 15 (Denariaz *et al.*, 1991).

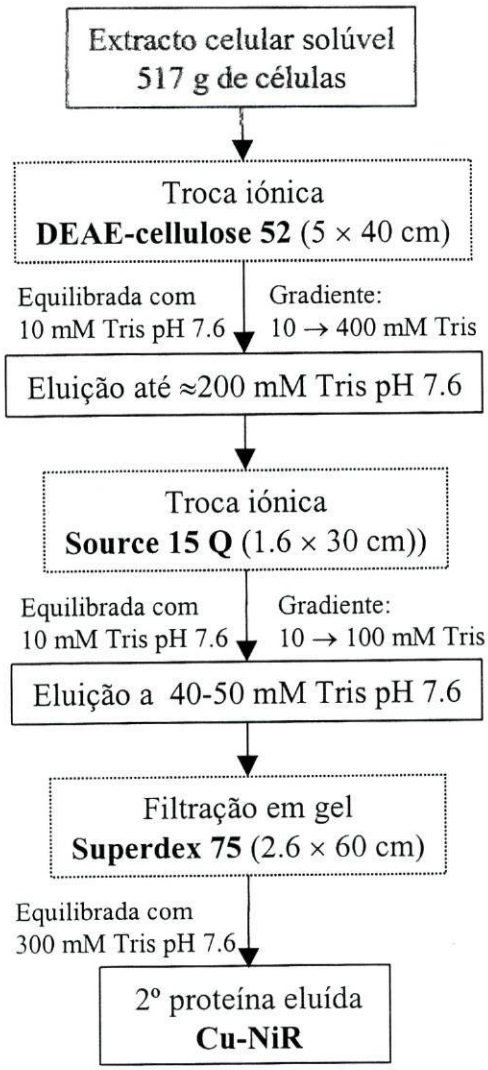


Figura 4.1 Esquema de purificação da redutase do nitrito de *Ps. chlororaphis* DSM 50135.

4.2.2 Caracterização bioquímica

4.2.2.1 Massa molecular e ponto isoeléctrico

A massa molecular da proteína foi determinada em condições nativas por filtração em gel (107 kDa) e em condições desnaturantes por SDS-PAGE (37.7 kDa) (Figura 4.2). Estes resultados indicam que, tal como as outras redutases do nitrito de cobre, se trata de uma proteína homotrimérica (Zumft, 1997).

Quando submetida a um processo de focagem isoeléctrica, a proteína focou numa faixa de valores entre 5.4 e 6.2, não sendo visíveis bandas bem definidas. Tendo

em conta o elevado grau de pureza da proteína, este resultado não pode ser devido a contaminantes, podendo explicar-se por desnaturação da proteína perto do pI, ou pela existência de várias isoformas da enzima. Os valores de pI de redutases do nitrito contendo cobre descritas na literatura (Zumft, 1997) também são acídicos, excepto no caso da proteína de *Alcaligenes xylosoxidans* NCIB 11015. O pI determinado para a CuNiR de *Ps. aureofaciens* é de 6.05, valor que se encontra dentro do intervalo obtido para a proteína em estudo.

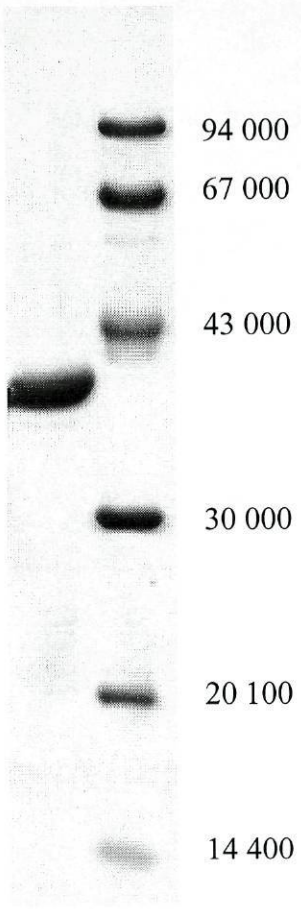


Figura 4.2 Electroforese em gel de poliacrilamida (12 %) em condições desnaturantes. Redutase do nitrito de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 (à esquerda); padrões de peso molecular (à direita).

4.2.2.2 Conteúdo em cobre

O conteúdo da enzima em cobre foi determinado por absorção atómica e por quantificação de spin, tendo-se obtido, respectivamente, os valores de 3.2 e 4.0 Cu / trímero. De acordo com a estrutura cristalográfica de várias redutases do nitrito de cobre (Dodd *et al.*, 1997; Godden *et al.*, 1991), esperar-se-iam 2 Cu / monómero, ou seja, 6 centros de cobre em cada molécula de proteína, sendo metade do tipo 1 (T1Cu) e outra metade do tipo 2 (T2Cu). No entanto, os valores relatados na literatura não excedem, normalmente, os 4.6 átomos de cobre por holoenzima (Cutruzzolà, 1999), o que traduz perdas durante o processo de purificação, principalmente do cobre tipo 2, mais lábil (Abraham *et al.*, 1993; Libby & Averill, 1992). Na tentativa de regenerar os centros demetalados procedeu-se, então, à incubação de uma pequena alíquota da proteína com $CuSO_4$, seguida de diálise extensiva contra Tris 100 mM pH 7.6, conforme descrito na secção 7.15.3. Estas experiências de reconstituição foram monitorizadas por RPE, observando-se regeneração parcial do centro de cobre tipo 2. Conseguiu-se assim um aumento da razão T1Cu: T2Cu de 1: 0.37, na forma nativa, para 1: 0.50, na forma reconstituída. Os resultados da quantificação de spin para a NiR nativa e reconstituída são apresentados na Tabela 4.1. A análise destes valores permite concluir que só ocorreu reconstituição de alguns centros T2Cu, não se observando alterações nos centros T1Cu.

Tabela 4.1 Número de centros de cobre por trímero de NiR, determinados por quantificação de spin [a].

	T1Cu	T2Cu
CuNiR nativa	2.9	1.1
CuNiR regenerada	2.9	1.5

[a] Usou-se CuEDTA(aq) como padrão.

A alíquota regenerada foi utilizada nos ensaios cinéticos e electroquímicos realizados. Nos estudos espectroscópicos utilizou-se enzima na forma isolada, sem ser submetida ao processo de regeneração.

4.2.2.3 Ensaios enzimáticos

Foi feito um estudo preliminar para a determinação dos parâmetros cinéticos da enzima, usando benzilviologénio como dador de electrões (≈100 μM BV_{red}), tendo-se determinado uma actividade específica de 130 U/mg de proteína (1 U=1 μmol NO_2^- min^{-1}) em presença de largo excesso de substrato (50 mM nitrito, pH 7.0), *i.e.*, um número de conversão de 243 (NO_2^- reduzido) s^{-1} $(CuNiR)^{-1}$. Observa-se que a enzima purificada representa apenas ≈2% da actividade total medida no extracto celular bruto. Este baixo rendimento obtido na purificação pode ser explicado não só pelas normais perdas de proteína ocorridas durante qualquer processo de purificação, mas também pela elevada labilidade do centro de cobre tipo 2 (cf. Tabela 4.1, forma regenerada), de cujo conteúdo depende a actividade enzimática (Libby & Averill, 1992) e que não ultrapassa os 50% do valor previsto. Tal como esperado, a proteína é inibida por DDC e cianeto (cf. capítulo 2).

Medições a diferentes concentrações de nitrito (40 μM–20 mM) sugerem a existência de desvios relativamente ao esperado a partir do mecanismo simples de Michaelis-Menten: a representação de Lineweaver-Burke não é linear em toda a gama utilizada, indiciando uma mudança de comportamento a concentrações de substrato superiores a ≈500 μM. Porém, a actividade da redutase do nitrito com o benzilviologénio depende também da concentração inicial da forma ***reduzida*** deste dador de electrões, o que torna o ensaio utilizado (cf. capítulo experimental, secção 7.16.2) particularmente sensível a pequenas variações das condições iniciais. Estas dificuldades inviabilizaram o estudo aprofundado do comportamento cinético desta redutase com dadores artificiais de electrões.

4.2.3 Espectroscopia de Absorção Electrónica

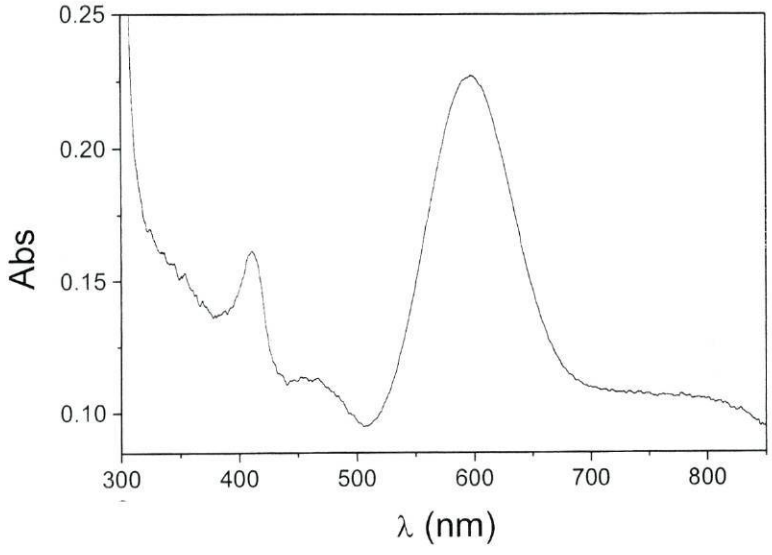


Figura 4.3 Espectro de UV-vis da redutase do nitrito de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 na sua forma nativa (CuNiR azul). Condições: [CuNiR]=23 μM em 20 mM Tris pH 7.6.

O espectro de UV-vis da forma nativa da CuNiR (Figura 4.3) apresenta máximos de absorção a 280, 460 e 598 nm e também uma banda larga a ≈780 nm, com valores de absortividade molar de ε_{460}=4.89 $mM^{-1}cm^{-1}$, ε_{598}=9.87 $mM^{-1}cm^{-1}$ e ε_{780}=4.63 $mM^{-1}cm^{-1}$, determinados assumindo uma massa molecular de 113 kDa para a proteína. A banda a 598 nm é uma banda de transferência de carga $S_{Cys}\,\pi \rightarrow Cu\ d_{x^2-y^2}$, característica de centros de cobre tipo 1 (Solomon *et al.*, 1992), tendo a banda a 460 nm origem numa segunda transição $S_{Cys} \rightarrow Cu$. Na literatura tem-se correlacionado um aumento na intensidade desta última banda com uma maior distorção rômbica do sinal de RPE respectivo, e com a passagem da cor da proteína de azul para verde (Berks *et al.*, 1995). Isto verifica-se na NiR de *Ps. chlororaphis* DSM 50135, que tem uma cor azul e apresenta uma razão A_{460}/A_{598} de 0.496, enquanto que as redutases verdes do nitrito apresentam para a referida razão valores superiores à unidade (Denariaz *et al.*, 1991). Estas diferentes características espectroscópicas reflectem diferentes orientações da

cadeia lateral da metionina axial nas redutases azuis e verdes (Inoue *et al.*, 1998; Dodd *et al.*, 1998). Segundo Dodd *et al.*, a comparação da estrutura da redutase azul de *Al. xylosoxidans* NCIMB 11015 com a redutase verde de *Al. faecalis* S-6, revela que o desvio do átomo S_{δ}(Met144) da posição axial do plano NNS formado por dois átomos N_{δ}(His89 e His139) e um átomo S_{β}(Cys130) causa a diferença nas cores das enzimas.

Observa-se também um pico a 411 nm que se deve, provavelmente, a uma contaminação de um citocromo, avaliada em ≈2% de proteína total.

4.2.4 Transferência electrónica entre a redutase do nitrito e a azurina do mesmo organismo

Uma vez que a azurina é um possível dador fisiológico de electrões à redutase do nitrito (Dodd *et al.*, 1998), procedeu-se ao estudo da transferência electrónica entre estas duas proteínas por métodos espectrofotométricos e electroquímicos.

No ensaio espectrofotométrico (realizado sob atmosfera inerte, por a azurina reduzida ser facilmente oxidável pelo oxigénio) seguiu-se a reoxidação da azurina através da intensidade da banda a 625 nm. Após redução com ditionito, observou-se reoxidação da azurina apenas na presença de nitrito *e* redutase do nitrito, mas não na presença de substrato ou enzima separadamente. A curva de oxidação da azurina é bifásica, com uma região linear inicial, seguida de uma fase não linear extensa. Usando uma concentração de azurina de 25 μM, a pH 7.0 e em presença de 50 mM de nitrito, determinou-se uma actividade específica de 0.33 U/mg CuNiR, que equivale a um número de conversão de 0.62 (NO_2^- reduzido) s^{-1} $(CuNiR)^{-1}$, substancialmente superior aos valores descritos para as azurinas I e II de *Al. xylosoxidans* NCIB 11015, respectivamente 0.07 e 0.06 (NO_2^- reduzido) s^{-1} $(CuNiR)^{-1}$ (valores calculados a partir dos dados apresentados em Dodd *et al.*, 1995).

O efeito da adição de CuNiR a uma solução de azurina na presença de nitrito foi estudado por voltametria cíclica, a diversas velocidades de varrimento (Figura 4.4).

Obtiveram-se voltamogramas com forma sigmoidal, que indicam a existência de um estado estacionário de $CuNiR_{red}$ na camada reaccional perto da superfície do eléctrodo. Só se observa catálise no sentido da redução do nitrito, uma vez que a corrente catódica é a única que aumenta. Observa-se também que a corrente catalítica é independente da velocidade de varrimento e proporcional à raiz quadrada da concentração de enzima, o que indica que a elevada corrente catódica é devida à regeneração catalítica da azurina reoxidada pela NiR (Nicholson & Shain, 1964).

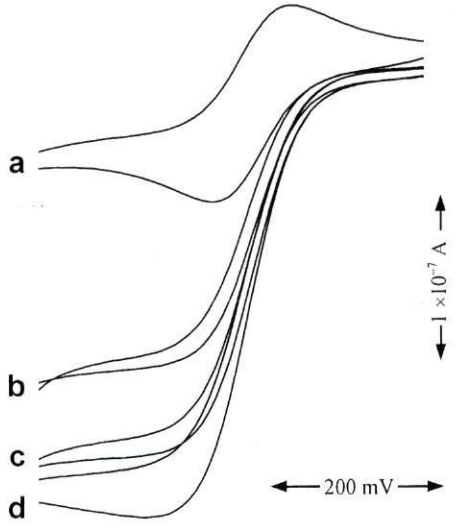


Figura 4.4 Efeito da CuNiR de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 na resposta electroquímica da Az626, do mesmo organismo, em presença de nitrito. (a) Az626 400 μM em tampão MES 50 mM pH 6.2 e 50 mM KCl. (b-d) Adição de NiR em concentrações crescentes: 1.7, 3.3 e 6.5 μM NiR. [nitrito]=50 mM. Velocidade de varrimento, 2 mV/s.

Este comportamento é consistente com um mecanismo de reacção envolvendo uma reacção de transferência electrónica heterogénea inicial, seguida por uma reacção química homogénea (Figura 4.5), e que pode ser simplificadamente representado por

$$O + e^- \rightleftharpoons R$$

$$R + Z \rightarrow O$$

desde que certas condições sejam obedecidas:

1) a transferência electrónica heterogénea (Figura 4.5, passo E) deve ser reversível e monoelectrónica;
2) a reacção química homogénea (Figura 4.5, passo C1') deve ser irreversível;
3) os coeficientes de difusão das espécies O (azurina oxidada), R (azurina reduzida) e Z (NiR oxidada) devem ser semelhantes;
4) a reacção química homogénea deve ser de pseudo-primeira ordem, com uma constante de velocidade dada por $k' = k$ [Z], em que k é a constante de velocidade de segunda-ordem e [Z] é a concentração de NiR.

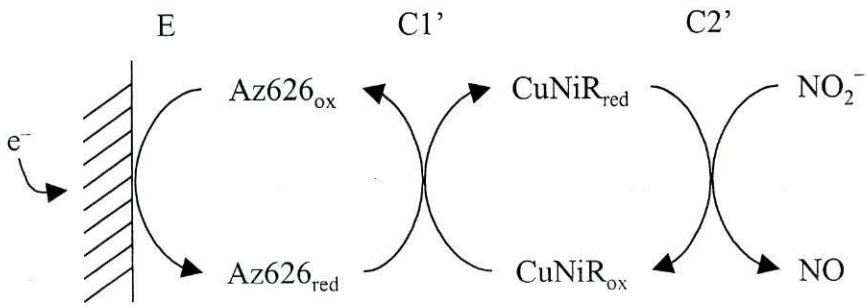


Figura 4.5 Representação esquemática do sistema electroquímico catalítico Az626, CuNiR, NO_2^- (EC1'C2'). (E) reacção de transferência electrónica directa da Az626 no eléctrodo de ouro modificado; (C1') redução da CuNiR pela Az626 e (C2') redução enzimática do substrato (NO_2^-) pela CuNiR reduzida.

Conforme descrito na secção 3.1.5, o comportamento electroquímico da azurina é reversível, controlado por difusão e monoelectrónico. As restantes condições podem ser respeitadas se a escala de tempo for suficientemente pequena (ex: velocidades de varrimento elevadas, em voltametria cíclica). Neste caso:

a) as condições de primeira ordem são obedecidas, mesmo não havendo um largo excesso de enzima relativamente à azurina, desde que a extensão da reacção entre a azurina e a enzima oxidada não provoque uma depleção significativa de enzima, *i.e.*, se a taxa de reciclagem da $CuNiR_{ox}$ for alta e não limitante da corrente catalítica (vide infra);

b) a diferença dos coeficientes de difusão das espécies que reagem pode ser desprezada, uma vez que a concentração da enzima na interface com o eléctrodo é praticamente constante (nesta escala temporal);

c) pode considerar-se irreversível a reacção entre a CuNiR e a azurina, devido ao excesso de nitrito na solução, que desloca o equilíbrio para a redução da CuNiR;

A teoria que descreve este tipo de mecanismos foi desenvolvida por Nicholson & Shain (1964) e Savéant & Vianello (1965) e é aplicada correntemente em estudos cinéticos de reacções entre mediadores e enzimas redox (Hoogvliet *et al.*, 1988; Lopes *et al.*, 2000). O cálculo das constantes de velocidade de segunda ordem (*k*) foi efectuado conforme descrito na secção experimental 7.22.2 . Na determinação dos parâmetros λ a partir das eficiências catalíticas usaram-se os valores calculados por Nicholson & Shain (reproduzidos no Apêndice 1), procedendo-se depois à determinação dos valores de *k* de acordo com a Equação 4.1.

$$\lambda = k\left(\frac{RT}{nF}\right)[CuNiR]\times\frac{1}{\nu} \qquad \text{(Equação 4.1)}$$

As representações gráficas do parâmetro λ contra o inverso da velocidade de varrimento (Figura 4.6) originam linhas rectas, o que confirma a aplicabilidade do modelo de Nicholson & Shain nas condições utilizadas.

A dependência das constantes de pseudo-primeira ordem com a concentração de CuNiR é apresentada na Figura 4.7. A partir do declive desta recta obteve-se para a constante de velocidade de transferência electrónica de segunda ordem o valor de $2.9\times10^{4}\ M^{-1}s^{-1}$.

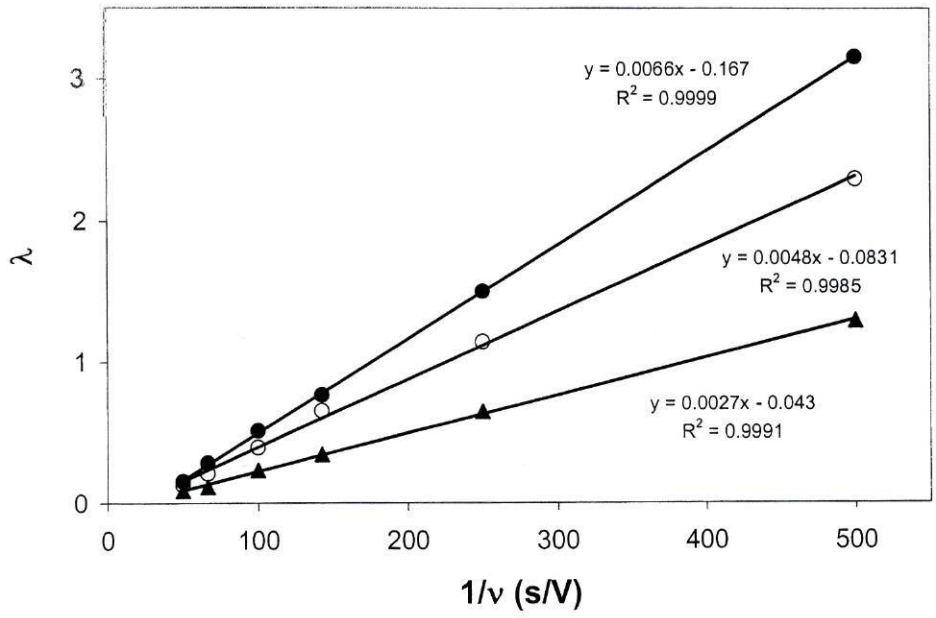


Figura 4.6 Variação do parâmetro cinético (λ) com o inverso da velocidade de varrimento (1/ν) para concentrações crescentes de CuNiR: (▲) 1.7 μM, (○) 3.3 μM e (●) 6.5 μM. Condições: [azurina]=400 μM em 50 mM MES pH 6.2 e 50 mM KCl; [nitrito]=50 mM.

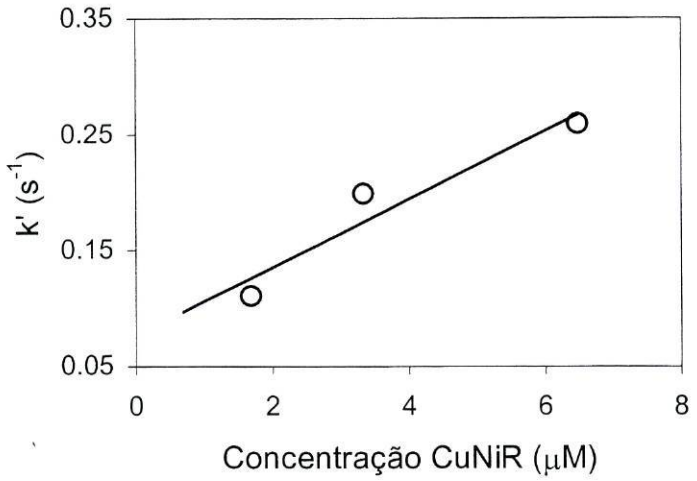


Figura 4.7 Variação da constante de velocidade de transferência electrónica de pseudo-primeira ordem (k') com a concentração de CuNiR. Condições: [azurina]=450 μM em 50 mM MES pH 6.2 e 50 mM KCl; [nitrito]=50 mM.

O tratamento descrito é válido se a velocidade de reciclagem de $CuNiR_{ox}$ (expressa pela Equação 4.2) não for limitante da corrente catalítica, *i.e.*, se o passo limitante do mecanismo for a transferência electrónica entre a azurina e a CuNiR (cuja velocidade é expressa pela Equação 4.3).

$$V_1 = k_{ap}\,[\mathrm{CuNiR}] \qquad \text{(pH constante, grande excesso de } NO_2^-) \qquad \text{(Equação 4.2)}$$

$$V_2 = k\,[\text{azurina}][\mathrm{CuNiR}] \qquad \text{(Equação 4.3)}$$

A aplicabilidade do tratamento de Nicholson & Shain implica que $V_2 < V_1$, o que permite determinar um valor mínimo de 13 s^{-1} para k_{ap}. Este valor é claramente inferior ao número de conversão de 243 s^{-1}, apresentado na secção 4.2.2.3, confirmando que o referido tratamento é aplicável ao caso em estudo.

Tabela 4.2 Valores das constantes de transferência electrónica determinados por voltametria cíclica em sistemas catalíticos fisiologicamente relevantes.

Organismo	**transferência electrónica**	$k \times 10^5\ M^{-1} s^{-1}$
Al. faecalis [a]	pAz → CuNiR	18
A. cycloclastes [b]	pAz → CuNiR	7.3
Al. xylosoxidans [c]	Cyt. c_{551} →CuNiR	4.0
Ps. nautica [d]	Cyt. c_{552} → cd_1NiR	4.7
Methylomonas sp. [e]	Az-iso2 → MADH	1.0
Ps. chlororaphis	Az626 → CuNiR	0.29

[a] Iwasaki *et al.*, 1992; [b] Kohzuma *et al*, 1993; [c] Deligeer *et al.*, 2000; [d] Lopes *et al.*, 2001; [e] Suzuki *et al.*, 1999b

Na Tabela 4.2 apresentam-se os valores das constantes de transferência electrónica determinados por voltametria cíclica noutros sistemas catalíticos fisiologicamente relevantes. Os dados apresentados mostram que a transferência electrónica entre a Az626 e a CuNiR ocorre a taxas mais baixas do que as observadas nos outros sistemas e levanta a hipótese da azurina não ser o redutor fisiológico da CuNiR neste organismo. Dados recentes sugerem que a NiR de *Al. xylosoxidans* GIFU 1051 recebe electrões do citocromo c_{551} e não das azurinas I e II presentes (Suzuki *et al.*, 1999a; Deligeer *et al.*, 2000), o que levanta dúvidas sobre o significado fisiológico da transferência electrónica lenta observada entre as azurinas I e II e a NiR de *Al. xylosoxidans* NCIB 11015 (Dodd *et al.*, 1995), referida no início desta secção. É importante notar, no entanto, que a CuNiR de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 reage com a sua azurina a velocidades cerca de dez vezes superiores às observadas em *Al. xylosoxidans* NCIB 11015.

4.2.5 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica

O tensor *g* dos iões Cu(II) tem uma geometria axial ou quasi-axial característica. Os espectros de RPE de ambos os centros de cobre, T1Cu e T2Cu, são consistentes com um estado fundamental $d_{x^2-y^2}$, com $g_{\|} > g_{\perp} > 2$. Os centros T1Cu caracterizam-se por uma intensa cor azul ou azul-esverdeada e $^{Cu}A_{\|} < 7$ mT. Os centros T2Cu são, em geral, representativos dos complexos de Cu(II) típicos, com $^{Cu}A_{\|} > 13$ mT. (Solomon *et al.*, 1992). Ambos os tipos de centros de cobre apresentam geometria tetraédrica distorcida, estando o T1Cu coordenado por duas histidinas, uma cisteína e uma metionina, e o T2Cu por três histidinas e um ligando exógeno (solvente ou substrato) (Dodd *et al.*, 1998).

Obtiveram-se espectros da proteína nas suas formas nativa, reduzida com ascorbato, reduzida com ditionito e "turnover"[1], que se apresentam na Figura 4.8. As medições de RPE com a CuNiR foram realizadas à temperatura de 40 K (usando uma potência de 2 mW), uma vez que a temperaturas inferiores o sinal satura muito facilmente. A 80 K o sinal apresenta-se ligeiramente mais largo, o que prejudica a sua análise.

O espectro da forma nativa da CuNiR apresenta dois componentes sem interacções magnéticas entre si. O número de desdobramentos observados na região de campo baixo (250-325 mT) revela que ambos os componentes têm origem em sistemas de spin nuclear 3/2, *i.e.*, no cobre. Por adição de ascorbato um dos componentes é reduzido, tornando-se silencioso em RPE, enquanto o outro se mantém na forma oxidada. Este componente apresenta um espectro rômbico (g_z=2.350, g_y=2.110, g_x=2.040) com estrutura hiperfina na região de g_z (4 linhas) cuja constante $^{Cu}A_z$ é de 10.7 mT. Estas propriedades identificam este sistema como um centro de cobre tipo 2, atribuído noutras redutases do nitrito ao centro catalítico da enzima (Libby & Averill, 1992). A obtenção deste espectro permitiu realizar facilmente a desconvolução do espectro nativo e caracterizar o componente em falta. Este apresenta um espectro quasi-axial (g_z=2.220, g_y=2.052, g_x=2.036), com estrutura hiperfina na região de g_z (4 linhas) e constante $^{Cu}A_z$ de 5.79 mT, o que identifica claramente o centro como um cobre de tipo 1, presumivelmente envolvido em transferência electrónica intramolecular (Suzuki *et al.*, 1994).

---

[1] Designa-se por forma "turnover" a forma da enzima envolvida no ciclo catalítico, obtida por incubação anaeróbica breve da forma reduzida da enzima com substrato.

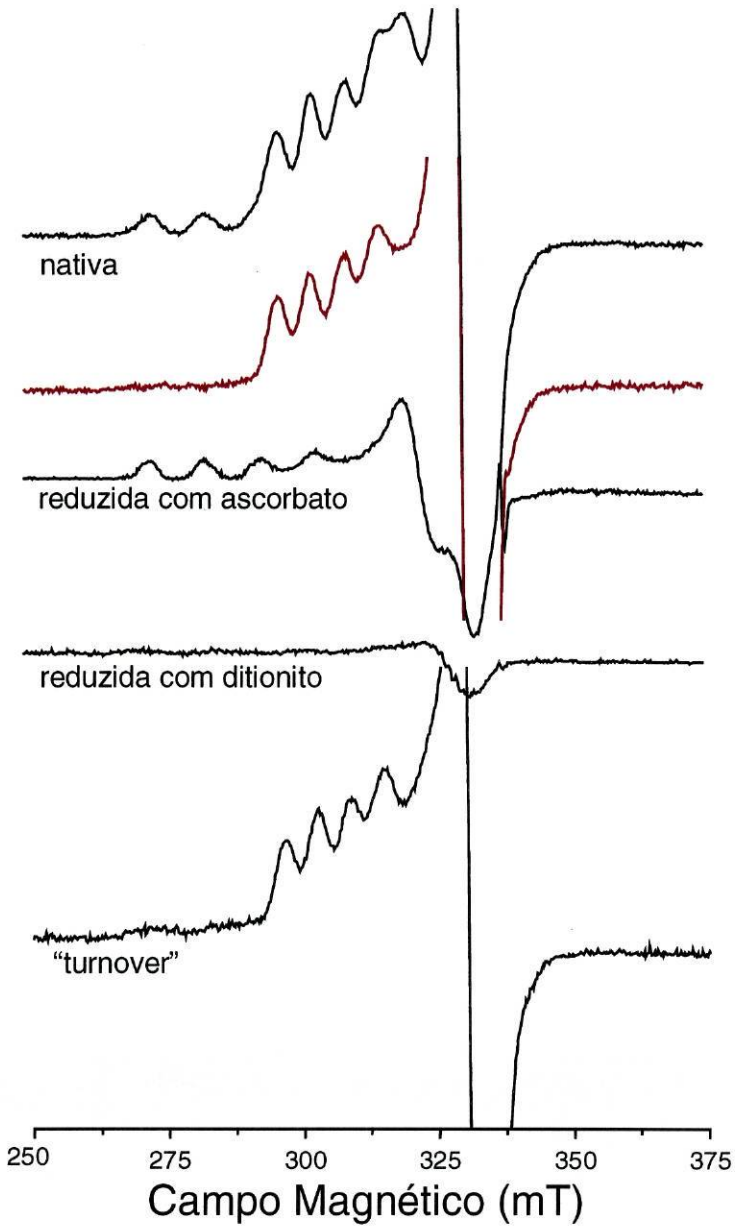


Figura 4.8 Espectros de RPE da redutase do nitrito de *Ps. chlororaphis* DSM 50135. Formas nativa, reduzida com ascorbato, reduzida com ditionito e "turnover" (breve incubação anaeróbica com nitrito); a vermelho, espectro diferença *nativo-reduzido com ascorbato*. Utilizou-se uma amostra de concentração 340 μM em 300 mM Tris pH 7.6. Condições instrumentais: frequência das microondas, 9.49 GHz; potência, 2 mW; modulação de amplitude, 4 G; temperatura, 40 K.

Por redução com ditionito, o T2Cu é também reduzido a uma forma silenciosa em RPE. A reoxidação da proteína com nitrito em condições anaeróbicas (adição de nitrito sob fluxo de N_2 e congelamento imediato) permite observar o espectro da enzima na forma "turnover". Nestas condições, observa-se oxidação parcial da proteína, sendo a extensão da oxidação do centro T1Cu bastante superior à do centro T2Cu. Isto sugere que a transferência electrónica entre o T1Cu e o T2Cu é o mais rápido dos três processos redox envolvidos na catálise: 1) redução do T1Cu pelo ditionito; 2) oxidação do T1Cu pelo T2Cu; e 3) redução do NO_2^- pelo T2Cu — com concomitante oxidação do T2Cu (Kobayashi *et al.*, 1999). A forma oxidada do centro T2Cu durante a catálise apresenta diferenças na constante de acoplamento e no valor de g_z (cf. Tabela 4.3), sugerindo a existência de modificações no centro catalítico da enzima. Estas modificações podem ser atribuídas à presença do substrato ou produto ligado ao centro activo da proteína, T2Cu, uma vez que a reoxidação em presença de ferricianeto (condições anaeróbicas) é completa e dá origem a um espectro indistinguível do observado na forma nativa da enzima (dados obtidos durante a titulação redox, secção 4.2.5.1). Na literatura é já conhecida uma alteração no espectro de RPE da NiR de *Al. xylosoxidans* NCIB 11015 por adição de nitrito (Howes *et al.*, 1994).

Após análise e desconvolução, fez-se a simulação dos espectros (cf. secção 7.21.2) tendo-se obtido os parâmetros apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 Parâmetros de RPE dos centros de cobre tipo 1 e tipo 2 da redutase do nitrito de *Ps. chlororaphis* DSM 50135.

	g_z	g_y	g_x	$^{Cu}A_z$ (mT)
T1Cu	2.220	2.052	2.036	5.79
T2Cu				
sem NO_2^-	2.350	2.110	2.040	10.7
com NO_2^-	2.34	*n.d.*	*n.d.*	12

n.d., não determinado.

4.2.5.1 Titulação redox

Os potenciais de redução das redutases do nitrito de cobre encontram-se deficientemente caracterizados. A informação disponível provém de titulações electroquímicas seguidas por espectroscopia de UV-vis (Olesen *et al.*, 1998), que apenas fornece indicações sobre o estado de oxidação do T1Cu (Suzuki *et al.*, 1997). Os potenciais do centro T2Cu têm sido estimados indirectamente no decurso de estudos cinéticos de radiólise de impulsos, e não de estudos electroquímicos em situações de equilíbrio (cf. Tabela 4.4) (Suzuki *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1997; Farver *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 1999). Para desenvolver modelos apropriados do mecanismo da CuNiR é vital determinar os potenciais de ***ambos*** os centros de cobre, em especial para compreender a relação entre a catálise redox e a transferência electrónica intramolecular.

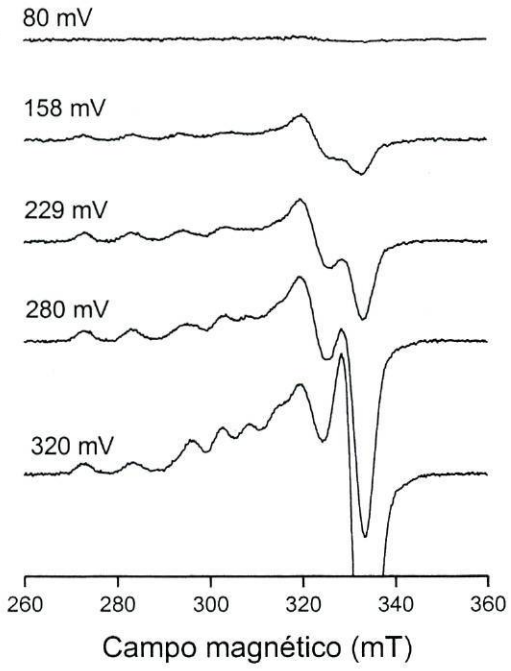


Figura 4.9 Espectros de RPE obtidos durante a titulação redox da redutase do nitrito de *Ps. chlororaphis* DSM 50135. Utilizou-se uma amostra de 81 μM de proteína em 75 mM Tris pH 7.6, em presença de 2 μM de uma mistura adequada de mediadores redox. Condições instrumentais: frequência das microondas, 9.49 GHz; potência, 0.6 mW; modulação de amplitude, 10 G; temperatura, 40 K.

Ao contrário da espectroscopia de UV-vis, a espectroscopia de RPE permite seguir simultaneamente o estado de oxidação de ambos os centros de cobre. Efectuou-se portanto uma titulação da CuNiR, conforme descrito na secção 7.21.1, tendo-se monitorizado cada um dos centros de cobre por RPE. Procedeu-se inicialmente à redução completa da proteína, seguida de reoxidação em pequenos passos, tendo-se observado uma boa resistência da proteína a todo o processo, uma vez que a forma nativa inicial e a forma reoxidada final apresentam espectros praticamente indistinguíveis. Na Figura 4.9 e Figura 4.10 apresentam-se os resultados da titulação.

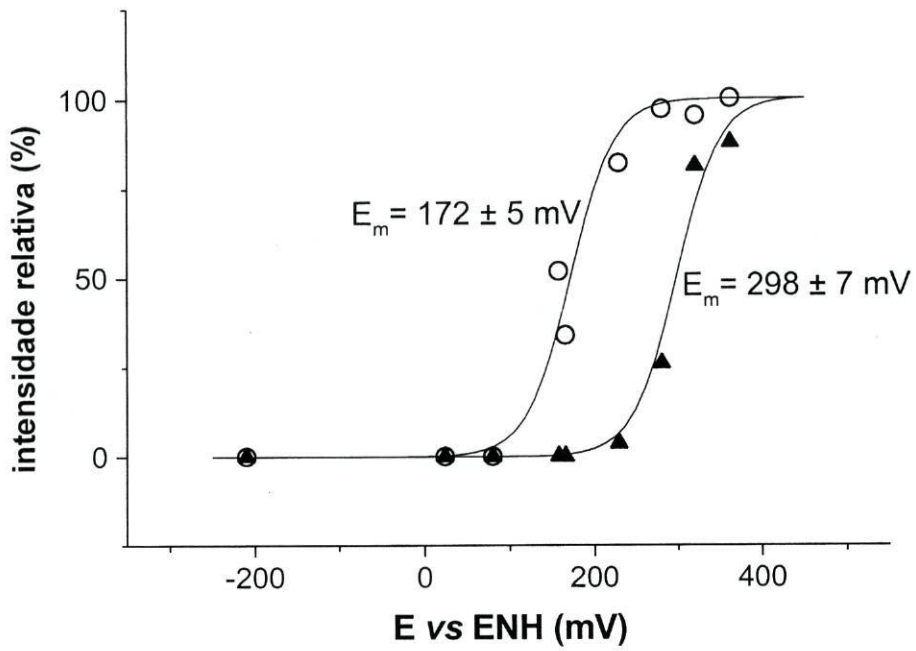


Figura 4.10 Titulação redox da redutase do nitrito de *Ps. chlororaphis* DSM 50135, a pH 7.6, monitorizada por RPE. (▲) T1Cu; (○) T2Cu. As quantificações foram feitas com base nas áreas dos espectros, conforme descrito na secção experimental. O ajuste da curva foi feito com o programa Microcal Origin, usando a equação de Nernst (cf. Apêndice 2). A intensidade foi normalizada para a máxima intensidade determinada pelo ajuste respectivo.

Tal como verificado noutras CuNiRs (cf. Tabela 4.4), o potencial do centro activo da CuNiR de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 (E_mT2Cu = 172 mV) é inferior ao potencial do seu centro de transferência electrónica (E_mT1Cu = 298 mV). É portanto de esperar que a

transferência de electrões do centro T1Cu para o centro T2Cu seja bastante lenta nestas condições, uma vez que se realiza ***contra*** o potencial eléctrico. No entanto, a adição de nitrito à forma reduzida da enzima causa uma oxidação bastante mais extensa do T1Cu do que do T2Cu (cf. Figura 4.8), sugerindo que o processo de transferência electrónica é cinética e termodinâmicamente muito favorecido. Estas observações indicam que provavelmente a ligação do nitrito à forma oxidada do centro T2Cu aumenta o seu potencial redox, tornando o processo de transferência electrónica bastante mais espontâneo, situação também verificada por estudos de ENDOR realizados na CuNiR de *Rh. sphaeroides* (Veselov *et al.*, 1998). Em *Al. xylosoxidans* GIFU 1051 o potencial do centro T2Cu depende do pH, e é cerca de 100 mV mais alto na forma protonada da enzima do que na desprotonada (Kobayashi *et al.*, 1999), sendo o potencial do T1Cu independente do pH. Supondo que esta dependência de E_mT2Cu com o pH também se verifica na NiR em estudo, é de esperar que a pHs mais baixos (a titulação foi efectuada a pH 7.6) a transferência intramolecular na presença de nitrito seja ainda mais favorecida.

Tabela 4.4 Potenciais dos centros de cobre em algumas redutases do nitrito

Organismo	E_m T1Cu (mV)	E_m T2Cu (mV)
Ac. cycloclastes IAM 1013 [b, d]	240	250[a]
Al. xylosoxidans GIFU 1051 [b, d]	280	280[a]
Al. xylosoxidans NCIB 11015 [b, e]	260	240[a]
Rhodobacter sphaeroides 2.4.3 [b, f]	247	<200
Ps. chlororaphis DSM 50135 [c]	298	172

[a] valor estimado indirectamente; [b] pH 7.0; [c] pH 7.6 [d] Kobayashi *et al.*, 1999; [e] Suzuki *et al.*, 1997 [f] Olesen *et al.*, 1998

4.3 REDUTASE DO NITRITO DE *PS. CHLORORAPHIS* DSM 50083^T

4.3.1 Purificação

Procedeu-se ao isolamento de uma proteína com actividade de redutase do nitrito a partir da fracção solúvel de 230 g de células de *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T, conforme indicado na Figura 4.11. Uma vez que as células utilizadas não foram crescidas nas condições ideais para desnitrificarem (cf. secção 2.2), a expressão da referida proteína foi baixa, de modo que apenas se conseguiu um pequeno enriquecimento durante o processo de purificação. Ao contrário do observado na estirpe DSM 50135, trata-se provavelmente de uma redutase do nitrito contendo cd_1. A pequena quantidade de proteína obtida e o seu grau de pureza relativamente baixo dificultaram a sua caracterização bioquímica, cinética e espectroscópica. Como, porém, a proteína exibe alguns comportamentos não relatados na literatura até à data, optou-se por incluir estes estudos, mesmo se preliminares.

4.3.2 Caracterização bioquímica

A proteína foi analisada por electroforese em condições desnaturantes, na presença de SDS (Figura 4.12). Os resultados confirmam que se encontra ainda impura, estando enriquecida em três fracções de pesos moleculares 54.9, 51.0 e 37.4 kDa.

Quando submetida a focagem isoeléctrica, a amostra focou em várias bandas com valores de pI situados entre 4.6 e 5.4.

O teste da piridina-hemocromogénio permitiu a detecção de hemo *c* na amostra, não se tendo detectado a presença de outros hemos. Contudo, a existência de outros hemos não pode ser completamente posta de parte, devido à pequena quantidade de proteína disponível para o teste.

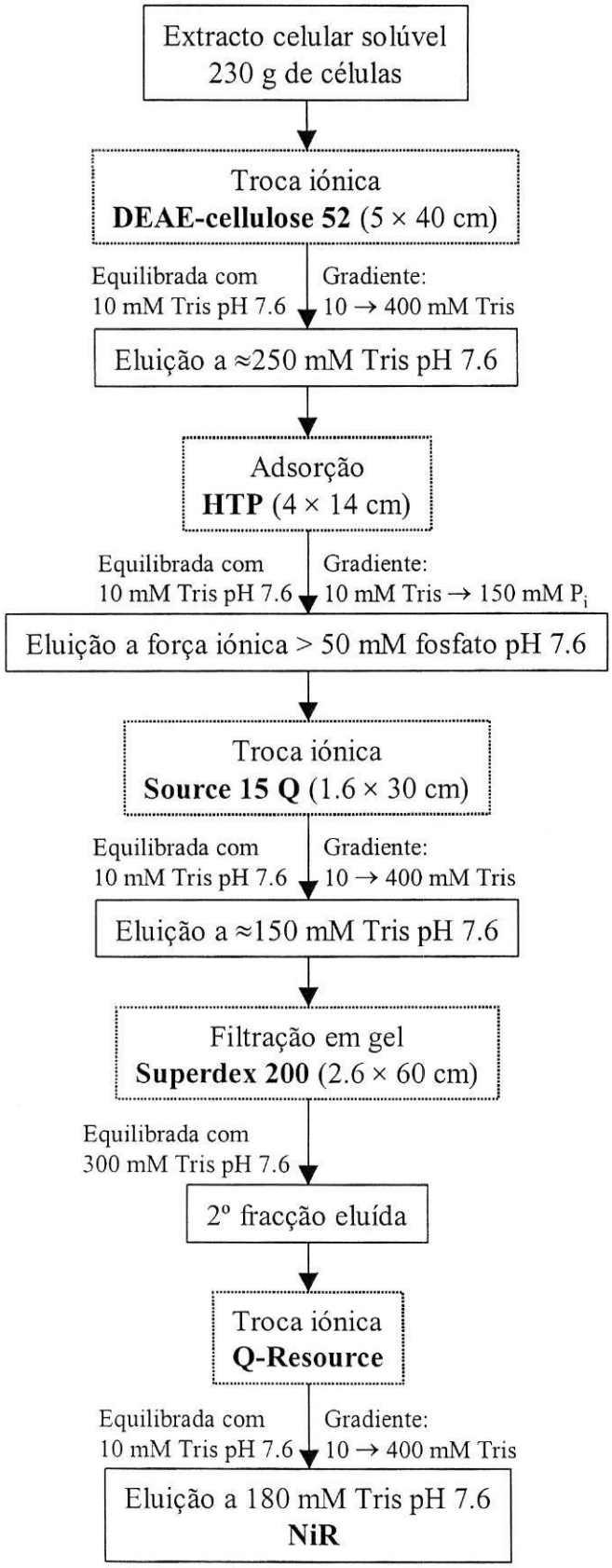


Figura 4.11 Esquema de purificação da redutase de nitrito de *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T.

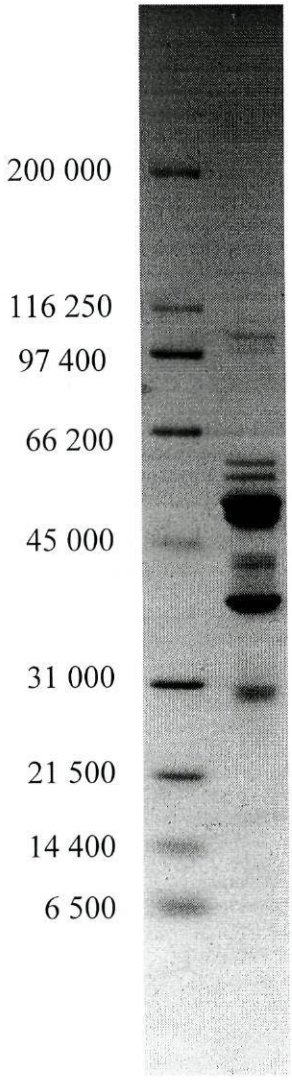


Figura 4.12 Electroforese em gel de poliacrilamida (gradiente 5-20 %) em condições desnaturantes. Padrões de peso molecular (à esquerda); redutase do nitrito de *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T (à direita).

4.3.3 Espectroscopia de Absorção Electrónica

Na Figura 4.13 apresentam-se os espectros de UV-vis da proteína na sua forma nativa e durante a redução com ditionito, em presença de nitrito. A forma nativa apresenta, para além do pico de proteína, a 279 nm, um pico a 407 nm que corresponde provavelmente à banda Soret de um hemo *c*, e três bandas a 505, 542 e 625 nm. Esta última banda pode ser atribuída a um hemo d_1. A adição de ascorbato não produziu qualquer alteração no espectro. Também não se observaram alterações por adição de ditionito, excepto quando feita em presença de nitrito, sob atmosfera de árgon. Nestas

condições, observa-se o aparecimento de uma nova banda a 427 nm, e concomitante diminuição da banda a 407 nm. Observa-se também uma diminuição das bandas a 505 e 625 nm, um aumento da intensidade da banda a 542 nm e o aparecimento de uma nova banda a 577 nm. Enquanto se manteve a atmosfera de árgon, não se observou reoxidação da proteína ou outras alterações do espectro.

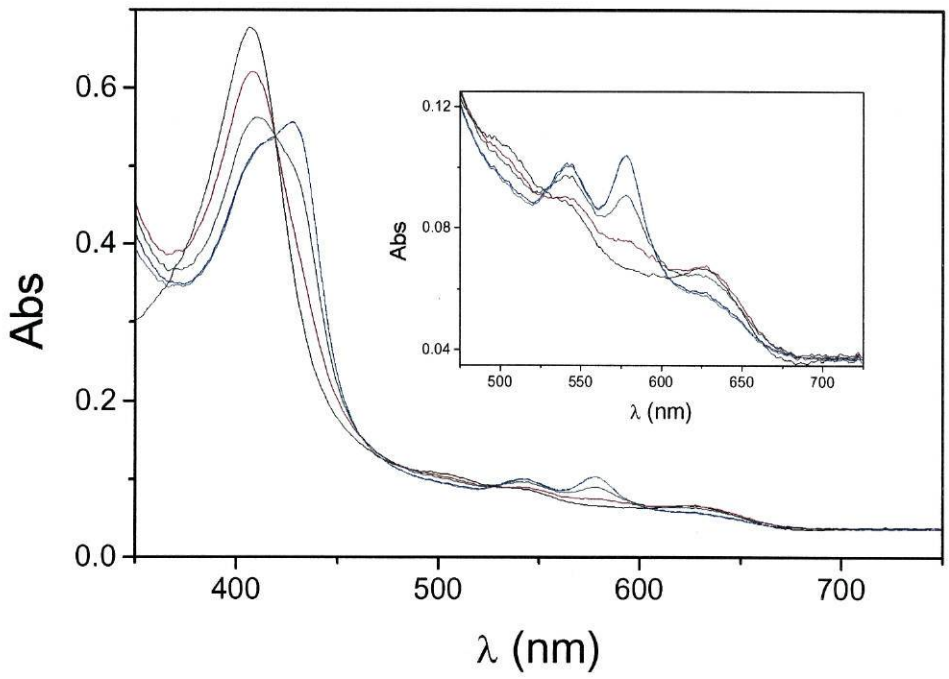


Figura 4.13 Espectros de UV-vis da redutase do nitrito de *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T, em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.0. Formas nativa (—) e reduzidas com ditionito, em presença do nitrito: incubação 30 s (—), 3 min (—), 5 min (—) e 8 min (—). Toda a experiência foi efectuada sob atmosfera de árgon.

A banda Soret a 427 nm na forma reduzida indica que o hemo *c* se encontra na forma de spin alto (Wermter & Fischer, 1983), o que é corroborado pela presença do pico a 577 nm, devido provavelmente a um complexo hemo *c*-NO. Este comportamento encontra-se descrito na literatura para as cd_1NiRs de *Ps. aeruginosa* e *Thiobacillus denitrificans*, onde é observado somente a valores de pH mais baixos (Johnson *et al.*, 1980; Liu *et al.*, 1987). Também o facto de a redutase do nitrito de DSM 50083^T só poder ser reduzida após adição de nitrito contrasta com o observado nas cd_1NiRs

típicas, uma vez que nestas o nitrito se liga apenas à forma reduzida da proteína (Cutruzzolà, 1999).

4.3.4 Caracterização cinética

Ensaiou-se a actividade de redutase do nitrito da proteína isolada, usando o benzilviologénio reduzido por ditionito como dador de electrões (Figura 4.14), conforme descrito na secção 7.16.2.

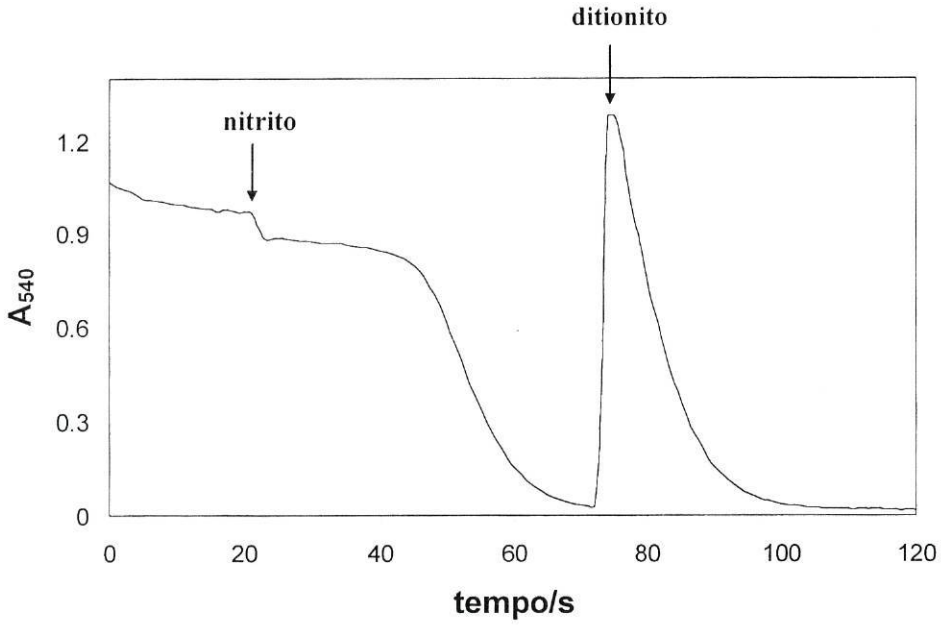


Figura 4.14 Ensaio enzimático da redutase do nitrito usando benzilviologénio reduzido como dador de electrões. A reacção foi iniciada por adição de nitrito à solução de enzima em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.0, em presença de benzilviologénio reduzido por ditionito. As adições de nitrito e ditionito estão assinaladas por setas.

Mesmo em condições redutoras, a enzima requer um período de incubação em presença de nitrito antes de iniciar o ciclo catalítico. Após o esgotamento da fonte redutora inicial, mas ainda em presença do substrato, a enzima retoma a actividade imediatamente após nova adição de ditionito. Este comportamento não se observa habitualmente na cd_1NiR, cuja forma reduzida reage com o nitrito sem necessitar de

incubação prévia e de uma forma extremamente rápida, com uma constante de velocidade estimada em pelo menos 10^8 $M^{-1}s^{-1}$ (Zumft, 1997).

4.3.5 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica

A enzima isolada apresenta um espectro de RPE rômbico com valores de *g* de 6.40, 5.41 e ≈1.99 (Figura 4.15), característicos de um sistema de spin 5/2, com estado fundamental |±1/2>, o que é compatível com a presença de um hemo *c* de spin alto. Além deste sinal, é também visível um sinal a *g*=4.3, provavelmente devido a Fe(III) ligado não-especificamente à proteína (Hagen, 1992).

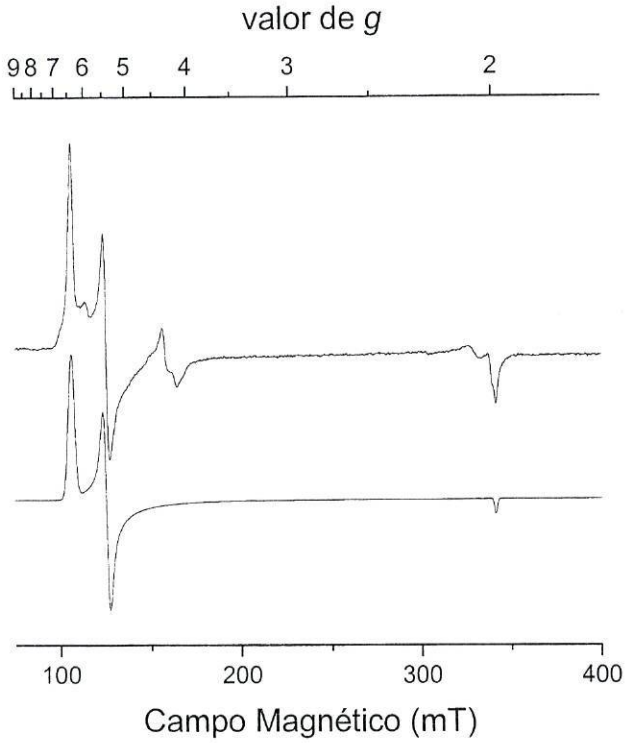


Figura 4.15 Espectro de RPE da redutase do nitrito de *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T, na sua forma nativa, em tampão Tris 0.1 M pH 7.6. Espectro experimental (em cima); simulação (em baixo). Parâmetros experimentais: frequência das microondas, 9.49 GHz; potência, 0.2 mW; modulação de amplitude, 1.0 mT; temperatura, 5 K. Parâmetros de simulação: spin electrónico, S=5/2; valores de *g*, 6.40, 5.41 e 1.99 (o valor mais baixo é estimado, devido à sobreposição de um sinal devido a uma impureza não identificada); larguras de banda, 3.3, 3.0 e 1.5 mT; 1000×100 orientações.

Os espectros de RPE da forma oxidada das cd_1NiRs típicas apresentam dois componentes, correspondentes a dois ferros hémicos hexacoordenados de spin baixo, com valores de g situados entre 2.6 e 1.7, para o hemo d_1, e entre 3.6 e 1.4, para o hemo c (Zumft, 1997). São assim evidentes, também por RPE, as diferenças entre a proteína isolada e as cd_1NiRs típicas.

4.4 CONCLUSÕES

A redutase do nitrito isolada de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 é uma enzima azul, que contém dois tipos de centros de cobre, T1Cu e T2Cu, tal como as restantes CuNiRs conhecidas. Neste trabalho efectuou-se pela primeira vez uma determinação directa dos potenciais de ambos os centros de cobre numa CuNiR, T1Cu (298 mV) e T2Cu (175 mV), cujos valores relativos parecem não ser consistentes com o mecanismo de transferência electrónica estabelecido. No entanto, e de acordo com a hipótese apresentada por Veselov *et al.* (1998), os dados de espectroscopia de RPE também sugerem que haja modulação do potencial do centro activo por ligação do substrato, *i.e.*, que a ligação do nitrito ao centro T2Cu faça aumentar o seu potencial, tornando a transferência electrónica mais favorável. Os estudos de RPE com a enzima na forma "turnover" sugerem também, conforme sugerido por Kobayashi *et al.* (1999), que a transferência electrónica entre o T1Cu e o T2Cu seja o mais rápido dos três processos redox envolvidos na catálise: 1) redução do T1Cu pelo ditionito; 2) oxidação do T1Cu pelo T2Cu; e 3) redução do NO_2^- pelo T2Cu — com concomitante oxidação do T2Cu. Recentemente, observou-se em *Al. xylosoxidans* GIFU 1051 (Kobayashi *et al.*, 1999) que o potencial do centro T2Cu aumenta a pHs baixos, sendo assim de esperar que a estes valores de pH a transferência intramolecular na presença de nitrito seja mais favorecida. O estudo da variação da actividade enzimática e dos potenciais de ambos os centros de cobre com o pH na CuNiR de *Ps. chlororaphis* é assim uma via de investigação que poderá ajudar a elucidar os aparentes entraves termodinâmicos à

transferência electrónica para o substrato. Os ensaios enzimáticos e estudos de electrocatálise efectuados revelam que existe transferência electrónica entre a CuNiR de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 e a azurina do mesmo organismo. Porém, a constante de transferência electrónica entre as duas proteínas é relativamente baixa, sugerindo que a azurina possa não ser o mais importante dador fisiológico de electrões para a CuNiR.

A redutase do nitrito isolada de *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T possui características espectroscópicas e cinéticas que a distinguem das redutases do nitrito típicas. A espectroscopia de RPE revela claramente a ausência de cobre na proteína, assim como dos sinais de spin baixo característicos dos hemos da cd_1NiR. Por RPE, detecta-se um sinal de spin 5/2, provavelmente devido a um hemo *c* de spin alto. O espectro de absorção electrónica corrobora esta identificação, e sugere também a presença de um hemo d_1. Ao contrário do observado nas cd_1NiRs típicas, a enzima isolada só parece ser susceptível de redução após ligação do substrato ao seu centro activo, sugerindo diferenças mecanísticas apreciáveis. A pequena quantidade de proteína obtida impediu porém a realização de estudos mais aprofundados (RPE das formas reduzida e ligada ao substrato, titulação redox, etc.).

5

ENZIMAS DA DESNITRIFICAÇÃO (II):

A REDUTASE DO NITRATO

5.1 INTRODUÇÃO

A capacidade de utilizar o nitrato como substrato respiratório encontra-se amplamente difundida em bactérias, conhecendo-se duas redutases dissimilatórias do nitrato bioquimicamente distintas, uma periplasmática (Nap), e uma membranar (NaR) (Richardson, 2000). A redutase do nitrato periplasmática é uma enzima dimérica expressa predominantemente em condições aeróbicas (Bell *et al.*, 1990) e que contém normalmente dois hemos *c*, um agregado FeS e um cofactor de molibdopterina (Berks *et al.*, 1995). A Nap desempenha um papel importante na manutenção do balanço redox da célula uma vez que acopla a redução do nitrato à oxidação do ubiquinol (QH_2) impedindo que a saturação deste aceitador de electrões provoque a paragem do metabolismo celular (Berks *et al.*, 1995).

A redutase membranar do nitrato (NaR) é um complexo composto por três subunidades, ancorado à face citoplasmática da membrana, com o seu centro activo localizado no compartimento citoplasmático. Duas subunidades, α e β, constituem o domínio citoplasmático enquanto que a terceira subunidade, γ, constitui o domínio membranar requerido para a ligação das subunidades α e β à face citoplasmática da membrana. É expressa em condições anaeróbicas e a sua topologia membranar permite-lhe converter a energia livre do par QH_2/NO_3^- num gradiente electroquímico transmembranar para eventual produção de energia. Possui normalmente dois hemos do tipo *b* na subunidade γ, quatro agregados de FeS na subunidade β e um dinucleótido de guanina e molibdopterina na subunidade α. A sua localização membranar dificulta a sua purificação, pelo que os pormenores do seu mecanismo se encontram pouco estudados (Guigliarelli *et al.*, 1992; Magalon *et al.*, 1997).

5.2 PURIFICAÇÃO

A redutase do nitrato de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 foi isolada das membranas de células crescidas em condições desnitrificantes, conforme descrito na secção experimental.

Na Figura 5.1 apresentam-se os passos relevantes do seu isolamento: após a solubilização da enzima com detergente, procedeu-se à sua separação cromatográfica das restantes proteínas extraídas da membrana. O processo de purificação foi muito dificultado pela grande tendência das proteínas membranares se ligarem entre si, formando grandes agregados com as moléculas de detergente. Este fenómeno também tornou inútil a cromatografia de filtração em gel e de interacção hidrofóbica, uma vez que em ambos os casos a eluição da proteína se deu num único grande pico. No final do processo obtiveram-se 110 mg de proteína enriquecida 9 vezes, com uma actividade específica de 2.6 U mg^{-1} e um rendimento de 4% (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 Tabela de purificação da redutase do nitrato de *Ps. chlororaphis* DSM 50135.

Passo de Purificação	Volume (mL)	Actividade[a] (U^b)	Proteína (mg)	Act. Específica[a] (U^b/mg proteína)	Rendimento (%)
Membranas	550	7510[c]	28000	0.27[c]	100
Extracto Solubilizado	1000	4860[c]	8300	0.59[c]	65
DE-52	520	2610[c]	3400	0.76[c]	35
HTP	245	1720[c]	2500	0.68[c]	23
Source 15 Q	450	960[c]	1300	0.71[c]	13
DEAE-Sepharose	35	280[d]	110	2.6[d]	4

[a] Dador de electrões: ditionito/metilviologénio; [b] 1 U=1μmol NO_2^- min^{-1}; [c] Determinação da taxa de oxidação do MV; [d] Determinação colorimétrica do nitrito produzido.

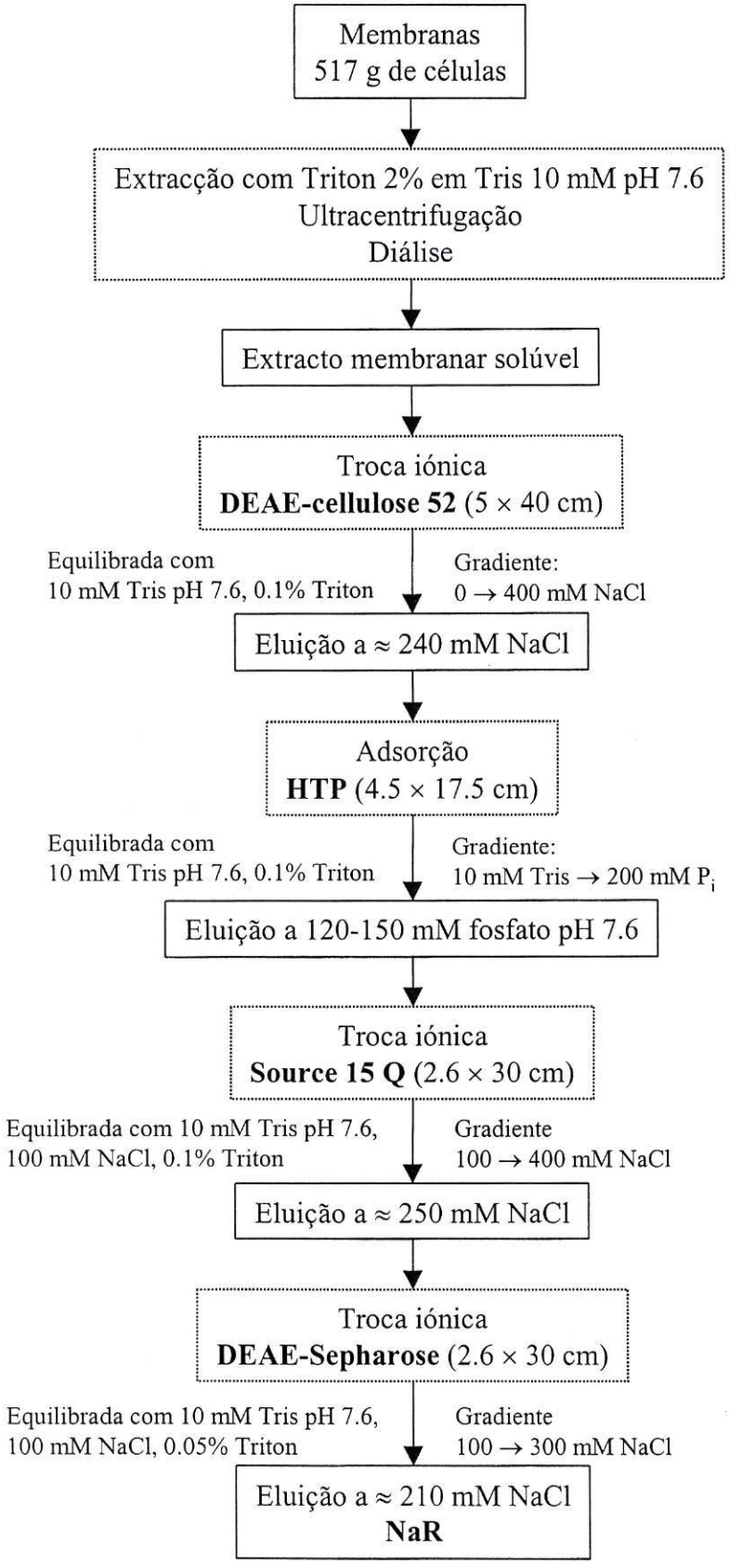


Figura 5.1 Esquema de purificação da redutase do nitrato de *Ps. chlororaphis* DSM 50135.

5.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

A estrutura oligomérica e a pureza da proteína foram estudadas por SDS-PAGE (Figura 5.2). Concluiu-se que a proteína é constituída por 3 subunidades com massas moleculares 129 kDa, 66 (64) kDa e 24 kDa, designadas na literatura por α, β e γ, respectivamente. A subunidade β apresenta duas bandas muito próximas, o que indicia um certo grau de proteólise.

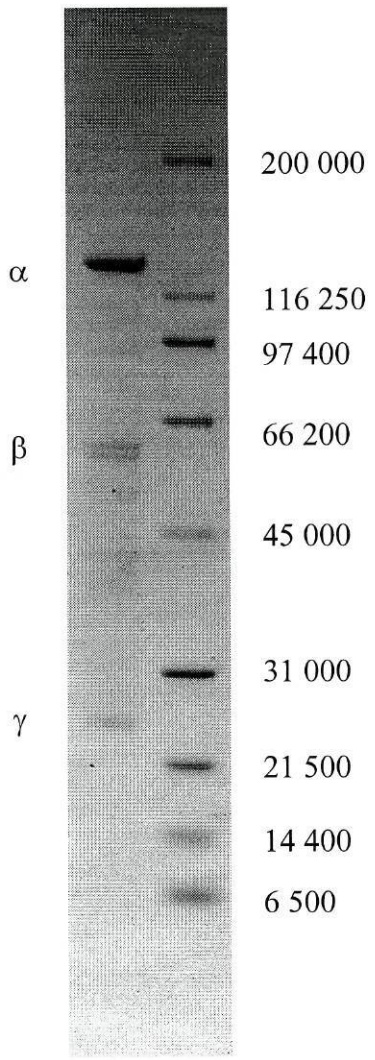


Figura 5.2 Electroforese em gel de poliacrilamida (gradiente 5-20%) em condições desnaturantes da redutase do nitrato de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 (à esquerda); padrões de massa molecular (à direita).

As redutases do nitrato membranares caracterizam-se pela sua composição em subunidades e pelo número e natureza dos seus centros redox, contendo normalmente

um dinucleótido de guanina Mo-bis-molibdopterina (Mo-bis-MGD) na subunidade α, três agregados [4Fe-4S] e um [3Fe-4S] na subunidade β, e dois hemos *b* na subunidade γ (Zumft, 1997). A caracterização da proteína em estudo incluirá, portanto, a identificação e quantificação destes centros na sua composição.

Procedeu-se à identificação e quantificação de nucleótidos de pterina, por cromatografia de fase reversa (secção experimental 7.14). Os perfis de eluição dos padrões e da amostra (Figura 5.3) identificaram a pterina presente na enzima como a derivada do GMP. Por integração dos picos relevantes, obteve-se um valor aproximado de 0.6 mol GMP/mol NaR (supondo MM=220 kDa, determinada por gel SDS).

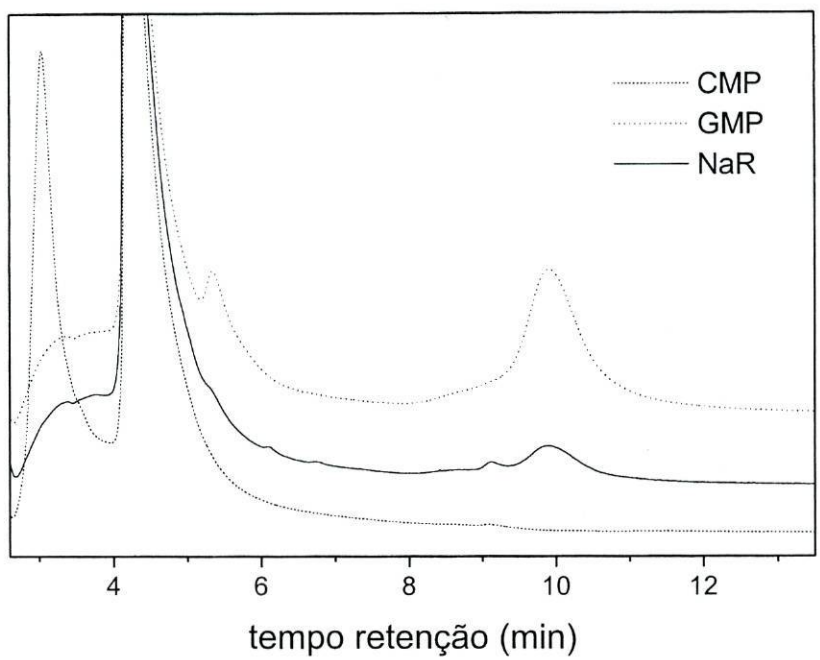


Figura 5.3 Perfil de eluição dos padrões de GMP, CMP e amostra de redutase do nitrato, obtidos na determinação da pterina na referida proteína.

Também se determinou o ferro lábil na proteína, pelo método descrito na secção experimental, obtendo-se um valor entre 6 e 7 mol Fe/ mol NaR (MM=220 kDa). Sabe-se, contudo, que conteúdos sub-estequiométricos de ferro lábil devidos a perdas durante a purificação são relativamente comuns, pelo que qualquer quantificação deve ser

verificada por análise de RPE (cf. Arendsen *et al.*, 1998; van den Berg *et al.*, 2000). Efectivamente, os espectros de RPE indicam a presença de pelo menos 15 átomos de ferro, correspondentes a três centros de [4Fe-4S] e um centro de [3Fe-4S] (cf. secção 5.6).

A análise de hemos, conforme descrito na secção experimental, permitiu a identificação de hemo *c* na amostra, estimando-se uma quantidade de 0.07 hemos/NaR. Não se detectou hemo *b*. A presença de hemo *c* numa redutase do nitrato membranar é inédita, uma vez que todas as outras NaRs de membrana referenciadas na literatura contêm hemo *b* (Zumft, 1997). Os resultados de UV-Vis e RPE permitem excluir a possibilidade de se tratar de uma contaminação (cf. secções 5.4 e 5.6). A quantidade de hemo detectada, porém, é de apenas ≈5% da quantidade estequiométrica esperada (2 hemos/NaR). Os ensaios catalíticos mostram que a perda do hemo se dá logo durante a solubilização das membranas (cf. secção 5.5.2), o que indica que o hemo se encontra fortemente ligado à membrana e não é solubilizado pelo Triton X-100 nas condições utilizadas.

Tal como as outras redutases membranares do nitrato, a proteína de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 é inibida por azida, e não é inibida por cianeto (cf. capítulo 2).

5.4 Espectroscopia de Absorção Electrónica

Os espectros de absorção electrónica da NaR, nas suas formas nativa, reduzida com ditionito e reoxidada com nitrato são apresentados na Figura 5.4. O espectro da forma nativa exibe características de dois grupos prostéticos: uma banda larga entre os 400 e 500 nm, típica de agregados de FeS, e a banda Soret de um hemo, a 409 nm. A adição de ascorbato não produz qualquer alteração no espectro. Por adição de ditionito observa-se redução de ambos os componentes do espectro: a banda larga devida ao FeS diminui de intensidade e a banda Soret desloca-se para 419 nm. Aparecem duas bandas adicionais a 525 nm e 552 nm, consistentes com os picos α e β da forma reduzida de um

hemo *c*. A intensidade dos picos devidos ao citocromo diminui acentuadamente com a adição de maiores quantidades de ditionito, sugerindo degradação ou demetalação progressiva do hemo.

A adição de nitrato à proteína reduzida provoca a reoxidação dos centros de FeS, e o correspondente aumento de intensidade da banda larga a 400-500 nm. O pico devido ao citocromo desloca-se novamente para 409 nm, mostrando que o hemo oxida, mas só recupera parcialmente a intensidade observada na forma nativa, o que está de acordo com a hipótese da degradação. Esta observação confirma que o hemo *c* está envolvido na reacção de redução do nitrato.

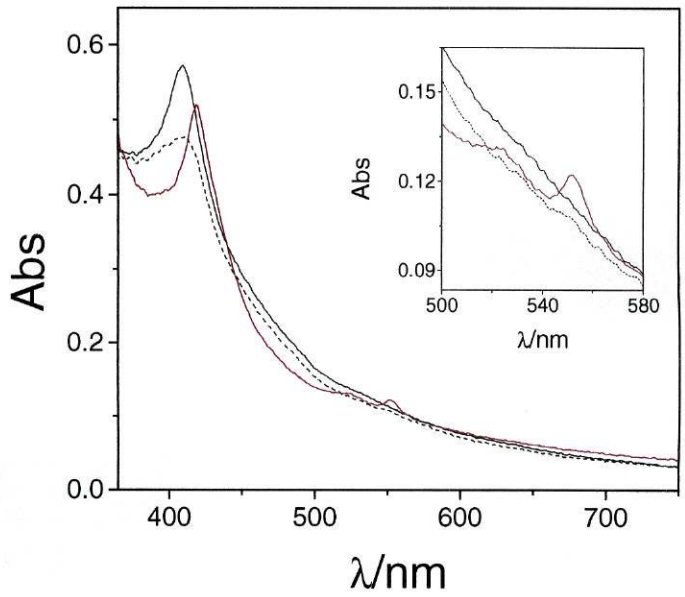


Figura 5.4 Espectro de UV-Vis da redutase do nitrato de *Ps. chlororaphis* DSM 50135. Forma nativa (—), reduzida com ditionito (—) e reoxidada com nitrato (----) [NaR]=12 μM. Detalhe: ampliação da região do espectro correspondente às bandas α e β do hemo reduzido.

5.5 CARACTERIZAÇÃO ELECTROQUÍMICA

A redutase do nitrato membranar é o componente terminal de um sistema de transferência electrónica ligado à membrana que catalisa a redução de nitrato a nitrito, de modo a gerar energia em condições de crescimento anaeróbicas. Quando purificada após solubilização das membranas com detergentes, a redutase do nitrato é composta

por três subunidades, α, β e γ, conforme referido. No entanto, uma forma também activa, mas solúvel, da enzima pode ser libertada das membranas por aquecimento, sendo composta por apenas duas subunidades, α e β (Zumft, 1997). As quinonas são, presumivelmente, os dadores de electrões fisiológicos da redutase do nitrato e podem dar electrões às preparações extraídas com detergente, mas não à enzima libertada das membranas por aquecimento. Pelo contrário, mediadores como o metilviologénio são capazes de dar electrões à enzima em ambas as situações, aparentemente por serem capazes de reduzir directamente as subunidades β e/ou α, sem a participação obrigatória da subunidade γ. O estudo da transferência electrónica entre a redutase do nitrato membranar e diferentes tipos de mediadores, quinonas e outros mediadores hidrossolúveis, permite determinar a presença da subunidade ligada à membrana da enzima, bem como investigar as vias de transferência electrónica dentro da enzima.

Uma vez que a velocidade da reacção de transferência electrónica entre um mediador e uma proteína redox é uma função dos potenciais electroquímicos das espécies envolvidas, do mecanismo de transferência electrónica e da geometria dos centros redox (distância entre os centros, energia de reorganização que acompanha a transferência, etc.), entre outros factores, estudou-se por voltametria cíclica, em presença de nitrato, a transferência electrónica entre a NaR de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 e vários mediadores (Figura 5.5), que diferem no potencial óxido-redutor, no número de electrões que podem dar e na capacidade para transferir electrões para as diferentes subunidades da NaR.

Os ensaios foram realizados quer com a fracção membranar em tampão EPPS 0.1 M pH 7.8 quer com a enzima purificada em tampão Bis-Tris Propano 0.1 M pH 7.8, em presença de excesso de nitrato. O cálculo das constantes de velocidade de segunda ordem (k) foi efectuado conforme descrito na secção experimental 7.22.2, de acordo com o modelo de Nicholson & Shain (1965). Os estudos efectuados com a fracção membranar permitem obter resultados fisiologicamente mais relevantes, uma vez que a

extracção da proteína da membrana acarreta frequentemente alterações na sua estrutura, especialmente no que diz respeito à subunidade γ. Contudo, como o uso de membranas dificulta a reprodutibilidade do sistema, efectuou-se também um estudo mais completo utilizando uma amostra de NaR purificada.

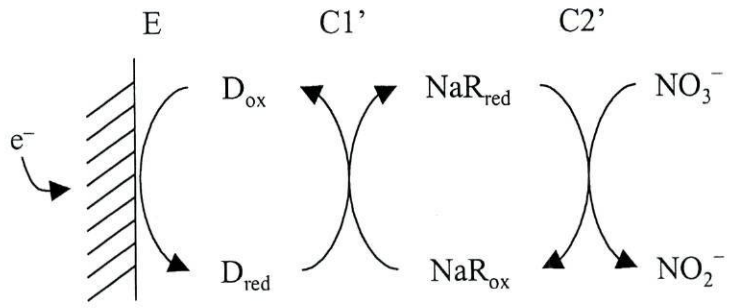


Figura 5.5 Representação esquemática do sistema electroquímico catalítico mediador (D), NaR, NO_3^- (EC1'C2'). (E) reacção de transferência electrónica directa do mediador no eléctrodo; (C1') redução da NaR pelo mediador e (C2') redução enzimática do substrato (NO_3^-) pela NaR reduzida.

Tal como descrito na secção 4.1.4, as condições necessárias para a aplicabilidade da teoria de Nicholson & Shain podem ser respeitadas se o comportamento electroquímico do mediador for reversível e controlado por difusão, a escala de tempo for suficientemente pequena, a taxa de reciclagem da NaR_{ox} for alta e não limitante da corrente catalítica, e existir nitrato em excesso na solução. O uso de altas velocidades de varrimento aproxima o sistema das condições utilizadas em medições de actividade enzimática, em que se mede a velocidade inicial de reacção para minimizar a influência de inibição pelo produto e de depleção do substrato.

5.5.1 Caracterização electroquímica da transferência electrónica entre diversos mediadores e a redutase do nitrato na membrana, em presença de nitrato.

Na Tabela 5.2 apresenta-se um resumo da caracterização electroquímica dos mediadores usados. Os valores de ΔE_p apresentados reflectem, em parte, a influência adversa das membranas na electroquímica dos mediadores: o processo torna-se menos reversível e a intensidade dos picos diminui após a adição da fracção membranar (cf.

Figura 5.6). Alguns mediadores usados são mais sensíveis a este efeito, tendo por isso sido usados em concentrações mais elevadas. O uso de concentrações diferentes de alguns mediadores não deverá afectar os dados obtidos uma vez que segundo a teoria de Nicholson & Shain, o valor da constante de transferência electrónica *k'* é independente da concentração de mediador se a reacção entre este e a enzima for irreversível, como se verificou. Isso poderia não ocorrer se o mediador tivesse um potencial suficientemente próximo do potencial da reacção catalisada, por exemplo. Neste caso, seria possível que a enzima funcionasse também como uma "oxidase do nitrito" e reduzisse o mediador. A expressão para a eficiência catalítica conteria então parâmetros adicionais, incluindo a concentração de mediador.

Tabela 5.2 Caracterização electroquímica de mediadores artificiais em presença de membranas de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 e respectiva eficiência de transferência electrónica para a redutase do nitrato membranar [a, b].

Mediador	ΔE_p (mV)	$E_{1/2}$ (mV) [c]	ne^-	Conc. (μM)	k'_{rev} (s^{-1})	k'_{irrev} (s^{-1})
Metilviologénio	66	-446	1	220 (aq)	1.39	–
Benzilviologénio	83	-320	1	220 (aq)	0.713	0.869
Antraquinona-2-sulfonato	49	-246	2	550 (aq)	0.225	–
2-Hidroxi-1,4-naftoquinona	68	-198	2	550 (etOH)	0.834	1.02
Menadiona	80	-40	2	550 (etOH)	0.281	0.345
Azul de metileno	37	11	2	220 (aq)	0.343	–
Duroquinona	155	33	2	550 (etOH)	0.109	0.130
2,6-Diclorofenolindofenol	51	201	2	220 (aq)	0	–

[a] O comportamento dos mediadores indicados a itálico desvia-se apreciavelmente da reversibilidade; [b] A concentração de proteína total nos ensaios foi de 6 mg/mL; [c] Valores de potencial *vs.* ENH.

Em presença de membranas e nitrato, os voltamogramas de quase todos os mediadores utilizados adquirem uma forma sigmoidal, com intensificação notória da

corrente catódica. Na Figura 5.6 apresentam-se, a título de exemplo, os voltamogramas cíclicos obtidos nos estudos com antraquinona-2-sulfonato e 2-hidroxi-1,4-naftoquinona. Não se observa onda catalítica no sentido da oxidação, o que confirma a irreversibilidade da transferência electrónica homogénea, condição necessária para a aplicabilidade do tratamento efectuado.

Os valores das constantes de velocidade de transferência electrónica de pseudo-primeira ordem, k', obtidos para os vários mediadores são também apresentados na Tabela 5.2. Para os mediadores cujo comportamento se desvia apreciavelmente da reversibilidade, calculou-se também k' supondo o sistema totalmente irreversível, tendo-se obtido valores, tipicamente, 25 a 30% superiores aos calculados supondo o sistema reversível.

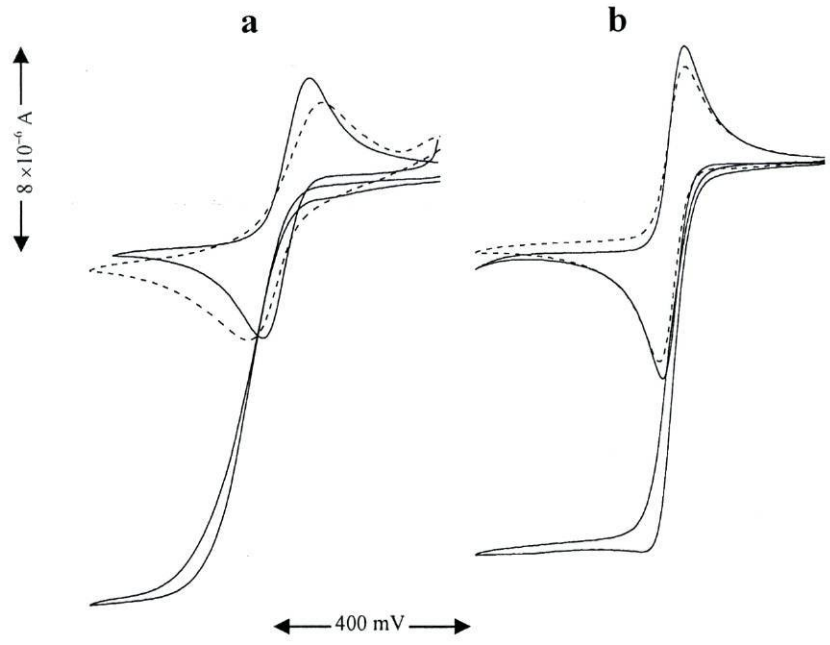


Figura 5.6 Comportamento electroquímico de **(a)** 2-hidroxi-1,4-naftoquinona e **(b)** antraquinona-2-sulfonato antes (contínuo, em cima) e após a adição da fracção membranar de *Ps. colorareis* DSM 50135 (tracejado, em cima) e nitrato (contínuo, em baixo), em tampão EPPS 0.1 M, pH 7.8, a 30 °C. Condições de reacção: mediador, 550 μM, nitrato, 10 mM; velocidades de varrimento de 4 mV/s.

Na Figura 5.7 apresenta-se a representação gráfica da variação da constante catalítica com o potencial dos mediadores utilizados, onde são aparentes duas

tendências: uma para os mediadores hidrossolúveis e outra para os lipossolúveis. A comparação das duas tendências mostra que os mediadores lipossolúveis transferem electrões mais eficazmente do que os mediadores hidrossolúveis, o que sugere que o acesso aos hemos (presentes na subunidade γ, ancorada na membrana em ambiente hidrofóbico) é bastante mais fácil do que o acesso aos centros prostéticos presentes nas subunidades solúveis. Em ambos os casos, observa-se que a constante de pseudo-primeira ordem, *k'*, decai exponencialmente com a diferença de potencial entre o mediador e a NaR. Isto sugere que, no processo de transferência electrónica, a energia de activação depende linearmente da diferença de potencial e, portanto, esta diferença será, em cada um dos casos, o factor determinante para a velocidade de transferência electrónica. Estas observações indiciam que o passo limitante deste processo seja a transferência electrónica mediador-proteína, sugerindo uma cinética rápida de transferência electrónica entre os diferentes centros redox da NaR.

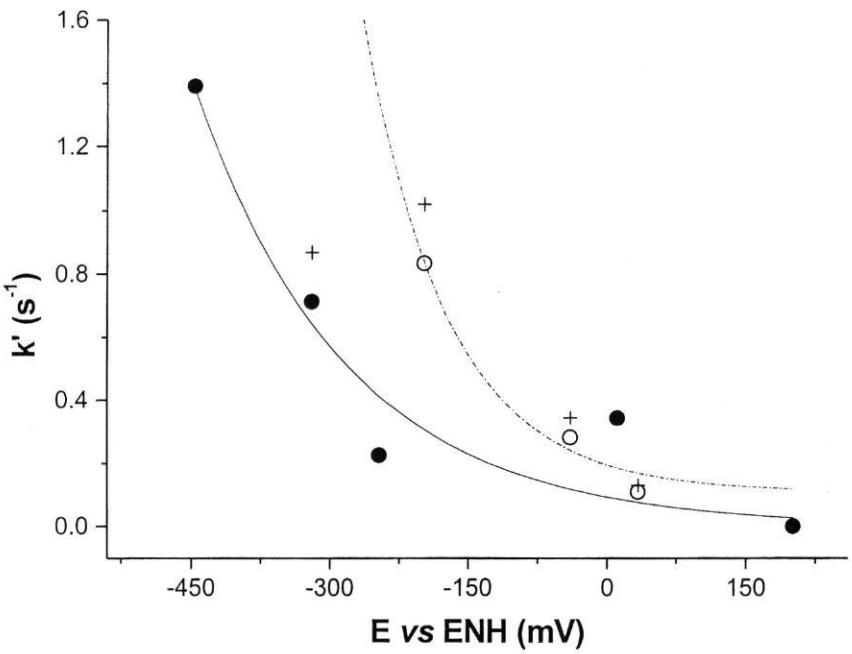


Figura 5.7 Variação da constante catalítica com o potencial dos mediadores utilizados. (○) mediadores lipossolúveis; (●) mediadores hidrossolúveis; (+) valores calculados considerando o sistema completamente irreversível.

5.5.2 Caracterização electroquímica da transferência electrónica entre o metilviologénio e a redutase do nitrato solubilizada, em presença de nitrato.

Dos mediadores experimentados nas membranas escolheu-se o metilviologénio, por ser dos mediadores estudados aquele que mais eficientemente transfere electrões para a enzima, e a menadiona, pela sua relevância fisiológica (Ketchum *et al.*, 1991), para efectuar o estudo electroquímico da transferência electrónica para a NaR purificada, em presença de nitrato. Ao contrário dos resultados obtidos com a fracção membranar, não se observou transferência electrónica da menadiona para a NaR purificada, nem sequer para o extracto membranar solubilizado, o que indica que a perda do hemo observada (cf. secção 5.3) ocorreu logo na fase de solubilização.

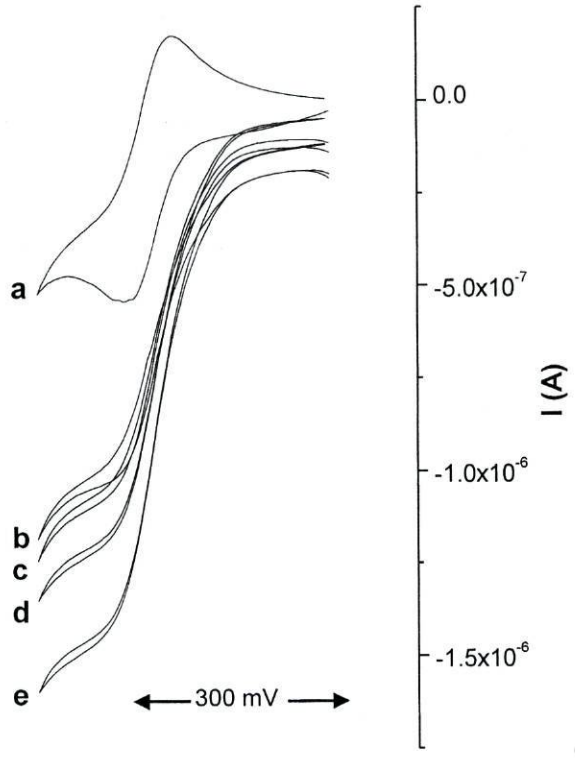


Figura 5.8 Efeito da NaR de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 na resposta electroquímica do metilviologénio (MV), em presença de nitrato. (a) MV 400 μM em tampão BisTrisPropano 100 mM pH 7.8 e 100 mM KCl. (b–e) adição de NaR em concentrações crescentes: 1.0, 2.0, 3.3 e 4.8 μM. [nitrato]=15 mM. Velocidade de varrimento, 5 mV/s.

Os voltamogramas cíclicos obtidos por adição de NaR a uma solução de metilviologénio, em presença de nitrato (Figura 5.8) apresentam uma forma sigmoidal, verificando-se um aumento exclusivo da corrente catódica. Estas características permitem concluir que só ocorre catálise no sentido da redução do nitrato, existindo um estado estacionário de enzima reduzida perto da superfície do eléctrodo. A corrente catalítica medida é independente da velocidade de varrimento e proporcional à raiz quadrada da concentração de enzima, o que indica que a elevada corrente catódica é devida à regeneração catalítica do MV reoxidado pela NaR (Nicholson & Shain, 1964).

Observam-se desvios da linearidade prevista entre λ e o inverso da velocidade de varrimento (Figura 5.9). De modo a determinar o valor de k, é então necessário usar uma aproximação proposta por Hill & Walton (1982), baseada na hipótese de que o tratamento de Nicholson & Shain continua aplicável se se considerar apenas os declives iniciais.

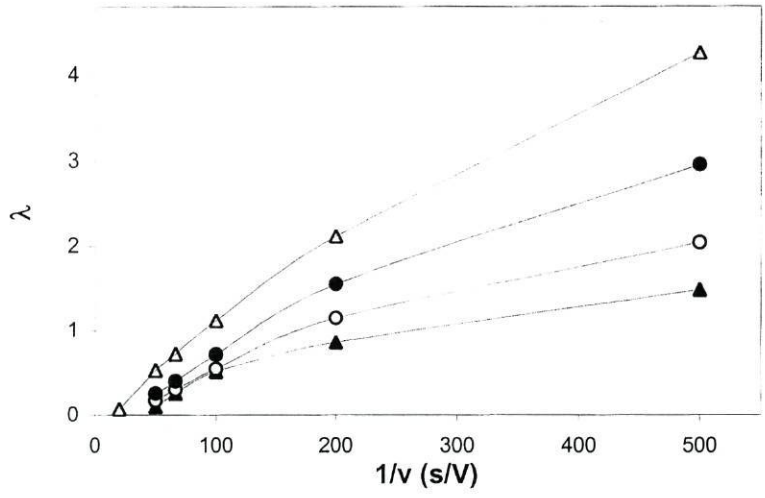


Figura 5.9 Variação do parâmetro cinético (λ) com o inverso da velocidade de varrimento (1/v) para concentrações crescentes de NaR: (▲) 1.0 μM; (○) 2.0 μM; (●) 3.3 μM; (△) 4.8 μM. Condições: 400 μM de MV em tampão BisTrisPropano 100 mM pH 7.8 e 100 mM KCl; [nitrato]=15 mM.

A dependência das constantes de pseudo-primeira ordem com a concentração de NaR é apresentada na Figura 5.10. A constante de transferência electrónica $MV_{red} \rightarrow NaR$, determinada a partir do declive desta recta, é de 8.2×10^4 $M^{-1}s^{-1}$, que é um

valor muito baixo, se comparado com outros referidos na literatura para processos de transferência electrónica de metilviologénio para enzimas redox (cf. Hoogvliet *et al.*, 1987, que apresenta valores da ordem de 10^6 $M^{-1}s^{-1}$). Brito *et al.* (1995) sugerem que uma menaquinona ligada à NaR de *E. coli* esteja envolvida na transferência electrónica para as subunidades αβ quando o MV reduzido actua como dador de electrões. É possível que na transferência electrónica do metilviologénio para a NaR de *Ps. chlororaphis* também esteja envolvida uma quinona e que esta se tenha perdido parcialmente durante a purificação, o que explicaria a deficiente transferência electrónica MV_{red}→NaR observada.

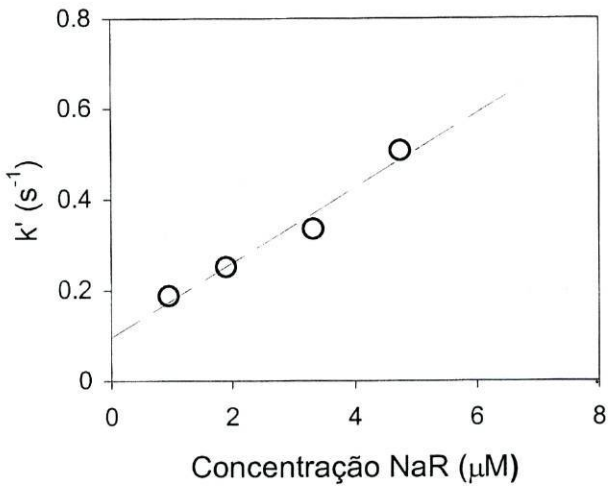


Figura 5.10 Variação da constante de velocidade de transferência electrónica de pseudo-primeira ordem (*k* ') com a concentração de NaR.

5.6 Ressonância Paramagnética Electrónica

A redutase do nitrato de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 apresenta um comportamento electroquímico bastante complexo, revelando uma grande variedade de centros redox quando investigada por ressonância paramagnética electrónica.

No estado nativo (Figura 5.11), esta técnica permite identificar pelo menos três centros: a forma oxidada de um agregado [3Fe-4S] (g≈2.01), um sinal proveniente de um hemo (g≈6) e um sinal com todos os valores de *g* inferiores a g_e (g_1=1.9998,

$g_2 \approx 1.985$, $g_3 = 1.9652$), característico de um sistema d^1, e portanto atribuível a Mo(V) (Figura 5.12). Observa-se ainda um sinal isotrópico a g=4.3, provavelmente devido a Fe(III) ligado não especificamente à proteína (Hagen, 1992).



Figura 5.11 Espectros de RPE da forma nativa da redutase do nitrato de *Ps. chlororaphis* DSM 50135, a pH 7.6. Modulação de amplitude: 1.0 mT, potência: 2mW; NaR 200 μM.

A pH 6.0 o sinal de Mo(V) apresenta-se desdobrado por interacção com um núcleo de I=1/2, provavelmente um núcleo de hidrogénio. O desdobramento observado é anisotrópico (A_1= 1.38 mT, A_2= 0.88 mT, A_3= 0.80 mT) e ligeiramente inferior ao observado na redutase membranar do nitrato de *E. coli* (A_1= 1.57 mT, A_2= 1.04 mT, A_3= 1.04 mT), onde foi atribuído a um protão de um ligando OH em posição equatorial (George *et al.*, 1985).

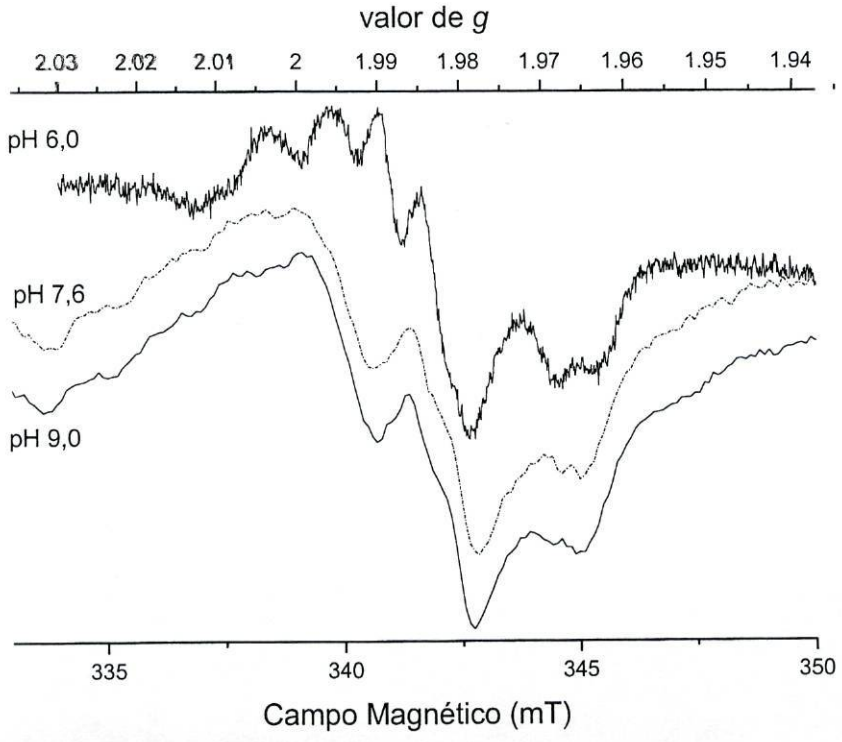


Figura 5.12 Espectros de RPE da forma nativa da redutase do nitrato de *Ps. chlororaphis* DSM 50135, a pH 6.0, pH 7.6 e pH 9.0. Temperatura: 60 K; modulação de amplitude: 0.5 mT; potência: 2 mW.

A ausência de desdobramento a pH superior revela que este protão se encontra em equilíbrio com o solvente. Esta observação sugere que um dos ligandos do centro de Mo(V) na redutase do nitrato de *Ps. chlororaphis* é protonável, como p. ex. OH, NH_2 ou SH. A protonação de um ligando do molibdénio é característica do mecanismo de reacção das redutases dissimilatórias membranares do nitrato: os protões presentes no centro activo das redutases dissimilatórias periplásmicas e das redutases assimilatórias do nitrato não se encontram em equilíbrio com o solvente, e foram atribuídos a uma cisteína coordenante do átomo de molibdénio (Bennett *et al.*, 1994).

A adição de ascorbato não produziu quaisquer alterações no estado de oxidação de nenhum dos centros detectados. Contudo, à medida que se reduz a NaR com ditionito, observam-se bastantes diferenças nos espectros de RPE. A 10 K (Figura 5.13), observa-se o desaparecimento progressivo do sinal do hemo oxidado ($g \approx 6$), assim como

da forma oxidada do agregado [3Fe-4S]. Ao mesmo tempo, observa-se também a redução de um (ou mais) agregados [4Fe-4S] (ver também o detalhe na Figura 5.14).

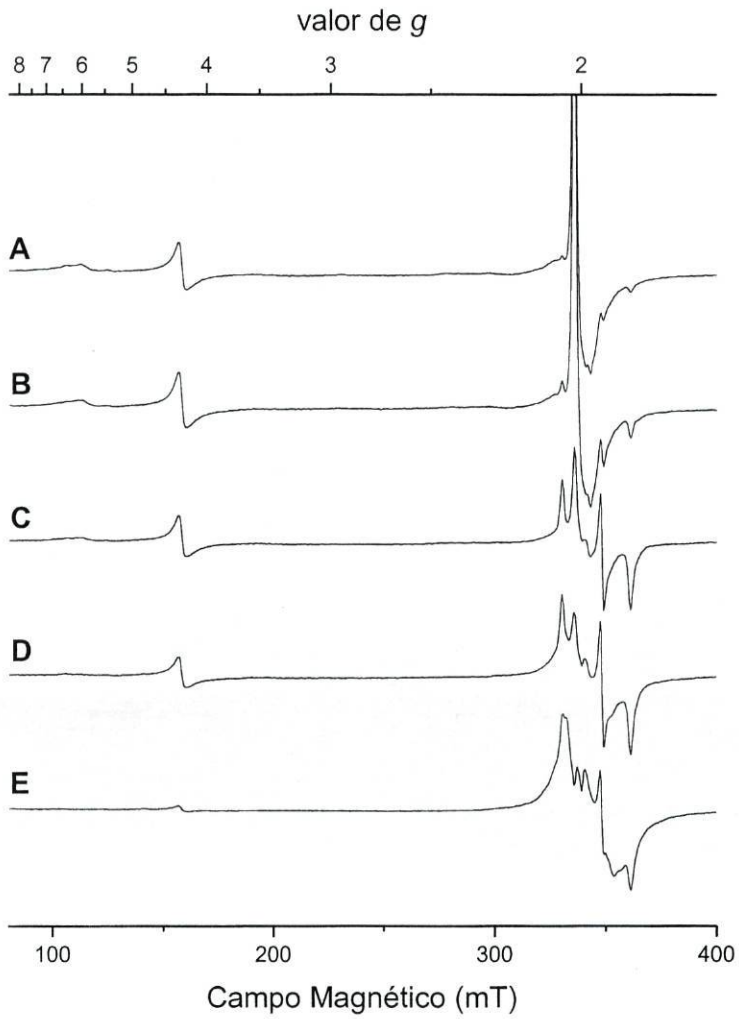


Figura 5.13 Redução progressiva da redutase membranar de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 seguida por RPE. (A) 2 mM ditionito, 1 min incubação; (B) 12 mM ditionito, 1 min incubação; (C) 23 mM ditionito, 1 min incubação; (D) 23 mM ditionito, 10 min incubação; (E) 32 mM ditionito, 10 min incubação. Utilizou-se uma amostra de concentração 200 μM em 300 mM Tris pH 7.6. Condições instrumentais: frequência das microondas, 9.49 GHz; potência, 2 mW; modulação de amplitude, 1.0 mT, temperatura, 10 K. Detalhe de campo alto na Figura 5.14.

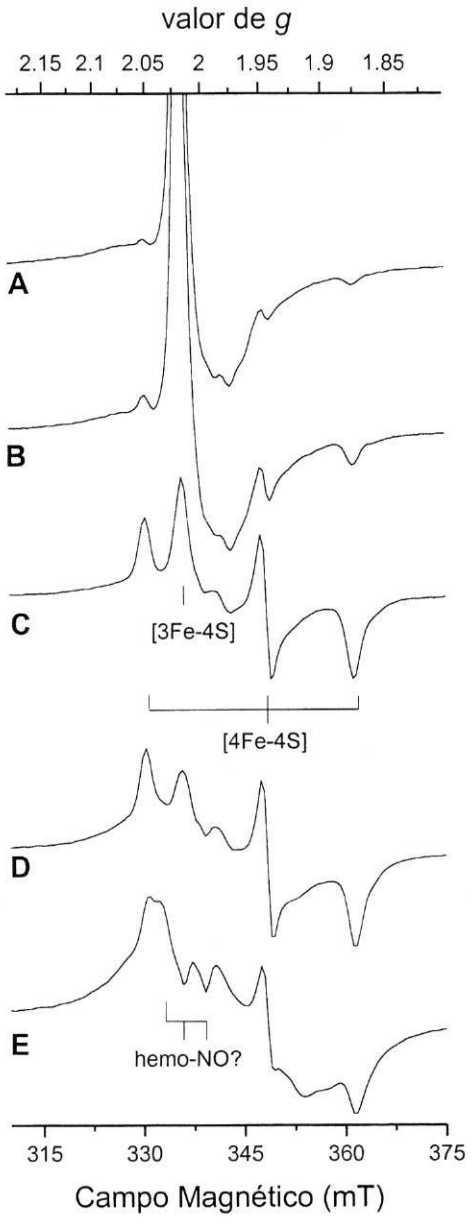


Figura 5.14 Redução progressiva da redutase membranar do nitrato de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 seguida por RPE. Detalhes (região de campo alto) dos espectros da figura anterior. Modulação de amplitude, 0.5 mT. Todas as outras condições como na Figura 5.13.

Após a primeira adição de ditionito é já possível observar o início da redução do novo agregado de FeS, provavelmente [4Fe-4S], uma vez que o sinal não é visível a 60 K – cf. Figura 5.15 (agregado $[4Fe\text{-}4S]_a$). Tal como na redutase do nitrato A, extraída de *E. coli* (Magalon *et al.*, 1998), o potencial do agregado de [3Fe-4S] parece ser

bastante próximo do potencial do agregado $[4Fe\text{-}4S]_a$, uma vez que o momento de desaparecimento do sinal [3Fe-4S] coincide com o momento da intensidade máxima do sinal de $[4Fe\text{-}4S]_a$ (cf. espectros A a D). No último passo da redução observa-se acoplamento do agregado $[4Fe\text{-}4S]_a$ a um outro sistema paramagnético, provavelmente outro agregado [4Fe-4S] (cf. Guigliarelli *et al.*, 1992) (agregado $[4Fe\text{-}4S]_b$). O alargamento dos sinais é característico de interacções dipolares, o que permite estimar uma distância de 10-15 Å entre os dois centros.

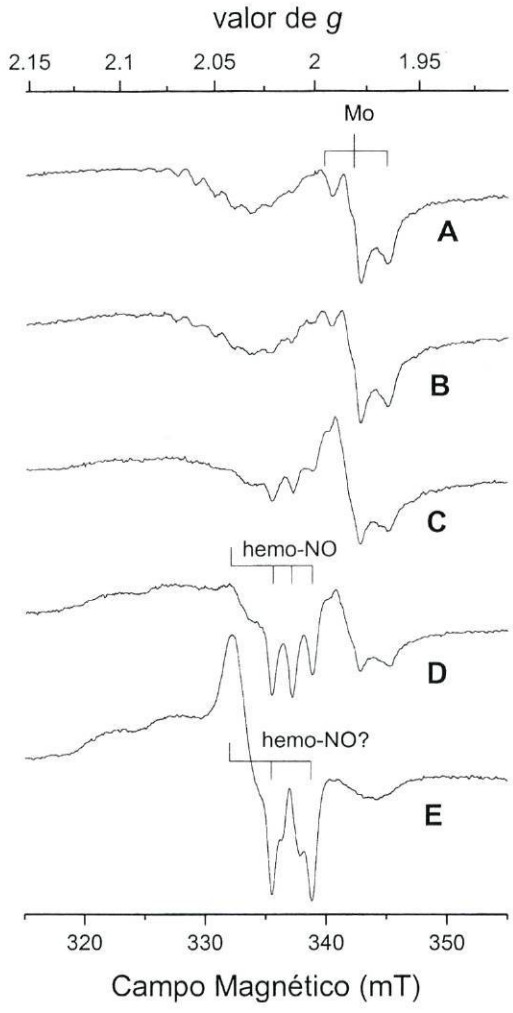


Figura 5.15 Redução progressiva da redutase membranar do nitrato de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 seguida por RPE. Temperatura: 60 K; Potência: 2 mW; Modulação de amplitude: 0.5 mT.

Ao contrário do que sucede na redutase periplásmica do nitrato (Butler *et al.*, 1999), a redução progressiva da NaR conduz também ao desaparecimento do sinal de Mo(V) (Figura 5.15). Ao mesmo tempo, desenvolve-se um novo sinal a $g>2$ com desdobramento hiperfino do componente g_3 (Figura 5.15, espectro D), indicando claramente a presença de um átomo de azoto na esfera de coordenação do sistema paramagnético. Estas características são compatíveis com uma espécie hemo-NO. O hemo ferroso é um sistema d^6 com S=0 e por isso normalmente indetectável por RPE. No entanto, a coordenação do NO (uma espécie radicalar, com S=1/2) dá origem a um sistema paramagnético com S=1/2, permitindo a sua observação na forma reduzida. Sinais do mesmo tipo foram também observados noutras redutases do nitrato membranares e periplásmicas (Vincent & Bray, 1978; Guigliarelli *et al.*, 1992; Breton *et al.*, 1994). O complexo hemo-NO é um produto secundário da redução do nitrato pela proteína, não sendo observado na proteína de *E. coli* sobreproduzida na ausência de nitrato (Magalon *et al.*, 1998). A observação deste complexo na amostra confirma a presença da subunidade γ, uma vez que esta é a única cadeia da NaR que possui um hemo.

Na amostra mais reduzida o sinal hemo-NO é substituído por um outro sinal bastante semelhante, mas em que não se observa o desdobramento provocado pelo NO. As características do sinal são invulgares: se o NO deixasse de estar coordenado ao hemo ferroso este tornar-se-ia indetectável por RPE (por ser um sistema piramidal quadrado d^6); por outro lado, se se mantivesse a coordenação do NO o desdobramento devido ao ^{14}N dever-se-ia manter. Na literatura encontram-se descritas alterações dos espectros de hemos nitrosilados causadas pela coordenação de uma histidina ao hemo-NO, que provoca um novo desdobramento hiperfino e dá origem a um espectro com nove linhas não resolvidas (Mun *et al.*, 1979). Porém, o sinal observado na amostra mais reduzida da redutase do nitrato (Figura 5.15, espectro E) apresenta estrutura resolvida, cuja origem não foi possível determinar. A forma estreita do sinal sugere a

possibilidade de se tratar da soma do espectro D com um radical, mas as simulações realizadas com base nesta hipótese não são satisfatórias. Este sinal é detectável numa gama bastante alargada de temperaturas, entre 5 e 200 K (Figura 5.16). Abaixo de 10 K, sobrepõe-se parcialmente com o componente de campo baixo do sinal devido à interacção dos agregados $[4Fe\text{-}4S]_a$ e $[4Fe\text{-}4S]_b$.

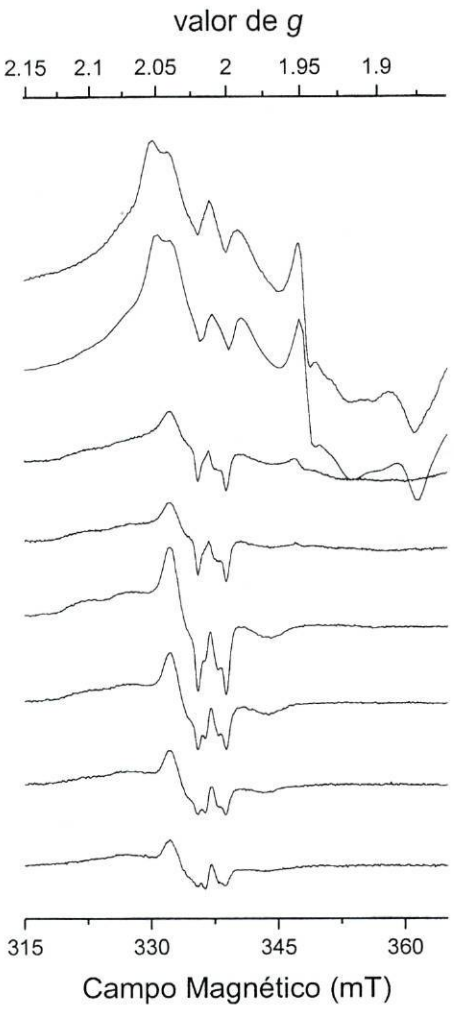


Figura 5.16 Espectros de RPE do hemo nitrosilado observado na forma completamente reduzida (E) da redutase do nitrato de *Ps. chlororaphis* DSM 50135. Temperaturas (de cima para baixo): 5, 10, 20, 30, 60, 100, 150 e 200 K. Modulação de amplitude: 0.5 mT.

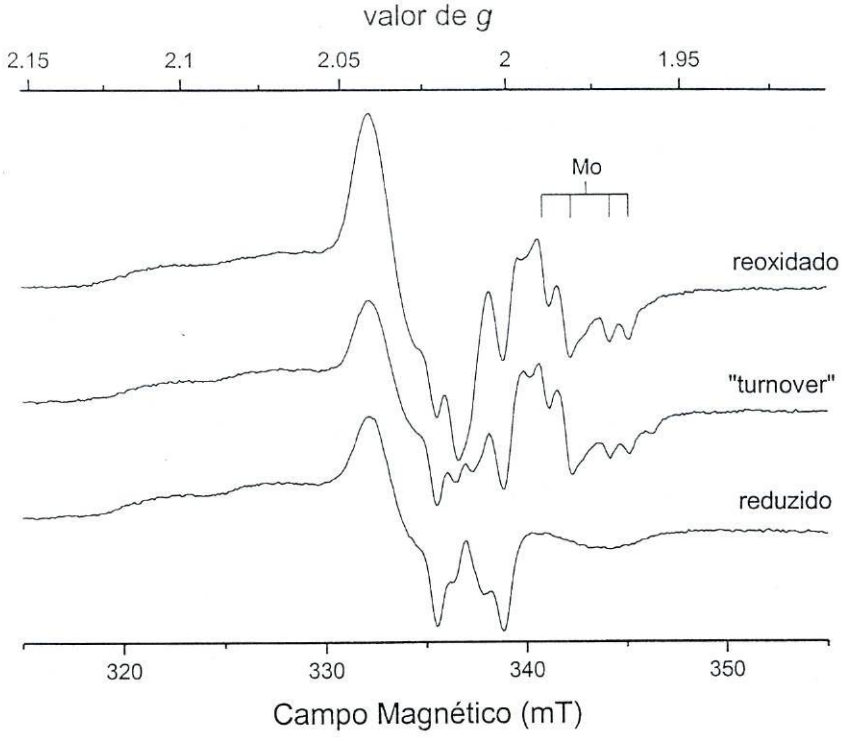


Figura 5.17 Reoxidação da NaR de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 reduzida por incubação com nitrato: formas "turnover" (congelada logo após a adição de 75 mM de nitrato) e reoxidada (incubada com nitrato, sob atmosfera de árgon, durante 10 min). Apresenta-se também a forma completamente reduzida (E) para facilitar as comparações. Temperatura: 60 K; modulação de amplitude: 0.5 mT.

Após adição de nitrato à proteína reduzida o centro activo de Mo é oxidado a Mo(V) (Figura 5.17). Ao contrário do observado na forma de repouso a este pH (cf. Figura 5.12), o sinal de Mo(V) assim obtido apresenta acoplamentos hiperfinos com um núcleo de hidrogénio ($^{H}A_2$= $^{H}A_3$=0.9 mT) e valores de g_y e g_x ligeiramente mais elevados do que a forma de repouso (g_1=n.d., g_2= 1.986, g_3=1.967). Apesar de não se ter podido determinar o componente g_1 devido à sobreposição do sinal do hemo nitrosilado, a semelhança dos valores de g dos dois sinais ("repouso" e "reoxidado com NO_3^-") sugere que as suas estruturas (à parte a presença do protão responsável pelo desdobramento na amostra reoxidada) sejam bastante parecidas, diferindo entre si apenas como consequência de pequenas alterações na vizinhança do centro catalítico. Por incubação anaeróbica breve da forma reduzida da enzima com substrato obtém-se a forma da enzima envolvida no ciclo catalítico (forma "turnover").O espectro de RPE do

Mo(V) na forma de "turnover" revela além do sinal do centro reoxidado um novo componente com um valor de g a 1.959, que desaparece após reoxidação da enzima. Infelizmente, a sobreposição de sinais não permite determinar os outros valores de g deste sinal para comparação com os dados da literatura e eventual clarificação da sua relevância.

Surpreendentemente, o sinal devido ao hemo nitrosilado sofre alterações durante a catálise (Figura 5.17). Uma vez que não é provável que esta forma do hemo esteja envolvida no mecanismo, as alterações observadas poderão reflectir alterações locais de estrutura ou interacções com outros centros paramagnéticos próximos.

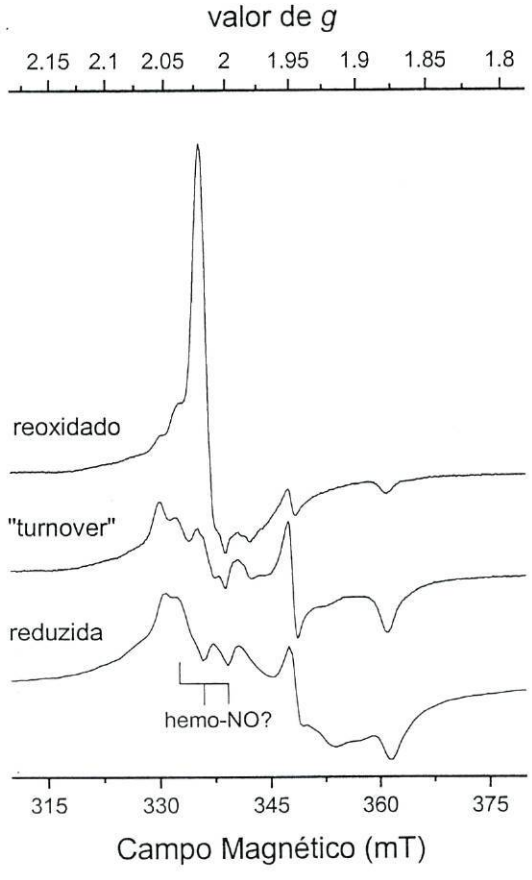


Figura 5.18 Reoxidação da NaR de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 reduzida por incubação com nitrato: formas completamente reduzida (E), "turnover" e reoxidada. Temperatura: 10 K; modulação de amplitude: 0.5 mT

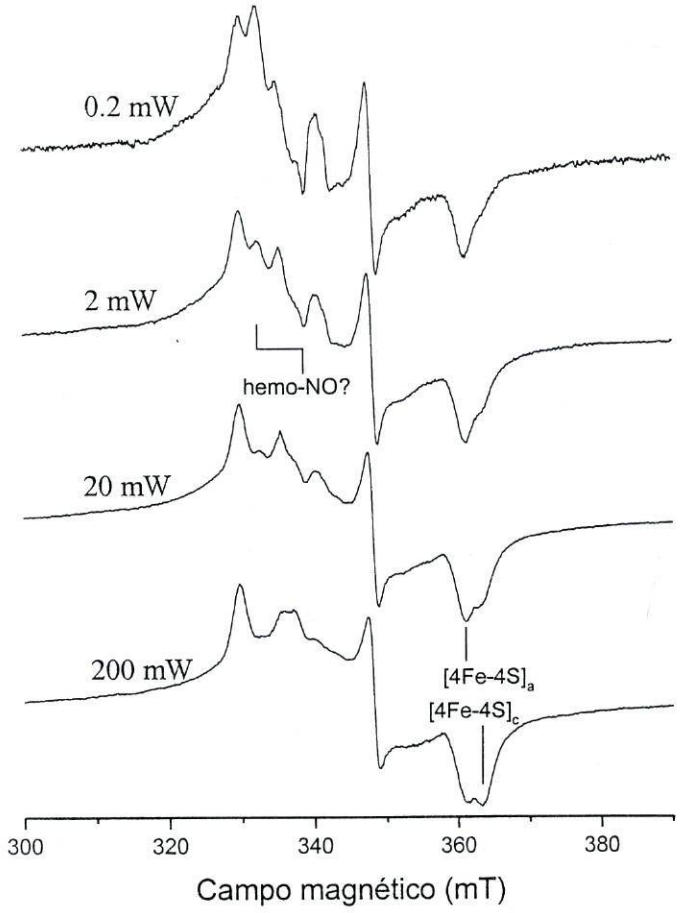


Figura 5.19 Observação de dois tipos de agregados [Fe-S] com diferente comportamento em relação à saturação na amostra de NaR no estado de turnover. Temperatura 5 K; modulação de amplitude: 0.5 mT. Para facilitar a comparação visual, os espectros foram multiplicados por constantes de forma a normalizar a amplitude do componente a 361 mT.

A observação dos espectros devidos aos centros de FeS revela que a interacção dipolar observada na amostra mais reduzida desaparece na presença de nitrato (Figura 5.18). A redução do nitrato provoca portanto a reoxidação do agregado $[4Fe\text{-}4S]_b$, sugerindo que este se encontra mais próximo do centro activo. O estudo da saturação do sinal desta forma "turnover" da enzima (idêntico ao observado num passo intermédio da redução, cf. Figura 5.14, e atribuído a $[4Fe\text{-}4S]_a$) indica a presença de um agregado adicional ($[4Fe\text{-}4S]_c$), mais difícil de saturar do que $[4Fe\text{-}4S]_a$ (Figura 5.19). A redutase membranar da *Ps. chlororaphis* DSM 50135 possui portanto um agregado [3Fe-4S] e pelo menos três agregados [4Fe-4S]. A incubação mais prolongada desta amostra em

condições anaeróbicas e na presença de nitrato conduz ao aparecimento da forma oxidada do centro [3Fe-4S] e à quase completa oxidação dos centros [4Fe-4S].

A oxidação da proteína pelo nitrato não provoca o aparecimento do espectro de spin alto devido à forma oxidada do hemo *c* (cf. Figura 5.20), o que está de acordo com a instabilidade deste hemo em relação à redução com ditionito observada por espectroscopia UV-Visível. O estudo mais pormenorizado deste hemo exigirá provavelmente a utilização dos redutores fisiológicos (ou seus análogos) em amostras com maior abundância de hemo.

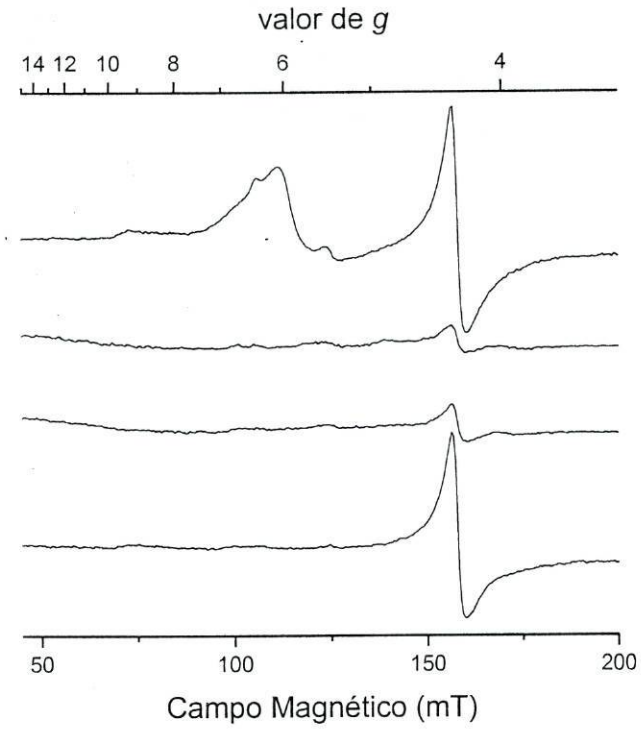


Figura 5.20 O sinal de spin alto devido ao citocromo. Formas nativa a pH 7.6, reduzida (E), "turnover" e reoxidada. Temperatura 5 K; modulação de amplitude:1.0 mT.

5.7 CONCLUSÕES

Estudos de electrocatálise da NaR nas membranas revelam que a transferência electrónica é mais favorecida quando realizada através da subunidade γ do que directamente à subunidade α, o que implica que a via intramolecular de transferência

electrónica na enzima é bastante eficiente. Esta hipótese é também apoiada pela observação de que o factor determinante na velocidade do processo de transferência electrónica é a diferença de potencial entre os dadores de electrões e a enzima, o que sugere que a transferência electrónica intermolecular constitui o passo limitante do processo.

A redutase do nitrato solubilizada de membranas de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 possui, tal como as outras NaRs descritas na literatura, vários agregados de FeS e um centro activo de Mo, constituído pelo dinucleótido de guanina e molibdopterina. De acordo com o observado noutras NaRs, também na proteína isolada de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 existem agregados de potencial elevado ([3Fe-4S], $[4Fe\text{-}4S]_a$ e possivelmente $[4Fe\text{-}4S]_c$) e de potencial baixo ($[4Fe\text{-}4S]_b$).

Na forma oxidada, o centro activo de Mo apresenta uma transição entre duas formas, de pH alto e baixo, detectada por espectroscopia de RPE. Na forma de pH baixo observa-se um desdobramento hiperfino de um protão, que sugere a presença de um ligando OH. Por adição de ditionito, ocorre redução do centro activo de Mo(V) a Mo(IV). O centro reduzido pode ser reoxidado por nitrato, dando origem a um novo sinal de Mo(V), idêntico à forma de pH baixo inicial, o que revela semelhanças na geometria e estrutura electrónica de ambas as espécies. A origem dos diferentes sinais de RPE de Mo observados não pôde ser determinada, mas poderá ser esclarecida por estudos de EXAFS (como realizado para a redutase periplásmica do nitrato por Butler *et al.*, 1999). Na amostra utilizada encontra-se presente um hemo *c* que aparentemente interage com o centro de Mo, sugerindo que esta NaR possua um hemo *c* em vez do habitual hemo *b*. Como, porém, a quantidade de hemo detectada é de apenas ≈5% da quantidade estequiométrica esperada (2 hemos/NaR) torna-se imperiosa uma identificação inequívoca do hemo presente e do seu papel na enzima.

6

CONCLUSÕES

6.1 AS ESTIRPES

O crescimento das estirpes DSM 50135 e 50083^T de *Ps. chlororaphis* em condições microaeróbicas na presença de nitrato deu origem a biomassa com aspecto avermelhado, característico de células com expressão abundante de metaloproteínas. De facto, durante os isolamentos foram detectadas proteínas com cobre, molibdoproteínas, citocromos, proteínas com agregados de FeS e flavoproteínas. Das estirpes estudadas, a DSM 50135 revelou-se o melhor sistema para expressão das proteínas envolvidas na desnitrificação. Desta estirpe isolou-se uma azurina, uma redutase do nitrito contendo cobre e uma redutase membranar do nitrato. A indução da desnitrificação na estirpe DSM 50083^T revelou-se mais problemática do que na DSM 50135, tendo-se isolado desta estirpe apenas uma azurina e uma proteína com actividade de redutase do nitrito.

6.2 AS AZURINAS

As azurinas das estirpes de *Ps. chlororaphis* estudadas (Az624 e Az626) apresentam vários comportamentos peculiares entre as azurinas conhecidas. Têm um carácter mais acídico e potenciais de redução mais elevados do que a maioria das azurinas descritas na literatura, propriedades que afectarão provavelmente a sua capacidade de transferir electrões de / para os sistemas em que intervêm em condições fisiológicas, uma vez que o carácter ácido das proteínas reflecte a distribuição de carga à sua superfície (um factor determinante na formação de complexos intermoleculares dador/aceitador de electrões) e o potencial de redução é um dos factores determinantes na transferência electrónica entre dois sistemas. Também a dependência das propriedades electroquímicas e hidrodinâmicas das azurinas de *Ps. chlororaphis* com o pH as distingue das demais. Embora os mecanismos responsáveis pela dependência do potencial de Az624 e Az626 com o pH pareçam ser semelhantes aos observados na azurina de *Ps. aeruginosa*, os valores nitidamente mais baixos para o pK das formas

oxidadas das azurinas de *Ps. chlororaphis* sugerem maiores mudanças estruturais associadas ao processo de oxidação. Inédita é também a dependência do coeficiente de difusão de Az624 com o pH. A variação associada ao processo de protonação poderá ser devida a mudanças conformacionais, ou à formação de agregados supramoleculares. A elucidação das razões destes comportamentos dependerá provavelmente da resolução das suas estruturas por métodos espectroscópicos (RMN) ou cristalografia e da determinação da massa molecular a vários valores de pH por equilíbrio de sedimentação ou por filtração em gel.

Uma outra diferença notável encontra-se no facto de nas azurinas de *Ps. chlororaphis* ser detectável estrutura super-hiperfina no espectro de RPE em banda X. Este comportamento foi descrito apenas para uma outra azurina, isolada de uma estirpe aparentada, *Ps. aureofaciens* ATCC 13985 (Zumft *et al.*, 1987) e reflecte, provavelmente, diferenças subtis na geometria do centro activo destas proteínas relativamente à generalidade das suas congéneres. As azurinas com estas características espectroscópicas poderão constituir sistemas experimentais promissores para estudar a influência de factores externos (por exemplo, agentes desnaturantes), mutações, etc., no acoplamento das histidinas com o centro activo de cobre.

A azurina de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 transfere electrões para a CuNiR do mesmo organismo. Este processo de transferência electrónica é relativamente lento, se comparado com outros descritos na literatura, o que sugere que a azurina poderá não ser o dador fisiológico mais importante da CuNiR.

6.3 AS REDUTASES DO NITRITO

A redutase do nitrito isolada de *Ps.chlororaphis* DSM 50135 é uma enzima azul, que contém dois tipos de centros de cobre, T1Cu e T2Cu, tal como as restantes CuNiRs conhecidas. Neste trabalho efectuou-se pela primeira vez uma determinação directa dos potenciais de ambos os centros de cobre, T1Cu e T2Cu, numa CuNiR, cujos valores

relativos parecem não ser consistentes com o mecanismo de transferência electrónica estabelecido. No entanto, e de acordo com a hipótese apresentada por Veselov *et al.* (1998), os dados de espectroscopia de RPE sugerem que haja modulação do potencial do centro activo por ligação do substrato, *i.e.*, que a ligação do nitrito ao centro T2Cu faça aumentar o seu potencial, tornando a transferência electrónica mais favorável. Os estudos de RPE com a enzima na forma "turnover" sugerem também, conforme sugerido por Kobayashi *et al.* (1999), que a transferência electrónica entre o T1Cu e o T2Cu seja o mais rápido dos três processos redox envolvidos na catálise: 1) redução do T1Cu pelo ditionito; 2) oxidação do T1Cu pelo T2Cu; e 3) redução do NO_2^- pelo T2Cu — com concomitante oxidação do T2Cu. Recentemente, observou-se em *Al. xylosoxidans* GIFU 1051 (Kobayashi *et al.*, 1999) que o potencial do centro T2Cu, mas não o do T1Cu, depende do pH. A forma protonada da enzima apresenta um potencial cerca de 100 mV mais alto do que a forma desprotonada, sendo assim de esperar que a pHs mais baixos a transferência intramolecular na presença de nitrito seja mais favorecida. O estudo da variação da actividade enzimática e dos potenciais de ambos os centros de cobre com o pH na CuNiR de *Ps. chlororaphis* é assim uma via de investigação que poderá ajudar a elucidar os aparentes entraves termodinâmicos à transferência electrónica para o substrato. A determinação dos parâmetros cinéticos da enzima por electrocatálise mediada pela azurina (cf. Iwasaki *et al.*, 1992) é outra das vias de investigação a empreender, uma vez que o ensaio enzimático habitual com benzilviologénio como dador de electrões, além de possuir um significado fisiológico bastante limitado, se revelou pouco reprodutível.

A redutase do nitrito isolada de *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T possui características espectroscópicas e cinéticas que a distinguem das redutases do nitrito típicas. A espectroscopia de RPE revela claramente a ausência de cobre na proteína, assim como dos sinais de spin baixo característicos dos hemos da cd_1NiR típicas. Por RPE, detecta-se um sinal de spin 5/2, provavelmente devido a um hemo *c* de spin alto.

O espectro de absorção electrónica corrobora esta identificação, e sugere também a presença de um hemo d_1. Ao contrário do observado nas cd_1NiRs típicas, a enzima isolada só parece ser susceptível de redução após ligação do substrato ao seu centro activo, sugerindo diferenças mecanísticas apreciáveis. A pequena quantidade de proteína obtida impediu porém a realização de estudos mais profundos (RPE das formas reduzida e ligada ao substrato, titulação redox, etc).

6.4 A REDUTASE DO NITRATO

A redutase do nitrato solubilizada de membranas de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 possui, tal como as outras NaRs descritas na literatura, vários agregados de FeS e um centro activo de Mo, o dinucleótido de guanina e molibdopterina. De acordo com o observado noutras NaRs, também na proteína isolada de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 existem agregados de FeS de potencial elevado e de potencial baixo. O centro activo de Mo apresenta uma transição entre duas formas, de pH alto e baixo, detectada por espectroscopia de RPE. Na forma de pH baixo observa-se um desdobramento hiperfino de um protão, que sugere a presença de um ligando OH. Por adição de ditionito, ocorre redução do centro activo de Mo(V) a Mo(IV). O centro reduzido pode ser reoxidado por nitrato, dando origem a um novo sinal de Mo(V), idêntico à forma de pH baixo inicial, o que revela semelhanças na geometria e estrutura electrónica de ambas as espécies. A origem dos diferentes sinais de RPE de Mo observados poderá ser esclarecida por estudos de EXAFS. Na amostra utilizada encontra-se presente um hemo *c* que aparentemente interage com o centro de Mo, sugerindo que esta NaR possua um hemo *c* em vez do habitual hemo *b*. Como, porém, a quantidade de hemo detectada é de apenas ≈5% da quantidade estequiométrica esperada (2 hemos/NaR), torna-se imperiosa uma identificação inequívoca do hemo presente e do seu papel. Estudos electroquímicos com a NaR nas membranas revelam que a transferência electrónica com dadores lipossolúveis (que doam os electrões à subunidade γ) é mais favorecida do que com

dadores hidrossolúveis (que doam os electrões directamente à subunidade α), o que indica que a via intramolecular de transferência electrónica é bastante eficiente. Esta hipótese é também apoiada pela observação de que o factor determinante na velocidade do processo de transferência electrónica é a diferença de potencial entre os dadores de electrões e a enzima, o que sugere que a transferência electrónica intermolecular constitui o passo limitante do processo.

7

EXPERIMENTAL

7.1 ESTIRPES BACTERIANAS

As estirpes bacterianas (Tabela 7.1) foram adquiridas sob forma liofilizada às respectivas colecções, e crescidas em meio líquido com composição definida (Tabelas 6.2 e 6.3) após re-hidratação. A sua manutenção foi feita em meio sólido, a 4 °C, após o desenvolvimento de colónias de aspecto homogéneo. De modo a comprovar ausência de contaminações, as diversas subculturas foram analisadas por microscopia óptica de contraste de fase.

Tabela 7.1 Estirpes bacterianas utilizadas neste trabalho.

Espécie	Estirpe	Referência
Ps. aureofaciens	ATCC 13985^T	Kluyver (1956); Skerman *et al.* (1980); Stanier *et al.* (1966)
Ps. fluorescens	DSM 6607	Busse *et al.* (1989)
Ps. chlororaphis	DSM 50082	Kluyver (1956); Haynes *et al.* (1956)
Ps. chlororaphis	DSM 50083^T	Skerman *et al.* (1980); Stanier *et al.* (1966)
Ps. chlororaphis	DSM 50135	Stanier *et al.* (1966)
Ps. chlororaphis	DSM 50139	Stanier *et al.* (1966)

7.2 CRESCIMENTO DAS ESTIRPES

As estirpes em estudo foram crescidas a pH 7.0 e a uma temperatura de 28 °C, num meio com composição definida (Tabelas 6.2 e 6.3) e agitação contínua. Os crescimentos aeróbicos foram efectuados em matrazes com rolha de algodão, enquanto que os crescimentos desnitrificantes foram efectuados na presença de nitrato e de algum oxigénio inicial, em recipientes fechados (condições microaeróbicas). Usaram-se inóculos frescos (até 2% v/v) crescidos aerobicamente em meio líquido. Os crescimentos foram monitorizados por medição da turbidez do meio de cultura (A_{660}) e observação dos microorganismos por microscopia de contraste de fase. Nos

crescimentos desnitrificantes procedeu-se também à quantificação nos meios de cultura do nitrito (método de Nicholas & Nason, secção 7.18) e do nitrato (método da fluorescência, secção 7.17). No crescimento de 300 L de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 monitorizou-se ainda, continuamente, a pressão parcial de O_2 e o pH (mantido dentro do intervalo 6.5-7.0 pela adição automática de ácido ou base) e a composição da fase gasosa no fermentador.

7.2.1 Condições de crescimento específicas para as escalas laboratorial e piloto

Os crescimentos em escala laboratorial foram efectuados em frascos de vidro autoclaváveis de volumes entre 100 mL e 2 L, cheios até ≈70% e fechados com septos de borracha. Isto permitiu não só realizar a fermentação em ambiente microaeróbico, como também fazer amostragens periódicas para monitorização, sem risco de contaminação.

O crescimento à escala piloto de DMS 50135 foi feito num fermentador de capacidade de 500 L na Unidade Piloto do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica em Oeiras, Portugal, usando 300 L de meio. A agitação foi feita com um agitador mecânico (pás), a uma velocidade de 40 rpm até às 32h de crescimento e 50 rpm durante o restante tempo. Utilizou-se um inóculo de 4 L, crescido em condições aeróbicas.

O crescimento em escala piloto de DSM 50083^T foi realizado no Laboratório de Química Bacteriana, Unidade de Fermentação e Purificação de Proteínas em Marselha, França, num fermentador de capacidade de 200 L.

7.2.2 Colheita e lavagem das células

Nos crescimentos em escala laboratorial, após um período entre 30 e 48h, procedeu-se à colheita das células por centrifugação, a 4 °C, medindo-se os rendimentos em peso húmido de células por unidade de volume de meio de crescimento. As células

foram lavadas com tampão fosfato 10 mM pH 7.0, ressuspendidas no mesmo tampão e conservadas a -20 °C, quando as células não foram utilizadas de imediato.

Tabela 7.2 Composição do meio de crescimento [a, b]

KH_2PO_4	2 g/L	NaCl	1 g/L
NH_4Cl	3 g/L	KCl	0.75 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g/L	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.05 g/L
citrato de trissódio di-hidratado [c]	5 g/L	solução de oligoelementos [e]	0.2 mL/L
extracto de levedura	2 g/L	solução-mãe de Fe & Cu [e]	1 mL/L
$NaNO_3$ [d]	variável	KOH 5 M	até pH 7.0

[a] Informações adicionais sobre os crescimentos encontram-se nas legendas das figuras respectivas; [b] Na preparação de meio sólido adicionou-se 15 g/L de agar ao meio descrito; [c] Nos crescimentos de *Ps. chlororaphis* DSM 50083^T usou-se 7 g/L de citrato; [d] Variou entre 1 e 6 g/L, conforme indicado em cada caso específico; [f] Ver composição na Tabela 7.3.

Tabela 7.3 Composição das soluções de oligoelementos e Fe & Cu.

Solução de oligoelementos (100 mL)			
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	144 mg	$MnSO_4 \cdot H_2O$	129 mg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	100 mg	$Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	4 mg
$Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$	4 mg	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	76 mg
$Na_2B_2O_7$	10 mg	HCl	5 mL

Solução-mãe de Fe & Cu (100 mL)					
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	2 g	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	20 mg	HCl	5 mL

Nos crescimentos à escala piloto, a colheita foi feita por centrifugação numa centrífuga Sharples, a 13 000 rpm, com fluxos de 60 L/h e à temperatura de 4 °C. As

células foram ressuspendidas em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7.6, e conservadas a -20 °C (estirpe DSM 50135) ou a -70 °C (estirpe DSM 50083^T).

7.3 PREPARAÇÃO DE EXTRACTOS CELULARES

7.3.1 Lise parcial: esferoplastos e fracção periplasmática

Adicionou-se lisozima a uma suspensão de células previamente sujeitas a um ciclo congelação–descongelação em tampão fosfato 10 mM pH 7.0 (0.4 g de células em 10 mL de tampão), incubando-se a 28 °C durante cerca de 3 h. Procedeu-se então à diluição (3×) da suspensão com água desionisada, de modo a provocar choque osmótico. Centrifugou-se o extracto celular assim obtido durante 90 min, a 35 000×*g*, mantendo a temperatura abaixo dos 6 °C. O precipitado obtido (esferoplastos) foi ressuspendido em tampão fosfato 10 mM pH 7.0 (1 mL / 0.4 g células), enquanto que o sobrenadante (fracção periplasmática) foi concentrado e dialisado, usando uma membrana com limite de exclusão de 10kDa, da Amicon (YM10), no mesmo tampão (10 mL/0.4 g células).

7.3.2 Lise total: fracção solúvel e fracção membranar

Suspendeu-se a pasta celular em Tris 10 mM pH 7.6, procedendo-se em seguida à sua lise por um homogeneizador Manton Gaulin, usando uma pressão de 9 000 MPa. Os resíduos celulares e células inteiras foram separados por centrifugação (20 000×g durante 30 min, a 4 °C), sendo as fracções membranar e solúvel separadas por ultracentrifugação (180 000×g durante 90 min, a 4 °C). Ao tampão usado, bem como a todos os tampões usados durante a purificação de proteínas de cobre, adicionou-se 10 μM Cu^{2+}(aq), de modo a estabilizar o centro metálico das referidas proteínas. Durante a purificação todos os tampões usados foram preparados a pH 7.6.

7.4 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS

Em cada passo cromatográfico, todas as fracções obtidas foram dialisadas e concentradas por ultrafiltração, de modo a ficarem no tampão de equilíbrio usado no passo seguinte. Foram também centrifugadas a 9 000×g durante 5-10 min, para retirar proteína precipitada e outras impurezas. A monitorização das purificações baseou-se nas razões espectroscópicas (UV-Vis), no comportamento electroforético das amostras em gel de poliacrilamida e, no caso de enzimas, nas respectivas actividades enzimáticas.

7.4.1 Purificação das azurinas

Na concentração das fracções por ultrafiltração utilizaram-se membranas YM10. A característica cor azul destas pequenas proteínas facilitou a sua monitorização durante o processo de purificação, usando-se como índice de pureza a razão espectral A_{620}/A_{280}. O processo de purificação para ambas as azurinas, que se descreve seguidamente, foi muito semelhante.

A fracção solúvel do extracto celular foi aplicada numa coluna de troca iónica DEAE-celulose 52 (5 cm × 40 cm) equilibrada com Tris 10 mM, sendo a eluição feita com um gradiente do mesmo tampão, até 1 M. A azurina não se ligou à resina, tendo eluído durante a lavagem com o tampão inicial. A fracção azul foi em seguida aplicada numa coluna de adsorção HTP (2.6 cm × 15 cm) equilibrada com Tris 10 mM, e eluída com um gradiente até 200 mM em tampão fosfato, saindo a uma concentração salina de ≈50 mM. Por fim, a proteína foi submetida a uma filtração em gel Sephadex 75 (2.6 cm × 60 cm) equilibrada com Tris 0.3 M, a qual permitiu a separação de duas sub-fracções de azurina, com índices de pureza respectivamente superiores ou inferiores a 0.30.

7.4.2 Purificação da redutase do nitrito (estirpe DSM 50135)

A monitorização da enzima foi feita por electroforese em condições nativas, usando o processo de coloração de actividade, conforme descrito na secção 7.7.3. Fez-se também a análise por espectroscopia de absorção electrónica das fracções obtidas (A_{280}/A_{600}). Na concentração por ultrafiltração foram usadas membranas de limite de exclusão molecular de 30 kDa (YM30).

A fracção solúvel do extracto celular foi aplicada numa coluna de troca iónica DEAE-celulose 52 (5 cm × 40 cm) equilibrada com Tris 10 mM e eluída com um gradiente do mesmo tampão, até 400 mM. A coluna ficou sobrecarregada, pelo que se voltou a injectar a fracção não ligada numa coluna idêntica. Ao todo, seis fracções com actividade de redutase do nitrito (NiR) eluíram de ambas as colunas, a força iónica até ≈200 mM. Todas as fracções com actividade de NiR foram sequencialmente injectadas numa coluna de troca iónica Source 15Q (1.6 cm × 30 cm), equilibrada com Tris 10 mM, eluindo a forças iónicas compreendidas entre 20 e 50 mM Tris. Finalmente, esta última fracção foi submetida a uma filtração em gel Superdex 75 (2.6 cm × 60 cm), equilibrada com Tris 0.3 M, obtendo-se uma fracção bastante pura (índice de pureza, A_{280}/A_{600}, de 18.8).

7.4.3 Purificação da redutase do nitrito (estirpe DSM 50083^T)

A monitorização da enzima foi também feita por electroforese com coloração de actividade e por espectroscopia electrónica das fracções obtidas (monitorizou-se a razão espectral A_{280}/A_{406}). Na concentração por ultrafiltração foram usadas membranas YM30.

Aplicou-se a fracção solúvel do extracto celular numa coluna de troca iónica DEAE-celulose 52 (5 cm × 40 cm), equilibrada com tampão Tris 10 mM. Uma fracção com actividade de redutase do nitrito eluiu a força iónica ≈250 mM Tris. Utilizou-se então uma coluna de adsorção HTP (4 cm × 14 cm) equilibrada com Tris 10 mM,

procedendo-se à sua eluição com um gradiente de fosfato até 150 mM, seguido de lavagem com o mesmo tampão, 0.5 M. Todas as fracções saídas após ≈50 mM apresentaram actividade enzimática, pelo que foram reunidas numa única fracção. Esta foi aplicada numa coluna de troca iónica Source 15Q (1.6 cm × 30 cm) equilibrada em Tris 10 mM, e eluída com um gradiente até 0.4 mM no mesmo tampão; a fracção com actividade de NiR eluiu a ≈150 mM. Esta fracção foi então submetida a uma filtração em gel Superdex 200 (2.6 cm × 60 cm), equilibrada com Tris 0.3 M, tendo-se obtido duas fracções com diferentes graus de pureza. A fracção mais pura foi aplicada numa coluna de troca iónica Q-Resource (coluna pré-empacotada, de 6 mL), equilibrada em tampão Tris 10 mM. A eluição fez-se com gradiente no referido tampão até 0.3 M, tendo a fracção NiR eluído a ≈180 mM.

7.5 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS MEMBRANARES

7.5.1 Extracção das proteínas

Procedeu-se à extracção das proteínas membranares com Triton X-100 2% em Tris 10 mM. Para tal, diluiu-se o extracto membranar com o referido tampão até uma concentração proteica de ≈20 mg/mL e deixou-se em agitação constante durante a noite, a 4 °C. O extracto membranar solúvel foi separado por ultracentrifugação (180 000×g durante 90 min, a 4 °C) e extensamente dialisado contra Tris 10 mM, a 4 °C.

7.5.2 Purificação da redutase do nitrato (estirpe DSM 50135)

A monitorização da enzima fez-se por electroforese em condições nativas e desnaturantes, usando coloração para proteína, actividade de NaR e hemos, e por ensaios quantitativos de actividade e de proteína. Fez-se também a análise por espectroscopia electrónica das fracções obtidas: A_{410}, nos primeiros passos da purificação e A_{280}/A_{410}, na fase final, após se ter reduzido ao mínimo a quantidade de

Triton X-100, pois este absorve fortemente na região do UV próximo. Na concentração por ultrafiltração foram usadas membranas YM30.

O extracto membranar solúvel foi aplicado numa coluna de troca iónica DEAE-celulose 52 (5 cm × 40 cm), previamente equilibrada com Tris 10 mM, 1% Triton. A eluição foi feita com um gradiente de 0 até 400 mM NaCl, no referido tampão. A coluna ficou sobrecarregada, pelo que se voltou a injectar a fracção não ligada numa coluna idêntica, tendo a redutase do nitrato (NaR) eluído a ≈240 mM NaCl. Carregou-se então esta fracção numa coluna de adsorção HTP (4.5 cm × 17.5 cm) equilibrada em Tris 10 mM, 0.1% Triton e efectuou-se a sua eluição com um gradiente de fosfato até 200 mM, 0.1% Triton, seguida de lavagem com 500 mM fosfato. As duas fracções saídas entre 120 e 150 mM apresentaram actividade enzimática, pelo que foram sequencialmente injectadas numa coluna de troca iónica Source 15Q (2.6 cm × 30 cm), equilibrada em Tris 10 mM, 100 mM NaCL, 0.1% Triton. A eluição fez-se com um gradiente de 100 até 400 mM NaCl. Obtiveram-se duas fracções com actividade de NaR, uma mais impura, eluída a ≈235 mM NaCl e outra mais pura, eluída a ≈250 mM NaCl. Utilizou-se ainda outra coluna de troca iónica DEAE-Sepharose (2.6 cm × 30 cm), equilibrada em Tris 10 mM, 100 mM NaCL, 0.05% Triton. Fez-se a eluição com um gradiente de 100 até 300 mM NaCl. Várias fracções, com diferentes graus de pureza, foram eluindo sucessivamente num único grande pico, a ≈200 mM NaCl.

7.6 ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Todas as electroforeses foram realizadas conforme o sistema descrito por Laemmli (1970). Trata-se de um sistema descontínuo, consistindo em dois geles contíguos mas distintos: um gel concentrador (em cima) e um outro resolvente (em baixo). Estes dois geles são empacotados com diferentes porosidades, pH e força iónica. Há também descontinuidade no tampão, que serve para concentrar grandes volumes de

amostras no gel concentrador, de onde resulta uma resolução melhorada no gel resolvente.

Foram realizadas electroforeses quer em condições desnaturantes quer nativas (respectivamente, em presença ou ausência de SDS e β-mercaptoetanol). Usaram-se geles de concentração homogénea e de concentração gradiente em acrilamida. Estes últimos permitem analisar num mesmo gel proteínas de massas moleculares muito afastadas.

Os protocolos dos diferentes tipos de geles usados são apresentados nas secções seguintes. Todas as soluções usadas devem ser preparadas com água Millipore [1].

7.6.1 Gel de concentração homogénea em acrilamida

Reagentes

NOTAS: As soluções indicadas destinam-se a electroforeses desnaturantes; as soluções para electroforeses nativas diferem das primeiras unicamente por não terem SDS nos tampões de electroforese e da amostra, nem β-mercaptoetanol no tampão da amostra.

- Tampão do gel resolvente (1.5 M Tris pH 8.8): num volume final de 100 mL dissolver 18.17 g Tris (forma básica), acertando o pH com HCl até ao valor de 8.8. Guardar em frasco de vidro escuro, a 4 °C.
- Tampão do gel concentrador (0.5 M Tris pH 6.8): num volume final de 100 mL dissolver 6.06 g Tris (forma básica), acertando o pH com HCl até ao valor de 6.8. Guardar em frasco de vidro escuro, a 4 °C.
- Solução de persulfato de amónio (APS) 10%. Preparar imediatamente antes de usar.
- N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED): usar directamente.

---

(1) Água ultra-pura, com uma resistividade de 18.2 MΩ cm.

- Solução-mãe de acrilamida (30%)/ bisacrilamida (0.8%): num volume final de 100 mL dissolver 30 g de acrilamida e 0.8 g de bisacrilamida. Filtrar através de uma membrana 0.45 μm e guardar em frasco de vidro escuro, a 4 °C. (ATENÇÃO: os monómeros de acrilamida e bisacrilamida são neurotóxicos, pelo que se deve usar sempre luvas e induzir polimerização antes de eliminar restos destes compostos.)
- Solução-mãe de dodecilssulfato de sódio (SDS) 10%. Guardar à temperatura ambiente.
- Tampão de electroforese Tris-Glicina 10×: num volume total de 1 L dissolver 30.3 g de Tris (forma básica), 144.1 g de glicina e 10 g de SDS. O pH desta solução deve ser 8.3. Antes de usar, diluir de 1:10. (solução 1× ⇒ 25 mM Tris pH 8.3; 192 mM glicina; 0.1% SDS).
- Tampão para as amostras 2×: num volume total de 10 mL dissolver 2.4 mL de 0.5 M Tris pH 6.8 (tampão do gel concentrador), 4 mL de SDS 10%, 2 mL de glicerol, 1 mL de β-mercaptoetanol e 0.5 mL de solução 1% de azul de bromofenol em água. Guardar a –20 °C em alíquotas, em tubos Eppendorf. (solução 1× ⇒ 60 mM Tris pH 6.8; 2% SDS; 10% glicerol; 5% de β-mercaptoetanol; 0.025% azul de bromofenol).

Procedimento

Polimerizar o gel resolvente: limpar e montar cuidadosamente o suporte do gel. Verificar que não há fugas. Preparar o gel resolvente de acordo com a composição indicada na Tabela 7.4 (usar 5 mL em "mini-gel" e 30 mL em "long-gel"). Notar que com a adição de APS e TEMED se inicia o processo de polimerização, pelo que se deve ter tudo preparado para rapidamente verter a solução de monómero para a polimerização. Com uma pipeta Pasteur, colocar imediatamente uma pequena camada de 2-butanol sobre o gel para este polimerizar com uma superfície regular. Após polimerização, lavar bem a superfície do gel com água destilada e secar, antes de colocar a camada de gel concentrador.

Tabela 7.4 Composição do gel resolvente [1, 2]

Solução mãe	% acrilamida			
	7.5	**10**	**12.5**	**15**
1.5 M Tris pH 8.8	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL
Acrilamida 30%	1.25 mL	1.67 mL	2.08 mL	2.5 mL
SDS 10%	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
H_2O	2.42 mL	2.00 mL	1.60 mL	1.18 mL
desarejar				
APS 10%	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
TEMED	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL

[1] Estas soluções destinam-se à preparação de geles desnaturantes. Na preparação de geles nativos, o SDS é omitido. [2] Os volumes indicados destinam-se a um "mini-gel" (5 mL).

Tabela 7.5 Composição do gel concentrador [1, 2]

Solução mãe	% acrilamida
	4
0.5 M Tris pH 6.8	0.5 mL
Acrilamida 30%	0.27 mL
SDS 10%	20 µL
H_2O	1.20 mL
desarejar	
APS 10%	10 µL
TEMED	2 µL

[1] Ver notas na Tabela 7.4. [2] Os volumes indicados destinam-se a um "mini-gel" (2 mL).

Polimerizar o gel concentrador: preparar o gel concentrador de acordo com a composição indicada na Tabela 7.5 (usar 2 mL em "mini-gel" e 10 mL em "long-gel"). Após adicionar o gel para polimerizar, colocar o pente para formar os poços, sem formar bolhas. Deixar polimerizar completamente antes de iniciar a electroforese.

Preparar as amostras: adicionar igual volume de amostra e tampão de amostra (usar cerca de 5 μg de proteína em "mini-gel" e 30 μg em "long-gel"). Ferver as amostras durante 2 min (excepto se for em condições nativas) e centrifugar.

Electroforese: aplicar as amostras nos poços e aplicar um potencial de150 V.

7.6.2 Gel de gradiente de concentração em acrilamida

O gel de gradiente de concentração em acrilamida é preparado de acordo com a composição indicada na Tabela 7.6. A preparação do gradiente no gel resolvente é feita

Tabela 7.6 Composição do gel de gradiente de concentração (5-20%) em acrilamida, em presença de 1% de SDS.

	Gel resolvente		**Gel concentrador**
Solução	**% acrilamida**		
mãe	**5**	**20**	**4**
3 M Tris pH 8.8	1.875 mL	1.875 mL	—
0.5 M Tris pH 6.8	—	—	2.5 mL
Acrilamida 30%	2.5 mL	10 mL	1.2 mL
SDS 10%	1.5 mL	1.5 mL	0.9 mL
sacarose	—	2,25 g	—
H_2O	9.125 mL	0.375 mL	4.4 mL
desarejar			
APS 10%	75 μL	75 μL	75 μL
TEMED	7.5 μL	7.5 μL	7.5 μL

com a ajuda de uma câmara de gradiente, colocando-se num dos compartimentos a solução 5% acrilamida e no outro a solução 20%. Inicia-se a formação do gradiente e começa-se a verter para o suporte do gel, cuidadosamente. Em seguida, o modo de preparação é idêntico ao gel normal.

7.7 COLORAÇÃO DOS GELES DE POLIACRILAMIDA

Após realizar a electroforese, procedeu-se à fixação e coloração das proteínas no gel. Consoante o objectivo, fez-se a coloração de todas as proteínas do gel, ou só das proteínas hémicas (Goodhew *et al.*, 1986), ou ainda apenas das proteínas com determinada actividade enzimática (Hucklesby & Hazeman, 1973).

7.7.1 Coloração com azul de Coomassie

Reagentes

- Solução corante: adicionar 1 g de Coomassie Brilliant Blue R-250 a 200 mL de solução descorante. Guardar à temperatura ambiente. Pode ser reutilizada.
- Solução descorante: adicionar 75 mL de ácido acético, 450 mL de metanol e água até ao volume final de 1 L. Pode ser reutilizada após filtração.

Procedimento

Corar: colocar o gel na solução corante durante 30 min.

Descorar: colocar o gel na solução descorante, mudando a solução algumas vezes. Deixar durante a noite, em recipiente fechado.

Preservação do gel: secar o gel, após lavagem em água destilada. Fotografar o gel ou digitalizar sua imagem.

7.7.2 Coloração de hemos

Os citocromos do tipo *c* são os únicos que retêm quantitativamente os seus hemos durante a electroforese na presença de SDS, de modo que podem ser identificados em misturas complexas pela actividade de peroxidase. Usando como substrato a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMBZ) forma-se um precipitado azul.

Reagentes

- Solução 1.25 mM TMBZ em metanol / 0.25 M acetato de sódio pH 5 (30:70).
- H_2O_2 26 mM (0.29 g de H_2O_2 30% (m/m) para 100 mL de solução TMBZ)
- Solução descorante: 0.25 M propanol / 0.25 M acetato de sódio pH 5 (30:70).

Procedimento

a. Colocar o gel na solução TMBZ durante 30 min no escuro, com agitação constante.
b. Adicionar H_2O_2. Deixar estar no escuro 10 min com agitação constante.
c. Descorar: lavar 2 vezes com solução descorante. Secar o gel rapidamente.

7.7.3 Coloração de actividade enzimática

O esquema de visualização da coloração de actividade é apresentado na Figura 7.1. Por motivos óbvios, esta coloração só se utiliza em geles nativos.

Reagentes

- Solução A: adicionar 100 mg de nitrato ou nitrito de sódio e 100 mg de metilviologénio a 100 mL de tampão fosfato 0.1 M pH 7.
- Solução B: adicionar 120 mg de ditionito de sódio a 3 mL de solução 0.1 M de $NaHCO_3$, previamente desarejados.
- Solução C: adicionar 250 mg de TTC (cloreto de trifeniltetraazólio) a 10 mL de água desionisada.

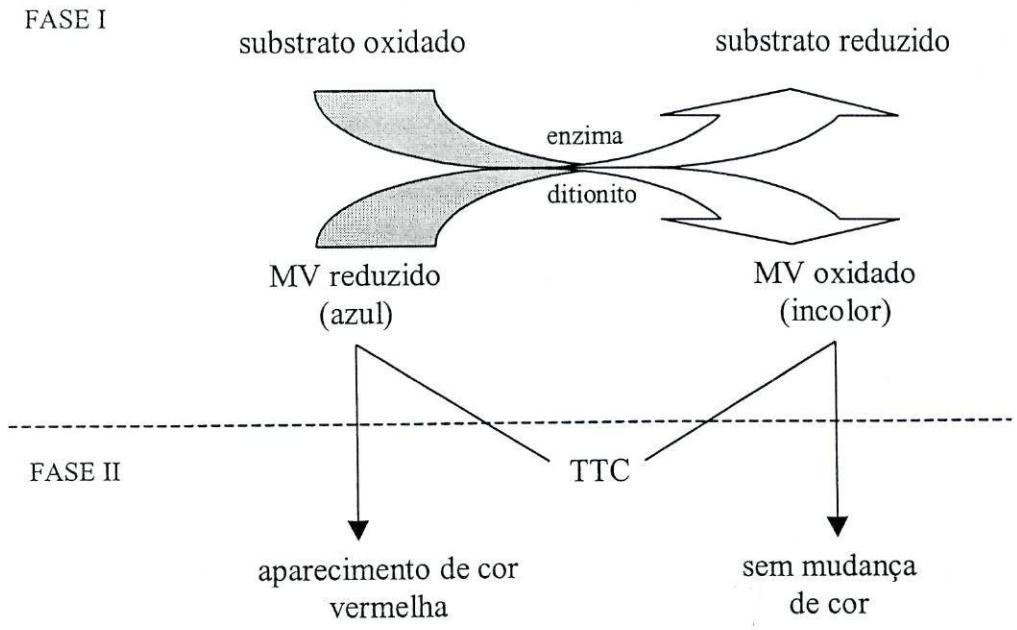


Figura 7.1 Coloração de gel pela actividade enzimática: esquema de visualização.

Procedimento

Preparar a solução A e desarejar com azoto ou árgon no recipiente de coloração. Imergir o gel na solução, cobrir o recipiente e desarejar. Preparar a solução B e adicionar B a A usando uma seringa, de modo a não deixar entrar ar no recipiente que contém o gel. Incubar o gel até aparecerem bandas acromáticas num fundo azul. Injectar então a solução C e agitar suavemente para obter uma boa homogeneização. Incubar o gel no escuro a 5-10 °C até o fundo azul se tornar vermelho. Lavar o gel em água desionisada e fixar em 50% etanol.

7.8 DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉCTRICO DAS PROTEÍNAS

O ponto isoeléctrico das proteínas foi determinado por focagem isoeléctrica. Usou-se um gel Ampholine® PAGplate da Pharmacia, de matriz de poliacrilamida T=5% e C=3% e dimensões 245×110×1 mm, com valores de pH entre 3.5 e 9.5.

As condições de focagem foram as seguintes: potência constante, P=10 W; tempo de focagem, 1h 30min, até atingir o equilíbrio (V≈1500 V e I baixo e aproximadamente constante); temperatura, 10 °C; solução anódica, H_3PO_4 1 M e solução catódica, NaOH 1 M. Usou-se 20 μL de amostra, com ≈5 μg proteína. Os padrões de pI usados (padrões de baixo pI da Pharmacia) são apresentados na Tabela 7.7.

Tabela 7.7 Padrões de pI usados na focagem isoeléctrica.

Padrão	pI
amiloglucosidase	3.50
vermelho de metilo	3.75
glucose oxidase	4.15
inibidor de tripsina da soja	4.55
β-lactoglobulina	5.20
anidrase carbónica bovina	5.85
anidrase carbónica humana	6.55

A coloração foi feita de acordo com o protocolo seguinte.

Reagentes

Solução de fixação: adicionar 29 g de ácido tricloroacético e 8.5 g de ácido sulfosalicílico a 250 mL de água desionisada.

Solução corante: dissolver 0.1g Azul de Coomassie G-250 em 100 mL de uma solução aquosa 25% em metanol e 5% em ácido acético.

Solução descorante: adicionar 500 mL de etanol e 160 mL de ácido acético e completar com água desionisada, até um volume de 2 L.

Solução de preservação: adicionar 25 mL de glicerol a 250 mL de solução de descoloração.

Procedimento

Fixação: retirar a tira de colocação das amostras e incubar o gel na solução de fixação durante 60 min.

Lavagem: incubar o gel em solução de descoloração durante 30 min

Coloração: incubar o gel na solução corante durante a noite.

Descoloração: incubar em solução descorante até serem visíveis as bandas.

Preservação: incubar em solução de preservação durante 60 min. De seguida, o gel é seco à temperatura ambiente, sob um vidro coberto com papel celofane embebido na solução de preservação. O excesso de glicerol pode ser retirado com etanol ou água.

7.9 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DAS PROTEÍNAS

A determinação da massa molecular das proteínas foi feita quer em condições desnaturantes, utilizando SDS-PAGE (cf. secção 7.6), quer em condições nativas, por filtração em gel (analítica).

7.9.1 Filtração em gel (analítica)

Utilizou-se uma coluna Superdex 75 HR 10/30 da Pharmacia. As condições da cromatografia foram: tampão de eluição, 50 mM Tris HCl, 100 mM KCl; fluxo, 0.5 mL/min; loop de injecção: 200 μL. Os padrões de peso molecular usados são apresentados na Tabela 7.8. O volume vazio da coluna foi determinado usando azul de dextrano.

Tabela 7.8 Padrões de massa molecular usados na determinação de massa molecular por filtração em gel.

Padrão	MM (kDa)
aprotinina	6.5
citocromo c	12.4
anidrase carbónica	29.0
ovoalbumina	45.7
albumina sérica bovina	66.0
β-amilase	200

7.10 SEQUENCIAÇÃO N-TERMINAL

A sequenciação do N-terminal da azurina foi feita num sistema Applied Biosystems 491 Protein Sequencer.

7.11 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL: MÉTODO DE MICRO-BIURETO

A proteína foi quantificada segundo o método do micro-biureto (Bensadoun & Weinstein, 1976). A determinação espectrofotométrica de proteína por este método baseia-se na formação, em meio alcalino, de complexos entre iões cobre(II) e as ligações peptídicas. A cor violeta característica destes complexos pode ser medida ao comprimento de onda de 545 nm. A proteína é separada de cofactores interferentes e tampão por precipitação ácida.

Reagentes

- Desoxicolato de sódio (DOC) 0.15% (m/v)
- Ácido tricloroacetico (TCA) 70% (m/v)

- Solução de hidróxido de sódio 3% (m/v)
- Reagente de micro-biureto: 173 g citrato de trissódio diidratado e 100 g carbonato de sódio dissolvidos em água Millipore até ao volume final de 600 mL (solução 1); 17.3 g sulfato de cobre(II) pentaidratado dissolvido em 300 mL de água destilada aquecida (solução 2). A solução 2 é lentamente adicionada à solução 1 sob agitação. Perfaz-se o volume final de 1 000 mL. A solução azul escura é estável durante várias semanas, se protegida da luz.
- Solução padrão de albumina sérica bovina (BSA): prepara-se uma solução de concentração 10 mg/mL. Devido à natureza higroscópica de proteínas liofilisadas, a preparação gravimétrica de padrões de proteína são difíceis. Normalmente, a concentração é determinada espectrofotometricamente. Uma solução de concentração 1 mg/mL de BSA tem uma absorbância de 0.667 a 279 nm.

Procedimento

Precipitação da proteína: preparar as amostras em triplicado (10, 20 e 50 µL), dois brancos e cinco amostras de BSA padrão (10, 20, 30, 40 e 50 µL $\Rightarrow$ 0.1 a 0.5 mg proteína) em tubos Eppendorf. Ajustar o volume até 1 mL com água destilada. Adicionar 0.1 mL de DOC 0.15%, misturar e deixar repousar durante 5 min. Adicionar 0.1 mL de TCA 70%, misturar e centrifugar 5 min a 9 000×g (centrífuga de Eppendorfs). Marcar a orientação de cada tubo na centrífuga. A proteína precipitada pode ser observada como uma pálida sombra na parede dos tubos. Remover cuidadosamente o sobrenadante por aspiração com uma pipeta Pasteur.

Dissolução do precipitado de proteína: adicionar 1 mL de NaOH 3% a cada tubo Eppendorf. Agitar fortemente no vortex para dissolver o precipitado. Verificar que a dissolução tenha sido completa.

Reacção de biureto: adicionar 50 μL do reagente de microbiureto, misturar fortemente durante 10 s. Deixar a cor desenvolver à temperatura ambiente, no escuro, durante pelo menos 10 min.

Medição: medir a absorbância das soluções a 545 nm contra a água.

7.12 Determinação do Ferro lábil com Fereno

O ferro lábil foi determinado espectrofotometricamente segundo o método do fereno (Smith *et al.*, 1984). O ferro complexado pela proteína é libertado por tratamento com ácido clorídrico. O excesso de ácido é neutralizado com acetato de amónio e o ião Fe^{3+} é convertido em Fe^{2+} por redução com ácido ascórbico. A proteína precipitada é complexada com SDS. Finalmente, adiciona-se um quelante do ferro, que forma um complexo azul.

Reagentes

- Ácido clorídrico 1% (m/v)
- Solução de acetato de amónio 15% (m/v)
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) 2.5% (m/v)
- Ácido ascórbico 4% (m/v), preparado de fresco
- Quelante do ferro: 3-(2-piridil)-5,6-bis(5-sulfo-2-furil)-1,2,4-triazina, sal dissódico triidratado (fereno) 1.5% (m/v)
- Solução padrão de ferro: 0.2 mM $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.6H_2O$ (sal de Mohr 0.008% (m/v), preparado de fresco).

Procedimento

1. *Tratamento com ácido*: Preparar as amostras em triplicado (10, 20 e 50 μL), dois brancos e quatro amostras de padrão de ferro (10, 25, 50 e 100 μL ⇒ 2 a 20 nmol

Fe) em tubos Eppendorf. Ajustar o volume até 100 μL com água Millipore. Adicionar 100 μL 1% HCl e misturar por agitação suave.

2. *Incubação a 80 ºC*: Os tubos Eppendorf são fechados e incubados a 80 °C durante 10 min. Deixar arrefecer os tubos após o tratamento a 80 °C (deixar fechados).
3. *Quelatação*. Adicionar sequencialmente, agitando em vortex após cada adição: 500 μL 15% acetato de amónio, 100 μL 4% ácido ascórbico, 100 μL 2.5% SDS, 100 μL quelante de ferro.
4. *Centrifugação*: centrifugar durante pelo menos 5min a 9 000 × g
5. *Medição*: medir a absorbância das soluções a 593 nm contra a água.

7.13 ANÁLISE DE HEMOS

7.13.1 Extracção de hemos

A extracção dos hemos foi feita com acetona acidificada, a 0 °C e às escuras, usando uma adaptação do método de Hill & Wharton (1978). Uma amostra de 0.7 mL de solução ≈2 mg/mL de proteína foi tratada com 5.6 mL de acetona acidificada fria (0.015 M HCl), causando a precipitação da proteína e extracção dos hemos não covalentemente ligados para a acetona. A apoproteína foi então separada da acetona por centrifugação (5 000 rpm, 2 min). Repetiu-se a extracção com acetona acidificada, usando desta vez 3 mL de acetona, de modo a assegurar completa remoção dos hemos solúveis. A fracção solúvel foi colocada sob fluxo de árgon, em gelo, durante 4 h, para evaporar a acetona, procedendo-se depois à sua ressuspensão em Tris 100 mM pH 8 (quando necessário, acertou-se o pH final com NaOH). A apoproteína foi também ressuspendida em Tris 100 mM pH 8.

7.13.2 Identificação e quantificação de hemos

A identificação e quantificação dos hemos foi feita pelo método do hemocromo de piridina (Berry & Trumpower, 1987). Os hemocromos são complexos formados por coordenação da piridina com o hemo, que devem ser preparados em meio básico, o qual cria condições para que a desnaturação da proteína ocorra, facilitando o acesso da piridina ao hemo. Os espectros ópticos das formas oxidada e reduzida dos hemocromos de piridina permitem identificar os tipos de hemos presentes e quantifica-los (cf. Tabela 7.9, $\lambda_{máx}$ e ε).

Tabela 7.9 Características espectroscópicas da forma reduzida dos hemocromos de piridina de diversos citocromos.

Citocromo	Hemo	α (ε/mM^{-1}cm^{-1})	β (ε/mM^{-1}cm^{-1})	Soret (ε/mM^{-1}cm^{-1})
a, a_1, a_3 [1]	hemo a	587 (22.8)		430
b, P-450 [2]	protohemo IX	557 (34.4)	526 (17.5)	418.5 (191.5)
c [3]	hemo c	551 (29.1)	522 (18.6)	415
d_1 [3]	clorina	620 (24)		412

[1] Morrison & Horie, 1965; [2] Falk,1964; [3] Fuhrhop & Smith, 1975; [4] Hill & Wharton, 1978.

Procedimento

1. *Formação do hemocromo*: Adicionar à solução de proteína 75 μL de NaOH 1 M e 25 μL piridina 100%. Ajustar o volume até 1 mL com água Millipore. Medir os espectros UV-Vis das soluções entre 350 e 700 nm, usando a água como branco.
2. *Redução do hemocromo*: Adicionar alguns cristais de ditionito de sódio (não mais do que 3 mg/mL) e dissolvê-los por rotação suave da célula espectrofotométrica

(para evitar arejar a solução). Medir os espectros UV-vis das soluções entre 350 e 700 nm, usando a água como branco.

7.14 ANÁLISE DE NUCLEÓTIDOS DE PTERINA

Os nucleótidos foram extraídos por desnaturação da proteína por aquecimento em presença de ácido sulfúrico 3%, como descrito na literatura (Frunzke *et al.*, 1993; Gremer & Meyer, 1996). A sua identificação e quantificação foi feita por cromatografia de fase reversa, por comparação com padrões de GMP e CMP.

Procedimento

1. *Preparação da amostra*: dialisou-se extensamente a proteína contra água Millipore até uma concentração final de ≈10 μM. Prepararam-se tomas de 120 μL com 3% (v/v) H_2SO_4 concentrado (Merck). Aqueceu-se a 95 °C durante 10 min. Centrifugou-se a 14 000 rpm durante 10 min.
2. *Preparação dos padrões*: preparou-se CMP e GMP 1 mg/mL, que se diluíu 1:100 e 1:1 000 em água Millipore. O restante procedimento foi igual ao da amostra.
3. *Cromatografia*: usou-se uma coluna de fase reversa, Merck LiChorsper 100 (250 × 4) RP-18e, de 4 μm. A análise foi efectuada num HPLC Merck L-7100 equipado com um detector UV L-7100. A detecção foi feita a 254 nm. Usou-se como eluente acetato de amónio (qualidade HPLC) 50 mM pH 6.8, previamente filtrado e desarejado (5 min em ultra-sons), a um fluxo de 1 mL/min. As determinações quantitativas foram feitas com um "loop" de injecção de 50 μL.

7.15 Quantificação do cobre

7.15.1 Absorção atómica

O cobre foi determinado por Espectroscopia de Absorção Atómica na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

7.15.2 Quantificação de spin

A concentração de um paramagneto pode ser determinada comparando o integral duplo do seu espectro de RPE com o de um padrão externo de concentração conhecida (por ex: CuEDTA). Para se poder comparar as intensidades dos espectros do padrão e da amostra é necessário conhecer os valores de g e as condições de medição, para normalizar as probabilidades de transição (Aasa & Vänngård, 1975). Partindo dos espectros da amostra (a) e do padrão (p), obtidos no mesmo espectrofotómetro em condições não saturantes, a concentração de spin da amostra (C_a) é dada por:

$$C_a = C_p \cdot \frac{\iint a}{\iint p} \cdot \frac{g_p^{av}}{g_a^{av}} \cdot \frac{T_a}{T_p} \cdot \frac{MA_p}{MA_a} \cdot \sqrt{\frac{P_p}{P_a}} \cdot \frac{\phi_p}{\phi_a} \cdot \frac{G_p}{G_a}$$

em que T é a temperatura (K), MA é a modulação de amplitude, P é a potência das microondas (W), ϕ é o diâmetro interno do tubo de RPE, G é o ganho do receptor e g^{av} é dado por (cf. Aasa & Vänngård, 1975):

$$g^{av} = \frac{2}{3} \cdot \sqrt{\frac{g_x^{\,2} + g_y^{\,2} + g_z^{\,2}}{3}} + \frac{g_x + g_y + g_z}{9}$$

Usou-se uma solução-padrão de CuEDTA, 3.0 mM. A calibração dos tubos de RPE foi feita por um de dois métodos: medição da altura de um pico no espectro de uma dada solução-padrão, ou, mais simplesmente, usando como factor de calibração o

inverso da altura da coluna de líquido obtida ao encher os tubos com uma quantidade fixa de água (por ex: 200 μL medidos com uma seringa Hamilton).

7.15.3 Reconstituição dos centros de cobre tipo 2

Incubaram-se, a 4 °C, alíquotas de enzima (360 μM) numa solução de $CuSO_4$ 1 mM em Tris-HCl 0.1 M pH 7.6, mudando a solução por diálise (50 ×) em Centricon-10. De seguida, procedeu-se à remoção do excesso de $CuSO_4$ em solução, por diálise extensiva contra Tris-HCl 0.1 M pH 7.6.

7.16 Ensaios de actividade enzimática

7.16.1 Redutase do nitrato

A actividade de redutase do nitrato foi medida usando metilviologénio reduzido por ditionito como dador de electrões. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente, numa célula de quartzo contendo 100 mM tampão fosfato pH 7.0, 0.5 mM metilviologénio e uma alíquota de amostra, num volume total de 2 mL. A célula foi fechada com septo de borracha e desarejada com árgon. Adicionou-se então 10-20 μL de ditionito 50 mM, para reduzir o metilviologénio até $A_{604} \approx 1.2$. Após confirmar que a taxa de oxidação do metilviologénio fosse praticamente nula, iniciou-se a reacção com adição de substrato (nitrato ou clorato) 50 mM. A oxidação do metilviologénio foi seguida pela diminuição da absorvância a 604 nm ao longo do tempo. A actividade específica foi calculada usando o valor de 13.6 $mM^{-1}cm^{-1}$ para o coeficiente de extinção molar (ε604) do metilviologénio reduzido (van Dijk *et al.*, 1979), sendo os valores de actividade expressos em Umg^{-1} proteína total (1 U=1 μmol NO_2^- min^{-1}). Em alguns ensaios, em vez da monitorização contínua da oxidação do metilviologénio, optou-se por quantificar o nitrito formado ao fim de 2-5 min (método de Nicholas & Nason, descrito na secção 7.18).

7.16.2 Redutase do nitrito

A actividade de redutase do nitrito foi medida usando benzilviologénio, em vez de metilviologénio, como dador de electrões, uma vez que se verificou uma apreciável oxidação directa do metilviologénio pelo nitrito. Os ensaios foram realizados da forma descrita para a redutase do nitrato, substituindo apenas o nitrato por nitrito e o metilviologénio por benzilviologénio. A oxidação do benzilviologénio foi seguida pela diminuição da absorvância a 540 nm ao longo do tempo, usando-se um coeficiente de extinção molar (ε_{540}) de 13.1 $mM^{-1}cm^{-1}$ para o benzilviologénio reduzido (van Dijk *et al.*, 1979). Os valores de actividade vêm também expressos em Umg^{-1} proteína total, sendo 1 U=1 μmol NO min^{-1}.

Também se usou como dador de electrões azurina reduzida com ditionito, numa concentração final de 40 μM, em tampão fosfato 0.1 M pH 7.0 e 50 mM nitrito, monitorizando-se a oxidação da azurina a 625 nm (ε=3.86 $mM^{-1}cm^{-1}$).

7.16.3 Ensaios com inibidores

Os ensaios de inibição foram realizados da forma descrita acima, com adição de potenciais inibidores (azida, cianeto e o quelante de cobre dietilditiocarbamato, DDC), numa concentração final de 500 μM.

7.17 Quantificação do nitrato: método da fluorescência

O nitrato foi quantificado fluorimetricamente como descrito em Miguel & Brawn (1974). Esta determinação baseia-se no facto de a fluoresceína, um composto fluorescente, reagir com o nitrato, em ácido sulfúrico concentrado, produzindo um composto nitrado não fluorescente. A quantidade de nitrato na solução é directamente proporcional à supressão (quenching) da fluorescência na mesma. A reacção entre a fluoresceína e o anião nitrato é relativamente lenta, pelo que se deve deixar a reacção

ocorrer durante algum tempo (igual para padrões e amostras) antes de se efectuar as medições analíticas. A solução sulfúrica de fluoresceína exibe uma intensa banda de emissão com um máximo a 485 nm após excitação a 435 nm, sendo estes os comprimentos de onda de máxima sensibilidade do método.

Reagentes

- Solução padrão de nitrato de sódio 1×10^{-4} M: preparar uma solução-mãe de concentração 0.01M (850 mg de $NaNO_3$ em 1L de água destilada); diluir 100× antes de cada utilização.
- Solução sulfúrica de fluoresceína 5×10^{-7} M: preparar uma solução-mãe dissolvendo 28 mg de fluoresceína em 150 mL de água destilada (solução A); preparar, na altura de utilização, a solução sulfúrica de fluoresceína, diluindo a solução A em ácido sulfúrico concentrado (diluição 1:1 000).

Procedimento

1. *Preparação das amostras e curva-padrão:* preparar as amostras em triplicado (10, 20 e 50 μL), dois brancos e cinco amostras de $NaNO_3$ padrão (5, 10, 20, 30, 40 e 50 μL ⇒ 0.5 a 5 nmol $NaNO_3$) em tubos Eppendorf. Ajustar o volume até 50 μL com água destilada.
2. *Reacção*: Adicionar 950 μL de solução sulfúrica de fluoresceína e misturar bem. Incubar à temperatura ambiente durante pelo menos 45 min.
3. *Medição*: medir a emissão das soluções a 485 nm, com excitação ao comprimento de onda de 435 nm.

7.18 Quantificação do nitrito: método de Nicholas & Nason

Quantificou-se o nitrito pelo método de Nicholas & Nason (1957). Esta quantificação envolve a reacção em meio ácido de uma amina primária, por exemplo, a

sulfanilamida, com o nitrito, formando um sal diazónio (cf. Figura 7.2). Por fim, este sal é acoplado a uma amina aromática, produzindo um corante vermelho azo, cuja concentração pode ser determinada espectrofotometricamente a 540 nm.

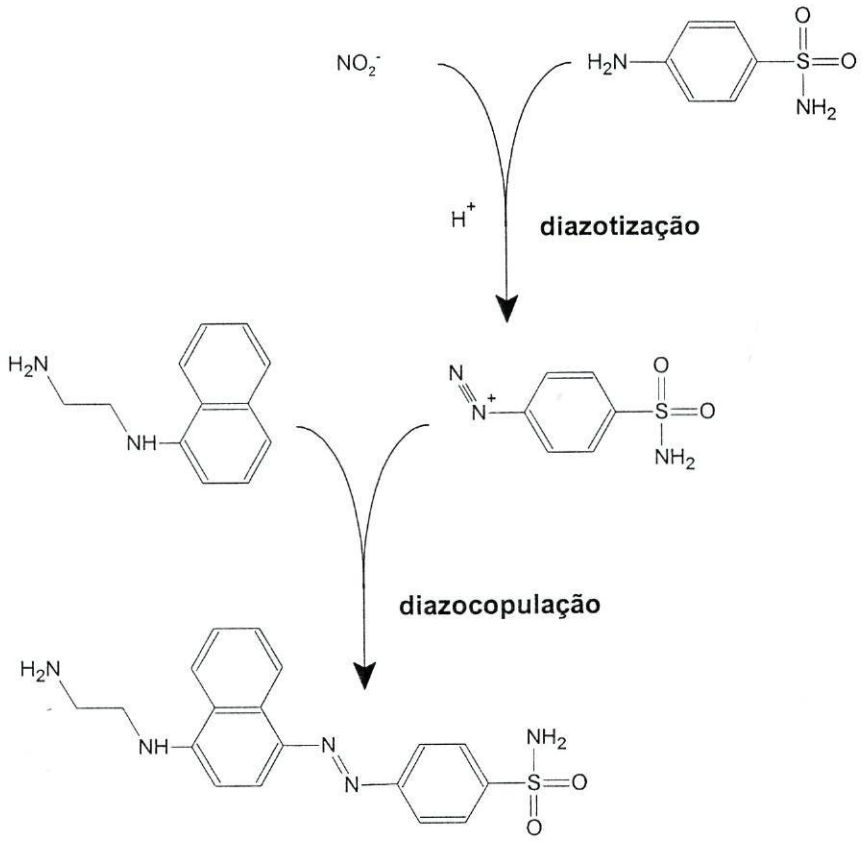


Figura 7.2 Determinação de nitrito pelo método de Nicholas & Nason.

Reagentes

ATENÇÃO: proteger as soluções de coloração da luz

- Sulfanilamida 1% (m/v) em solução ácida (25% HCl)
- N-(1-naftil)-etilenodiamina diidrocloreto (NEDA) 0.2% (m/v)
- Solução padrão de nitrito de sódio: prepara-se uma solução 1 mM $NaNO_2$, que depois se dilui de 1:4, obtendo-se uma solução final de concentração 0.25 mM. Adicionar 25 mg de NaOH a 100 mL da solução para evitar a libertação de óxidos

nitrosos instáveis devido ao CO_2 presente. Para prevenir o crescimento de microorganismos, pode também adicionar-se 1 mL de clorofórmio.

Procedimento

1. *Preparação das amostras e curva-padrão*: preparar as amostras em triplicado(20, 50 e 100 μL), dois brancos e cinco amostras de $NaNO_2$ padrão (20, 40, 60, 80 e 100 μL $\Rightarrow$ 5 a 25 nmol $NaNO_2$) em tubos Eppendorf. Ajustar o volume até 0.5 mL com água destilada.
2. *Reacção*: Adicionar sucessivamente 500 μL de sulfanilamida e 500 μL de NEDA, agitando bem após cada adição. Deixar a cor desenvolver à temperatura ambiente durante pelo menos 10 min.
3. *Medição*: medir a absorbância das soluções a 540 nm contra a água.

NOTA: no caso de se usar esta determinação após um ensaio enzimático, é conveniente adicionar, na preparação dos padrões, todos os reagentes ou tampões usados no referido ensaio, pois estes podem afectar os resultados.

7.19 Espectroscopia de Absorção Electrónica

Os espectros de absorção electrónica das proteínas foram medidos em células de quartzo, utilizando um espectrofotómetro Shimadzu UV-2101PC. Os ensaios enzimáticos com monitorização contínua foram efectuados num espectrofotómetro HP 8452A Diode-Array.

7.20 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica

A espectroscopia de RPE, banda-X, foi realizada num espectrómetro Bruker EMX equipado com uma cavidade dual (Modelo ER4116DM) e um criostato de fluxo

contínuo da Oxford Instruments. As condições instrumentais utilizadas em cada espectro obtido estão indicadas nas respectivas legendas.

Os espectros de RPE foram simulados usando o programa WIN-EPR SimFonia 1.2 (Bruker Instruments). O programa usa Teoria de Perturbações para simular espectros, assumindo 5 tipos de interacções, por ordem decrescente de importância: interacção electrónica de Zeeman, desdobramento de campo nulo, interacção nuclear hiperfina, interacção nuclear quadrupolar e interacção nuclear de Zeeman.

7.21 TITULAÇÕES POTENCIOMÉTRICAS

7.21.1 Descrição do sistema experimental

A titulação potenciométrica foi efectuada numa célula construída segundo os esquemas apresentados em Dutton (1978) e que possui entradas para dois eléctrodos e para um tubo adaptador que permite retirar amostras para posterior monitorização por RPE.

O potencial das soluções foi medido usando um eléctrodo de platina (Radiometer) e um eléctrodo de referência Ag/AgCl (Radiometer), calibrado com uma solução saturada de quinidrona, a pH 7.0 ($E_{quinidrona}$ = 287 mV *vs.* ENH).

A solução a titular continha 100 μM de proteína em tampão 75 mM Tris pH 7.6 e 2 μM de uma mistura de mediadores, num volume total de 2.4 mL. Os mediadores, apresentados na Tabela 7.10, foram escolhidos com base na gama de potenciais a titular.

Durante a titulação a célula foi mantida à temperatura de 24 °C e sob uma pressão positiva de árgon, para evitar a reoxidação devida à entrada de oxigénio. O árgon utilizado foi previamente humidificado por passagem por uma recipiente com água destilada, de modo a reduzir a evaporação da solução a titular. A agitação foi efectuada através de um agitador magnético.

Tabela 7.10 Valores de potencial de oxidação-redução a pH 7.0 para mediadores usados em titulações potenciométricas.

Mediador	E (mV)
Ferricianeto de potássio	430
N,N,N',N'-Tetrametilfenilenodiamina (TMPD)	260
2,6-Diclorofenolindofenol (DCPIP)	217
1,2-Naftoquinona	118
1,4-Naftoquinona	60
5-Hidroxi-1,4-naftoquinona	30
Duroquinona	5
Indigo tetrassulfonato	-46
Indigo carmim	-111
Fenazina	-125
2-Hidroxi-1,4-naftoquinona	-145
Antraquinona-2-sulfonato	-225
Fenossafranina	-275
Safranina O	-280
Vermelho neutro	-325
Metilviologénio	-436
Triquat	-550

Procedeu-se à redução da NiR, primeiro com ascorbato e depois com ditionito, tendo-se, de seguida, efectuado a sua reoxidação com ferricianeto. A titulação foi feita por adição de alíquotas de titulante (≈20 mM). Em cada adição, após a estabilização do valor de potencial medido, retirou-se uma amostra para um tubo de RPE (175 μL), que foi imediatamente congelado em azoto líquido.

As amostras foram medidas nas seguintes condições: modulação da frequência, 100 kHz, amplitude de modulação, 1.0 mT, potência das microondas, 0.63 mW, frequência das microondas, 9.49 GHz e temperatura, 20 K.

7.21.2 Análise dos resultados

Para efectuar a desconvolução dos sinais usou-se o espectro de uma espécie parcialmente reduzida (centro de cobre tipo 1 na forma reduzida, centro de cobre tipo 2 na forma oxidada — $T1Cu^{+}$, $T2Cu^{2+}$), no qual apenas o sinal correspondente ao T2Cu fosse visível. Esse espectro (ou um seu múltiplo) foi subtraído a cada espectro experimental, a fim de separar os seus componentes, que foram então duplamente integrados, de modo a obter a respectiva área.

Os valores de E_m para cada um dos centros paramagnéticos foram obtidos por ajuste da equação de Nernst à curva de titulação correspondente (cf. Apêndice 2). Estes ajustes foram efectuados com o programa Microcal Origin 5.0 (Microcal Software).

7.22 Electroquímica de proteínas

7.22.1 Descrição dos sistemas experimentais

Todas as experiências electroquímicas, excepto as realizadas com membranas de *Ps. chlororaphis* DSM 50135, foram realizadas numa célula construída em *nylon*, concebida para pequenas quantidades de proteína e constituída pelos compartimentos de referência e medição (Figura 7.3). O primeiro, contendo o eléctrodo de referência [Ag/AgCl (3 M KCl), Bioanalytical Systems] e a solução de electrólito suporte, está ligado ao compartimento de trabalho por uma ponte de Vycor. Neste segundo compartimento é colocada a solução de proteína (70 a 100 μL) e os eléctrodos de trabalho (eléctrodo de ouro, Bioanalytical Systems) e auxiliar (fio de platina, acoplado ao sistema de desarejamento).

O eléctrodo de trabalho foi polido com alumina 0.3 μm (Buehler) durante ≈15 min e depois lavado em etanol e água Millipore. Procedeu-se em seguida à sua sonicação (5 min) e nova lavagem com água. Nas experiências com as azurinas modificou-se previamente o eléctrodo de trabalho, mergulhando-o depois de polir numa solução 1 mM de 4,4'-ditiodipiridina, durante 4 min, e removendo o excesso do modificador por lavagem extensa com água Millipore.

Por calibração com o sistema ferricianeto/ferrocianeto (E_m=430 mV *vs* ENH e D_0=7.4×10^{-6} cm^{2}s^{-1}) determinou-se um potencial de 205 mV *vs* ENH para o eléctrodo de referência e uma área efectiva de 0.018 cm^2, para o eléctrodo de trabalho, após modificação.

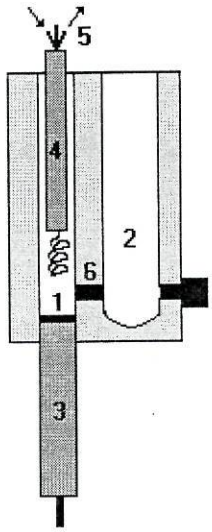


Figura 7.3 Representação esquemática de uma célula electroquímica utilizada. (1) compartimento de medição; (2) compartimento de referência; (3) eléctrodo de trabalho; (4) eléctrodo auxiliar; (5) sistema de desarejamento; (6) ponte de Vycor.

As experiências de voltametria foram realizadas com um sistema Autolab 10, (Eco Chemie), controlado por software GPES 4.0 (Eco Chemie).

Antes de cada medição, a célula e a amostra foram desarejadas com um fluxo de árgon. No decorrer das medições manteve-se um fluxo de árgon humidificado na célula

electroquímica, com o cuidado de não borbulhar para não provocar movimentos convectivos na solução.

As experiências electroquímicas realizadas com membranas de *Ps. chlororaphis* DSM 50135 foram efectuadas numa célula desmontável, com um eléctrodo de disco invertido (Hagen, 1989), o qual permite um pré-tratamento mais completo e reprodutível, por imersão em ácido nítrico concentrado. Antes da primeira utilização, mergulhou-se o eléctrodo (um disco de carbono vítreo de 15 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, do tipo V25, Le Carbon Loraine, Rotterdam, NL) durante 1 h em HNO_3 65%, a 60 °C. Imediatamente antes de cada medição, o eléctrodo foi imerso durante alguns minutos em HNO_3 65%, à temperatura ambiente, lavado extensamente com água desionisada, agitado durante 1 min numa solução de K_2HPO_4 1M, voltado a lavar extensamente com água, brevemente polido com Metadi Diamond 6 μm (Buehler), novamente lavado com água e seco. No centro do eléctrodo de trabalho foi colocada a gota da amostra (≈40 μL), colocando-se depois o contra-eléctrodo (fio de platina) e a ponta porosa do eléctrodo de referência (eléctrodo Ag/AgCl Radiometer Ref. 201) em contacto com a gota.

O sistema foi desarejado com árgon humidificado e ligado a um potenciostato Autolab 20 (Eco Chemie), controlado por software GPES 4.0 (Eco Chemie).

As experiências de voltametria cíclica e de onda quadrada das azurinas em eléctrodo de ouro modificado foram realizadas à temperatura ambiente, em presença de 4,4'-ditiodipiridina 0.1 mM, tampão e electrólito suporte, conforme indicado nas legendas das figuras.

O estudo da transferência electrónica entre um mediador e uma enzima foi realizado por voltametria cíclica, em presença de substrato, conforme indicado nas legendas das figuras.

7.22.2 Electroquímica de sistemas catalíticos: análise dos resultados

As velocidades de transferência electrónica homogénea entre enzimas redox e mediadores (corantes artificiais ou pequenas proteínas redox capazes de transferir electrões entre o eléctrodo e a enzima em estudo) podem ser medidas por voltametria cíclica (Hoogvliet *et al.*, 1988). Para este fim, comparam-se os voltamogramas do mediador em presença e ausência de enzima e substrato. Em presença de substrato, a adição da enzima à solução do mediador resulta na intensificação da corrente catódica ou anódica, uma vez que a reacção enzimática regenera o mediador, permitindo que este volte a interagir com o eléctrodo.

A sequência das reacções ocorridas com um sistema mediador/redutase está esquematicamente representada na Figura 7.4. O seu estudo é feito do modo descrito a seguir.

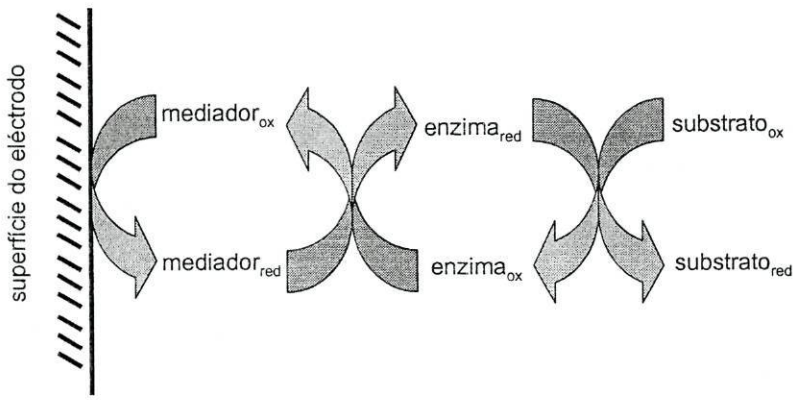


Figura 7.4 Sequência das reacções ocorridas no processo de transferência electrónica homogénea entre um mediador electroquímico e uma redutase, em presença de substrato.

Obtiveram-se voltamogramas cíclicos de soluções de mediador, na ausência de enzima, a diversas velocidades de varrimento. A partir destes voltamogramas, determinou-se a intensidade do pico de corrente catódica, i_{pc}, a cada uma das velocidades. Repetiu-se a mesma série de medições, após a adição de enzima, para determinar a intensidade de corrente de pico ou "plateau" catalítico, i_{cat}, a cada concentração de enzima. A título de exemplo, mostra-se na Figura 7.5 o efeito da adição

de NaR à solução de menadiona, em presença de nitrato (sistema menadiona/membranas). Na referida figura é também exemplificado o modo de determinar a eficiência catalítica, i_{cat}/i_{pc}, de um sistema.

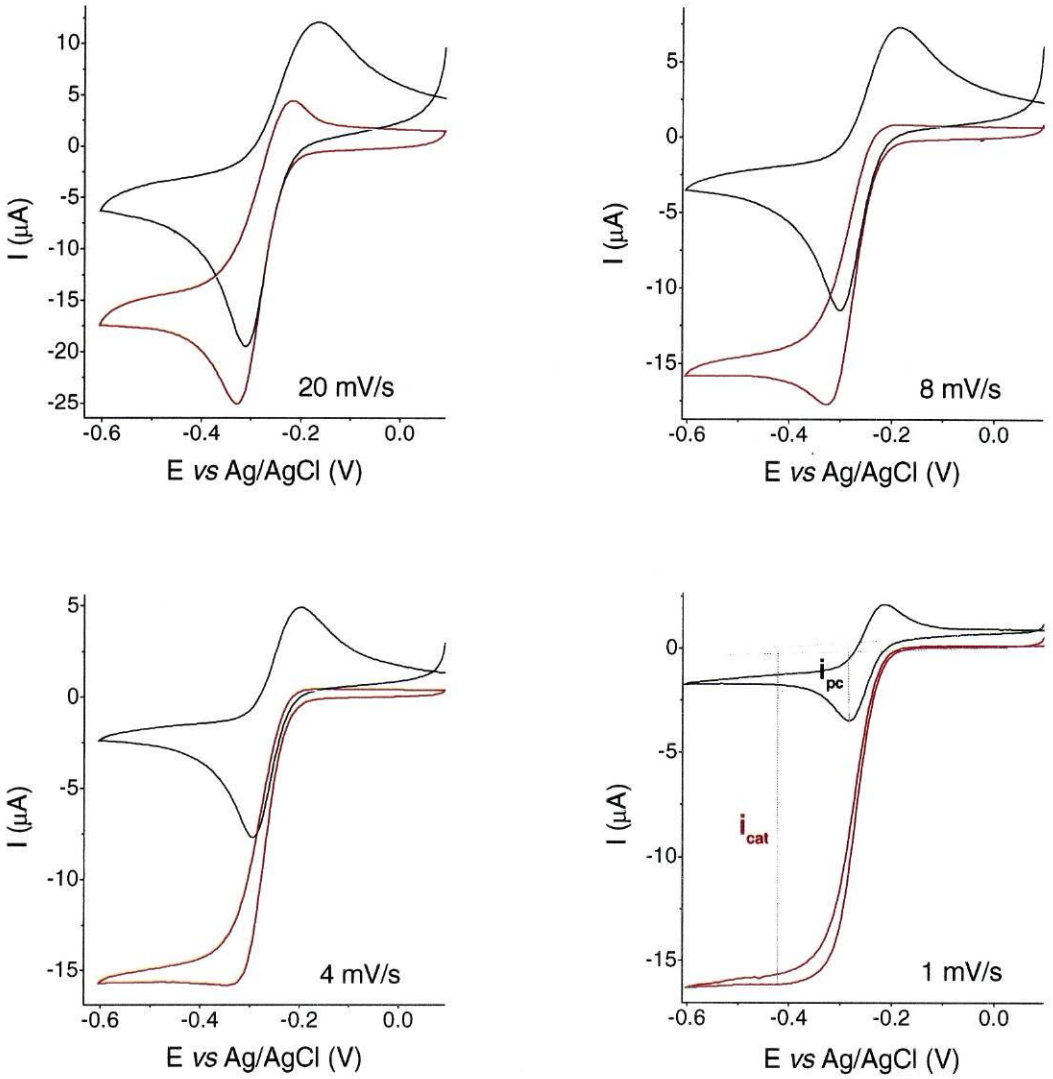


Figura 7.5 Voltamogramas cíclicos do sistema menadiona/membranas de *Ps. chlororaphis* DSM 50135. Determinação da eficiência catalítica, i_{cat}/i_{pc}, do sistema. (—) sem catálise; (—) com catálise.

No cálculo das constantes de velocidade de segunda ordem utilizou-se o modelo de Nicholson & Shain (1964), conforme esquematizado na Figura 7.6.

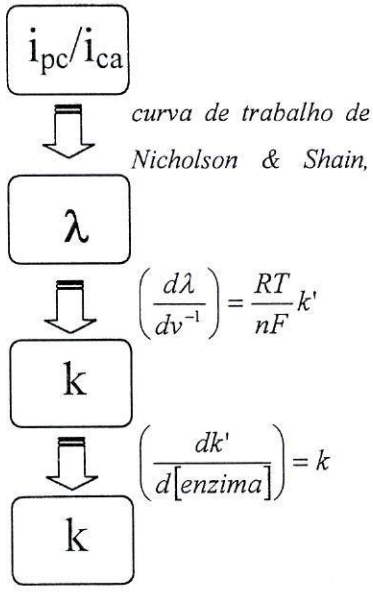


Figura 7.6 Esquema do algoritmo utilizado para a obtenção dos parâmetros de transferência electrónica a partir das eficiências catalíticas.

1. A partir das eficiências catalíticas obtiveram-se os parâmetros λ, por interpolação dos valores apresentados por Nicholson & Shain (cf. Apêndice 1). De um modo geral, o tratamento dos resultados foi feito supondo completa reversibilidade electroquímica do sistema. Porém, em sistemas que revelaram um desvio apreciável da reversibilidade, procedeu-se também ao cálculo de λ supondo o sistema totalmente irreversível.
2. A constante de velocidade de 2ª ordem, *k*, da transferência electrónica entre o mediador e a enzima pode ser calculada a partir do declive da representação gráfica de λ em função do inverso da velocidade de varrimento, ν:

$$\lambda = k' \, (RT/nF) \times 1/\nu \qquad\qquad k' = k \, [\text{enzima}]$$

3. Assim, para cada concentração de enzima utilizada, calculou-se o declive da recta obtida, *k'*. Fez-se então a representação gráfica dos declives determinados contra as concentrações de enzima utilizadas. A partir do declive desta recta (incluindo a origem), obteve-se o valor da constante de velocidade de segunda ordem.

8

BIBLIOGRAFIA

AASA, R. & VÄNNGÅRD, T. (1975) EPR signal intensity and powder shapes: a reexamination. *J. Magn. Res.* **19:** 308-315.

ABRAHAM, Z. H., LOWE, D. J. & SMITH, B. E. (1993) Purification and characterization of the dissimilatory nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (N.C.I.M.B. 11015): evidence for the presence of both type 1 and type 2 copper centres. *Biochem. J.* **295:** 587-593.

ADEWOYE, L. O., TSCHETTER, L., O'NEIL, J. & WOROBEC, E. A. (1998) Channel specificity and secondary structure of the glucose-inducible porins of *Pseudomonas* spp. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30:** 257-267

ADMAN, E. T. (1991) Copper protein structures. *Adv. Protein Chem.* **42:** 145-197

ADMAN, E. T., CANTERS, G. W., HILL, H. A. & KITCHEN, N. A. (1982) The effect of pH and temperature on the structure of the active site of azurin from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **143:** 287-292.

ADMAN, E. T., GODDEN, J. W. & TURLEY, S. (1995) The structure of copper-nitrite reductase from Achromobacter cycloclastes at five pH values, with NO_2^- bound and with type II copper depleted. *J. Biol. Chem.* **270:** 27458-27474.

AIDA, T., HATA, S. & KUSUNOKI, H. (1986) Temporary low oxygen conditions for the formation of nitrate reductase and nitrous oxide reductase by denitrifying *Pseudomonas* sp. G59. *Can.. J. Microbiol.* **32:** 543-547

AINSCOUGH, E. W., BINGHAM, A. G., BRODIE, A. M., ELLIS, W. R., GRAY, H. B., LOEHR, T. M., PLOWMAN, J. E., NORRIS, G. E. & BAKER, E. N. (1987) Spectrochemical studies on the blue copper protein azurin from *Alcaligenes denitrificans*. *Biochemistry* **26:** 71-82

ANDREW, C. R., HAN, J., DEN BLAAUWEN, T., VAN POUDEROYEN, G.,VIJGENBOOM, E., CANTERS, G. W., LOEHR, T. M. & SANDERS-LOEHR, J. (1997) Cysteine ligand vibrations are responsible for the complex resonance Raman spectrum of azurin. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2:** 98-107

ANTHOLINE, W. E., HANNA, P. M. & MCMILLIN, D. R. (1993) Low frequency EPR of *Pseudomonas aeruginosa* azurin. Analysis of ligand superhyperfine structure from a type 1 copper site. *Biophys. J.* **64:** 267-272.

ARCIERO, D. M., GOLOMBEK, A., HENDRICH, M. P. & HOOPER, A. B. (1998) Correlation of optical and EPR signals with the P460 heme of hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea*. *Biochemistry* **37:** 523-529.

ARENDSEN, A. F., HADDEN, J., CARD, G., MCALPINE, A. S., BAILEY, S., ZAITSEV, V., DUKE, E. H. M., LINDLEY, P. F., KRÖCKEL, M., TRAUTWEIN, A. X., FEITERS, M. C., CHARNOCK, J. M., GARNER, C. D., MARRIT, S. J., THOMSON, A. J., KOOTER, I. M., JOHNSON, M. K., VAN DEN BERG, W. A. M., VAN DONGEN, W. M. A. M. & HAGEN, W. R. (1998) The "prismane" protein resolved: X-ray structure at 1.7 Å and multiple spectroscopy of two novel 4Fe custers. *J. Biol. Inorg. Chem.* **3:** 81-95

AUGIER, V., ASSO, M., GUIGLIARELLI, B., MORE, C., BERTRAND, P., SANTINI, C. L., BLASCO, F., CHIPPAUX, M. & GIORDANO, G. (1993) Removal of the high-potential [4Fe-4S] center of the β-subunit from *Escherichia coli* nitrate reductase. Physiological, biochemical, and EPR characterization of site-directed mutated enzymes. *Biochemistry* **32:** 5099-5108.

AVERILL, B.A. (1996) Dissimilatory Nitrite and Nitric Oxide Reductases. *Chem. Rev.* **96:** 2951-2964

BAKER, E. N. (1988) Structure of azurin from *Alcaligenes denitrificans* refinement at 1.8 Å resolution and comparison of the two crystallographically independent molecules. *J. Mol. Biol.* **203:** 1071-1095.

BEACHAM, I. R. (1979) Periplasmic enzymes in Gram-negative bacteria. *Int. J. Biochem.* **10:** 877-883.

BELL, L. C., RICHARDSON, D. J. & FERGUSON, S. J. (1990) Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductases in *Thiosphaera pantotropha*. The periplasmic enzyme catalyzes the first step in aerobic denitrification. *FEBS Lett.* **265:** 85-87.

BENNETT, B., BERKS, B. C., FERGUSON, S. J., THOMSON, A. J., & RICHARDSON, D. J. (1994) Mo(V) electron paramagnetic resonance signals from the periplasmic nitrate reductase of *Thiosphaera pantotropha*. *Eur. J. Biochem.* **226:** 789-798.

BENSADOUN, A. & WEINSTEIN, D. (1976) Assays of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* **70:** 241-250.

BERKS, B. C., FERGUSON, S. J., MOIR, J. W. & RICHARDSON, D. J. (1995). Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim. Biophys. Acta* **1232:** 97-173.

BERRY, E. A. & TRUMPOWER, B. L. (1987) Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectrum. *Anal. Biochem.* **161:** 1-15.

BLÜMLE, S. & ZUMFT, W. G. (1991) Respiratory nitrate reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*, purification, properties and target of proteolysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1057:** 102-108

BOULANGER, M. J., KUKIMOTO, M., NISHIYAMA, M., HORINOUCHI, S. & MURPHY, M. E. P. (2000) Catalytic roles for two water bridged residues (Asp-98 and His-255) in the active site of copper-containing nitrite reductase. *J. Biol. Chem.* **275:** 23957-23964.

BRETON, J., BERKS, B. C., REILLY, A., THOMSON, A. J., FERGUSON, S. J. & RICHARDSON, D. J. (1994) Characterization of the paramagnetic iron-containing redox centres of *Thiosphaera pantotropha* periplasmic nitrate reductase. *FEBS Lett.* **345:** 76-80.

BRITO, F., DEMOSS, J. A. & DUBOURDIEU, M. (1995) Isolation and identification of menaquinone-9 from purified nitrate reductase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177:** 3728-3735.

BROCK, T.D. & MADIGAN, M.T. (1991) Biology of microorganisms. 6th edition, Prentice-Hall International Editions. Londres

BROWN, K., DJINOVIC-CARUGO, K., HALTIAI, T., CABRITO, I., SARASTE, M., MOURA, J. J. G., MOURA, I., TEGONI, M. & CAMBILLAU, C. (2000) Revisiting the catalytic CuZ cluster of nitrous oxide (N_2O) reductase. Evidence of a bridging inorganic sulfur. *J. Biol. Chem.* **275:** 41133-41136.

BURGESS, B. K. & LOWE, D. J. (1996) Mechanism of molybdenum nitrogenase. *Chem. Rev.* **96:** 2983-3011.

BUSSE, H. -J., EL-BANNA, T. & AULING, G. (1989) Evaluation of different approaches for identification of xenobiotic-degrading pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **55:** 1578-1583

BUTLER, C. S., CHARNOCK, J. M., BENNETT, B., SEARS, H. J., REILLY, A. J., FERGUSON, S. J., GARNER, C. D., LOWE, D. J., THOMSON, A. J., BERKS, B. C. & RICHARDSON, D. J. (1999) Models for molybdenum coordination during the catalytic cycle of periplasmic nitrate reductase from *Paracoccus denitrificans* derived from EPR and EXAFS spectroscopy. *Biochemistry* **38:** 9000-9012.

CALMELS, S., OHSHIMA, H., HENRY, Y. & BARTSCH, H. (1996) Characterization of bacterial cytochrome *cd*(1)-nitrite reductase as one enzyme responsible for catalysis of nitrosation of secondary amines. *Carcinogenesis* **17:** 533-536

CANTERS, G. W., HILL, H. A. O., KITCHEN, N. A. & ADMAN, E. T. (1984) The assignment of the ^1H nuclear magnetic resonance spectrum of azurin. An investigation of the ^1H NMR spectrum of the blue copper protein, azurin, from *Pseudomonas aeruginosa*, with reference to the previously determined crystal structure. *Eur. J. Biochem.* **138:** 141-152.

CARLSON, C. A., FERGUSON, L. P. & INGRAHAM, J. L. (1982) Properties of dissimilatory nitrate reductase purified from the denitrifier *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **151:** 162-171

CASTRESANA, J. & SARASTE, M. (1995). Evolution of energetic metabolism: the respiration-early hypothesis. *Trends Biochem. Sci.* **20:** 443-448.

CHEUNG, K. C., STRANGE, R. W. & HASNAIN, S. S. (2000) 3D EXAFS refinement of the Cu site of azurin sheds light on the nature of structural change at the metal centre in an oxidation-reduction process: an integrated approach combining EXAFS and crystallography. *Acta Crystallogr. D* **56:** 697-704.

CLARK, W. M. (1960) The oxidation-reduction potentials of organic systems, Williams & Wilkins, Baltimore.

COREMANS, J. W. A., POLUEKTOV, O. G., GROENEN, E. J. J., CANTERS, G. W., NAR, H. & MESSERSCHIMDT, A. (1987) A W-band electron spin echo envelope modulation study of a single crystal of azurin. *J. Am. Chem. Soc.* **119:** 4726-4731.

COYNE, M. S., ARUNAKUMARI, A., AVERILL, B. A. & TIEDJE, J. M. (1989) Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd_1 and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55:** 2924-2931.

CRUTZEN, P. J. (1970) The influence of nitrogen oxides on the atmospheric ozone content. *Quart. J. Roy. Meteor. Soc.* **96:** 320-325.

CUTRUZZOLÀ, F. (1999) Bacterial nitric oxide synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1411:** 231-249

CZJZEK, M., DOS SANTOS, J. P., POMMIER, J., GIORDANO, G., MEJEAN, V. & HASER, R. (1998). Crystal structure of oxidized trimethylamine N-oxide reductase from *Shewanella massilia* at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **284:** 435-447.

DE KERPEL, J. O. A., PIERLOOT, K., RYDE, U. & ROOS, B. O. (1998) Theoretical study of the structural and spectroscopic properties of stellacyanin. *J. Phys. Chem. B* **102:** 4638-4647.

DELIGEER, KATAOKA, K., YAMAGUCHI, K. & SUZUKI, S. (2000) Spectroscopic and electrochemical properties of cytochrome c_{551} from *Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051. *Bull. Chem Soc. Jpn.* **73:** 1839-1840

DENARIAZ, G., PAYNE, W. J. & LEGALL, J. (1991) The denitrifying nitrite reductase of *Bacillus halodenitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta* **1056:** 225-232

DICKINSON, R. E. & CICERONE, R. J. (1986) Future global warming from atmospheric trace gases. *Nature* **319:** 109-115

DODD, F. E., HASNAIN, S. S., HUNTER, W. N., ABRAHAM, Z. H. L., DEBENHAM, M., KANZLER, H., ELDRIDGE, M., EADY, R. R., AMBLER, R. P. & SMITH, B. E. (1995) Evidence for two distinct azurins in *Alcaligenes xylosoxidans* (NCIMB 11015): potential electron donors to nitrite reductase. *Biochemistry* **34:** 10180-10186.

DODD, F. E., HASNAIN, S. S., ABRAHAM, Z. H. L., EADY, R. R. & SMITH, B. E. (1997) Structure of a blue-copper nitrite reductase and its substrate-bound complex. *Acta Crystallogr. D* **53:** 406-418

DODD, F. E., VAN BEEUMEN, J., EADY, R. R. & HASNAIN, S. S. (1998) X-ray structure of a blue-copper nitrite reductase in two crystal forms. The nature of the copper sites, mode of substrate binding and recognition by redox partner. *J. Mol. Biol.* **282:** 369-382.

DOLFING, J. (1990). Reductive dechlorination of 3-chlorobenzoate is coupled to ATP production and growth in an anaerobic bacterium, strain DCB-1. *Arch. Microbiol.* **153:** 264-266.

DUTTON, P. L. (1978) Redox potentiometry: determination of midpoint potentials of oxidation-reduction components of biological electron-transfer systems. *Methods Enzymol.* **54:** 411-435

EADY, R. R. (1996) Structure–function relationships of alternative nitrogenases. *Chem. Rev.* **96:** 3013-3030.

FALK, J. E. (1964) Porphyrins and metalloporphyrins. Their general physical and coordination chemistry and laboratory. Elsevier, Nova Iorque, 240-248.

FARVER, O., EADY, R. R., ABRAHAM, Z. H. & PECHT, I. (1998) The intramolecular electron transfer between copper sites of nitrite reductase: a comparison with ascorbate oxidase. *FEBS Lett.* **436:** 239-242.

FERGUSON, S. J. (1998) Nitrogen cycle enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2:** 182-193.

FINAZZI-AGRÒ, A., ROTILIO, G., AVIGLIANO, L., GUERRIERI, P., BOFFI, V. & MONDOVÌ, B. (1970) Environment of copper in *Pseudomonas fluorescens* azurin: fluorometric approach. *Biochemistry* **9:** 2009-2014.

FRUNZKE, K., HEISS, B., MEYER, O. & ZUMFT, W. G. (1993) Molybdopterin guanine dinucleotide (MGD) is the organic moiety of the molybdenum cofactor in respiratory nitrate reductase from *Pseudomonas stutzeri. FEMS Microbiol. Lett.* **113:** 241-246.

FUHRHOP, J. H. & SMITH, K. M. (1975) Laboratory methods. In: Porphyrin and metalloporphyrin Smith, K.M. (Ed.) Elsevier, Amsterdão, 757-861.

GEORGE, G. N., BRAY, R. C., MORPETH, F. F. & BOXER, D. H. (1985) Complexes with halide and other anions of the molybdenum centre of nitrate reductase from *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **227:** 925-931.

GODDEN, J. W., TURLEY, S., TELLER, D. C., ADMAN, E. T. LIU, M. Y., PAYNE, W. J. & LEGALL, J. (1991) The 2.3 angstrom X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Science* **253:** 438-442

GOODHEW, C. F., BROWN, K. R. & PETTIGREW, G. W. (1986) Haem staining in gels, a useful tool in the study of bacterial c-type cytochromes. *Biochim. Biophys. Acta* **852:** 288-294

GREENBERG, E. P. & BECKER, G. E. (1977) Nitrous oxide as end product of denitrification by strains of fluorescent pseudomonads. *Can. J. Microbiol.* **23:** 903-907

GREMER, L. & MEYER., O. (1996) Characterization of xanthine dehydrogenase from the anaerobic bacterium *Veillonella atypica* and identification of a molybdopterin-cytosine-dinucleotide-containing molybdenum cofactor. *Eur. J. Biochem.* **238:** 862-866

GROENEVELD, C. M., FEITERS, M. C., HASNAIN, S. S., VAN RIJN, J., REEDIJK, J. & CANTERS, G. W. (1986) The pH and redox-state dependence of the copper site in azurin from *Pseudomonas aeruginosa* as studied by EXAFS. *Biochim. Biophys. Acta* **873:** 214-227.

GROENEVELD, C. M., AASA, R., REINHAMMAR, B. & CANTERS, G. W. (1987) EPR of azurins from *Pseudomonas aeruginosa* and *Alcaligenes denitrificans* demonstrates pH-dependence of the copper-site geometry in *Pseudomonas aeruginosa* protein. *J. Inorg. Biochem.* **31:** 143-154.

GROENEVELD, C. M. & CANTERS, G. W. (1988) NMR study of structure and electron transfer mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* azurin. *J. Biol. Chem.* **263:** 167-173.

GROENEVELD, C. M., OUWERLING, M. C., ERKELENS, C. & CANTERS, G. W. (1988) ^{1}H nuclear magnetic resonance study of the protonation behaviour of the histidine residues and the electron self-exchange reaction of azurin from *Alcaligenes denitrificans*. *J. Mol. Biol.* **200:** 189-199.

GUIGLIARELLI, B., ASSO, M., MORE, C., AUGIER, V., BLASCO, F., POMMIER, J., GIORDANO, G. & BERTRAND, P. (1992) EPR and redox characterization of iron-sulfur centers in nitrate reductases A and Z from *Escherichia coli*. Evidence for a high-potential and a low-potential class and their relevance in the electron-transfer mechanism. *Eur. J. Biochem.* **207:** 61-68.

GUIGLIARELLI, B., MAGALON, A., ASSO, M., BERTRAND, P., FRIXON, C., GIORDANO, G. & BLASCO F. (1996) Complete coordination of the four Fe-S centers of the β subunit from *Escherichia coli* nitrate

reductase. Physiological, biochemical, and EPR characterization of site-directed mutants lacking the highest or lowest potential [4Fe-4S] clusters. *Biochemistry* **35:** 4828-4836.

GUSS, J. M., HARROWELL, P. R., MURATA, M., NORRIS, V. A. AND FREEMAN, H. C. (1986) Crystal structure analyses of reduced poplar plastocyanin at six pH values. *J. Mol. Biol.* **192:** 361-387.

HACKET, N. R. & BRAGG, P. D. (1982) The association of two distinct *b* cytochromes with respiratory nitrate reductase of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **13:** 213–217.

HAGEN, W. R. (1989) Direct electron transfer of redox proteins at the bare glassy carbon electrode. *Eur. J. Biochem.* **182:** 523-530

HAGEN, W. R. (1992) EPR spectroscopy of iron-sulfur proteins. *Adv. Inorg. Chem.* **38:** 165-222.

HALL, J., ZHA, X. H., YU, L., YU, C. A. & MILLETT, F. (1987) The binding domain on horse cytochrome *c* and *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome c_2 for the *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome bc_1 complex. *Biochemistry* **26:** 4501-4504

HAMILTON, W. A. (1998). Bioenergetics of sulphate-reducing bacteria in relation to their environmental impact. *Biodegradation* **9:** 201-212.

HANN, E. C., EISENBERG, A., FAGER, S. K., PERKINS, N. E., GALLAGHER, F. G., COOPER, S. M., GAVAGAN, J. E. STIEGLITZ, B., HENNESSEY, S. M. & DI COSIMO, R. (1999) 5-Cyanovaleramide production using immobilized *Pseudomonas chlororaphis* B23. *Bioorg. Med. Chem.* **7:** 2239-2245

HAUCK, R.D. (ed.) (1984) Nitrogen in Crop Production, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.

HAYNES, W. C., STODOLA, T. H., LOCKE, J. M., PRIDHAM, T. G., CONWAY, H. F., SOHUS, V. E. & JACKSON, R. W. (1956) *Pseudomonas aureofaciens* Kluyver and phenazine alpha-carboxylic acid, its characteristic pigment. *J. Bacteriol.* **72:** 412-417

HEISS, B., FRUNZKE, K., & ZUMFT, W. G. (1989). Formation of the N-N bond from nitric oxide by a membrane-bound cytochrome *bc* complex of nitrate-respiring (denitrifying) *Pseudomonas stutzeri*. *J. Bacteriol.* **171:** 3288–3297.

HENDRIKS, J., WARNE, A., GOHLKE, U., HALTIA, T., LUDOVICI, C., LUBBEN, M. & SARASTE M. (1998) The active site of the bacterial nitric oxide reductase is a dinuclear iron center. *Biochemistry* **37:** 13102-13109.

HILL, H. A. O. & WALTON, N. J. (1982) Investigation of some intermolecular electron transfer reactions of cytochrome *c* by electrochemical methods. *J. Am. Chem. Soc.* **104:** 6515-6519.

HILL, K. E. & WHARTON, D. C. (1978) Reconstitution of the apoenzyme of cytochrome oxidase from *Pseudomonas aeruginosa* with heme d_1 and other heme groups. *J. Biol. Chem.* **253:** 489-495

HOCHSTEIN, L. I. & LANG, F. (1991) Purification and properties of a dissimilatory nitrate reductase from *Haloferax denitrificans*. *Arch. Biochem. Biophys.* **288:** 380-385

HOOGVLIET, J. C., LIEVENSE, L. C., VAN DIJK, C. & VEEGER, C. (1988) Electron transfer between the hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) and viologens. 1. Investigations by cyclic voltammetry. *Eur. J. Biochem.* **174:** 273-280

HOWARD, J. B. & REES, D.C. (1996) Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chem. Rev.* **96:** 2965-2982.

HOWES, B. D., ABRAHAM, Z. H. L., LOWE, D. J., BRUSER, T., EADY, R. R. & SMITH, B. E. (1994) EPR and Electron Nuclear Double Resonance (ENDOR) studies show nitrite binding to the type 2 copper centers of the dissimilatory nitrite reductase of *Alcaligenes xylosoxidans* (NCIMB 11015) *Biochemistry* **33:** 3171-3177

HUBER, R. (1989) A structural basis of light energy and electron-transfer in biology (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **28:** 848-869.

HUCKLESBY, D. P. & HAZEMAN, R. H. (1973) Staining method for nitrite reductase on polyacrylamide gels after electrophoresis. *Anal. Biochem.* **56:** 591-592

IGARASHI, N., MORIYAMA, H., FUJIWARA, T., FUKUMORI, Y. & TANAKA, N. (1997) The 2.8 Å structure of hydroxylamine oxidoreductase from a nitrifying chemoautotrophic bacterium, *Nitrosomonas europaea*. *Nat. Struct. Biol.* **4:** 276-284.

INOUE, T., GOTOWDA, M., DELIGEER, KATAOKA, K.,YAMAGUCHI, K., SUZUKI, S., WATANABE, H., GOHOW, M. & KAI, Y. (1998) Type 1 Cu structure of blue nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051 at 2.05 angstrom resolution: comparison of blue and green nitrite reductases. *J. Biochem.* **124:** 876-879

IWASAKI, H., NOJI, S. & SHIDARA, S. (1975) *Achromobacter cycloclastes* Nitrite reductase. The function of copper, amino acid composition, and ESR spectra. *J. Biochem.* **78:** 355-361

IWASAKI, Y., TAKEUCHI, T., TAMIYA, E., KARUBE, I., NISHIYAMA, M., HORINOUCHI, S., BEPPU, T., KADOI, H., UCHIYAMA, S., SUZUKI, S. & SUZUKI, M. (1992) Electrocatalysis of nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis* strain 6 mediated by native redox partner. *Electroanal.* **4:** 771-776

JOHNSON, M. K., THOMSON, A. J., WALSH, T. A., BARBER, D. & GREENWOOD, C. (1980) Electron paramagnetic resonance studies on *Pseudomonas* nitrosyl nitrite reductase. Evidence for multiple species in the electron paramagnetic resonance spectra of nitrosyl haemoproteins. *Biochem. J.* **189:** 285-294.

JOHNSON, J. L.,BASTIAN, N. R. & RAJAGOPALAN, K. V. (1990). Molybdopterin guanine dinucleotide: a modified form of molybdopterin identified in the molybdenum cofactor of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides* forma specialis *denitrificans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87:** 3190–3194.

JONES, R. W. & GARLAND, P. B. (1977) Sites and specificity of the reaction of bipyridylium compounds with anaerobic respiratory enzymes of *Escherichia coli*. Effects of permeability barriers imposed by the cytoplasmic membrane. *Biochem. J.* **164:** 199-211

KALVERDA, A. P., UBBINK, M., GILARDI, G., WIJMENGA, S. S., CRAWFORD, A., JEUKEN, L. J. C. & CANTERS, G. W. (1999) Backbone dynamics of azurin in solution: the slow conformational change associated with deprotonation of histidine 35. *Biochemistry* **38:** 12690-12697.

KETCHUM, P. A., DENARIAZ, G., LEGALL, J. & PAYNE, W. J. (1991) Menaquinol-nitrate oxidoreductase of *Bacillus halodenitrificans*. *J. Bacteriol.* **173:** 2498-2505

KLUYVER, A. J. (1956) *Pseudomonas aureofaciens* nov. spec. and its pigments. *J. Bacteriol.* **72:** 406-411

KLUYVER, A. J. & DONKER, H. J. L. (1926). Die Einheit der Biochemie. *Chem. Zelle Gewebe* **13:** 134-190.

KOBAYASHI, K., TAGAWA, S., DELIGEER & SUZUKI, S. (1999) The pH-dependent changes of intramolecular electron transfer on copper-containing nitrite reductase. *J. Biochem.* **126:** 408-412.

KOBAYASHI, M. & SHOUN, H. (1995) The copper-containing dissimilatory nitrite reductase involved in the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*. *J. Biol. Chem.* **270:** 4146-4151

KOBAYASHI, M., MATSUO, Y., TAKIMOTO, A., SUZUKI, S., MARUO, F. & SHOUN, H. (1996) Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. *J. Biol. Chem.* **271:** 16263-16267.

KOHZUMA, T., TAKASE, S., SHIDARA, S., & SUZUKI, S. (1993) Electrochemical properties of copper proteins, psedoazurin and nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes* IAM 1013. *Chem. Lett.* 149-152

KRAFFT, T. & MACY, J. M. (1998). Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *Eur. J. Biochem.* **255:** 647-653.

KUKIMOTO, M., NISHIYAMA, M., MURPHY, M. E. P., TURLEY, S., ADMAN, E. T., HORINOUCHI, S. & BEPPU, T. (1994) X-ray structure and site-directed mutagenesis of a nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis* S-6: roles of two copper atoms in nitrite reduction. *Biochemistry* **33:** 5246-5252.

KUKIMOTO, M., NISHIYAMA, M., TANOKURA, M., ADMAN, E. T. & HORINOUCHI, S. (1996) Studies on protein-protein interaction between copper-containing nitrite reductase and pseudoazurin from *Alcaligenes faecalis* S-6. *J. Biol. Chem.* **271:** 13680-13683.

LACROIX, L. B., SHADLE, S. E., WANG, Y. N., AVERILL, B. A., HEDMAN, B., HODGSON, K. O. & SOLOMON, E. I. (1996) Electronic structure of the perturbed blue copper site in nitrite reductase: Spectroscopic properties, bonding, and implications for the entatic/rack state. *J. Am. Chem. Soc.* **118:** 7755-7768.

LACROIX, L. B., RANDALL, D. W., NERSISSIAN, A. M., HOITINK, C. G., CANTERS, G. W., VALENTINE, J. S. & SOLOMON, E. I. (1998) Spectroscopic and geometric variations in perturbed blue copper centers: Electronic structures of stellacyanin and cucumber basic protein. *J. Am. Chem. Soc.* **120:** 9621-9631.

LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227:** 680-685.

LEVALLOIS, P. & PHANEUF, D. (1994) Contamination of drinking water by nitrates: analysis of health risks. *Can. J. Public Health* **85:** 192-196

LI, C., INOUE, T., GOTOWDA, M., SUZUKI, S., YAMAGUCHI, K., KATAOKA, K. & KAI, Y. (1998) Structure of azurin I from the denitrifying bacterium *Alcaligenes xylosoxidans* NCIMB 11015 at 2.45-A resolution. *Acta Crystallogr. D* **54:** 347-354.

LIBBY, E. & AVERILL, B. A. (1992) Evidence that the type 2 copper centers are the site of nitrite reduction by *Achromobacter cycloclastes* nitrite reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187:** 1529-1535

LIE, T. J., GODCHAUX, W. & LEADBETTER, E. R. (1999). Sulfonates as terminal electron acceptors for growth of sulfite-reducing bacteria *(Desulfitobacterium* spp.) and sulfate-reducing bacteria : effects of inhibitors of sulfidogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65:** 4611-4617.

LIU, M. Y., LIU, M. C., PAYNE, W. J. & LEGALL, J. (1986) Properties and electron transfer specificity of copper proteins from the denitrifier *"Achromobacter cycloclaster*". *J. Bacteriol.* **166:** 604-608.

LIU, M.C., HUYNH, B.H., PAYNE, W.J., PECK, H.D. JR., DERVARTANIAN, D.V. & LEGALL, J. (1987) Optical, EPR and Mossbauer spectroscopic studies on the NO derivatives of cytochrome cd_1 from *Thiobacillus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* **169:**253-258

LOPES, H., BESSON, S., MOURA, I. & MOURA, J. J. (2001) Kinetics of inter- and intramolecular electron transfer of *Pseudomonas nautica* cytochrome cd_1 nitrite reductase: regulation of the NO-bound end product. *J. Biol. Inorg. Chem.* **6:** 55-62

LOUIE, T. M. & MOHN, W. W. (1999). Evidence for a chemiosmotic model of dehalorespiration in *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. *J. Bacteriol.* **181:** 40-46.

LOVLEY, D. R. (1991). Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol. Rev.* **55:** 259-287.

MAGALON, A., LEMESLE-MEUNIER, D., ROTHERY, R. A., FRIXON, C., WEINER, J. H. & BLASCO, F. (1997) Heme axial ligation by the highly conserved His residues in helix II of cytochrome *b* (NarI) of *Escherichia coli* nitrate reductase A. *J. Biol. Chem.* **272:** 25652-25658.

MAGALON, A., ASSO, M., GUIGLIARELLI, B., ROTHERY, R. A., BERTRAND, P., GIORDANO, G. & BLASCO, F. (1998) Molybdenum Cofactor Properties and [Fe-S] Cluster Coordination in *Escherichia coli* Nitrate Reductase A: Investigation by Site-Directed Mutagenesis of the Conserved His-50 Residue in the NarG Subunit. *Biochemistry* **37:** 7363-7370

MASUKO, M., IWASAKI, H., SAKURAI, T., SUZUKI, S. & NAKAHARA, A. (1984) Characterization of nitrite reductase from a denitrifier, *Alcaligenes* sp. NCIB 11015. A novel copper protein. *J. Biochem.* **96:** 447-454

MCALPINE, A. S., MCEWAN, A. G. & BAILEY, S. (1998). The high resolution crystal structure of DMSO reductase in complex with DMSO. *J. Mol. Biol.* **275:** 613-623.

MCEWAN, A. G., JACKSON, J. B. & FERGUSON, S. J. (1984) Rationalization of properties of nitrate reductases in *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.* **137:** 344-349

MCMILLIN, D. R. (1978) The origin of the intense absorption in azurin. *Bioinorg. Chem.* **8:** 179-184.

MEI, G., GILARDI, G., VENANZI, M., ROSATO, N., CANTERS, G. W. & AGRO, A. F. (1996) Probing the structure and mobility of *Pseudomonas aeruginosa* azurin by circular dichroism and dynamic fluorescence anisotropy. *Protein Sci.* **5:** 2248-2254.

MIGUEL, A. H. & BRAWN, R. D. (1974) Fluorimetric analysis of nitrate in real samples. *J. Chem. Ed.* **51:** 682-683

MOORE, G. R. & PETTIGREW, G. W. (1990) Cytochromes c. Springer-Verlag, Nova Iorque.

MORPETH, F. F. & BOXER, D. H. (1985) Kinetic analysis of respiratory nitrate reductase from *Escherichia coli* K12. *Biochemistry* **24:** 40–46.

MORRISON, M. & HORIE, S. (1965). Determination of heme *a* concentration in cytochrome preparations by hemochromogen method. *Anal. Biochem.* **12:** 77-82

MUN, S. K., CHANG, J. C. & DAS, T. P. (1979) Origin of observed changes in ^{14}N hyperfine interaction accompanying R→T transition in nitrosylhemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76:** 4842-4846.

NAGASAWA, T., NANBA, H., RYUNO, K., TAKEUCHI, K. & YAMADA, H. (1987) Nitrile hydratase of *Pseudomonas chlororaphis* B23. Purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* **162:** 691-698

NAR, H., MESSERSCHMIDT, A., HUBER, R., VAN DE KAMP, M & CANTERS, G. W. (1991) X-ray crystal structure of the two site-specific mutants His35Gln and His35Leu of azurin from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **218:** 427-447.

NICHOLAS, D. J. D. & NASON, A. (1957) Determination of nitrate and nitrite. *Methods Enzymol.* **3**: 981-984

NICHOLSON, R. S. & SHAIN, I. (1964) Theory of stationary electrode polarography. Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, end kinetic systems. *Anal. Chem.* **36:** 706-723

NISHIYAMA, M., HORINOUCHI, S., KOBAYASHI, M., NAGASAWA, T., YAMADA, H. & BEPPU, T. (1991) Cloning and characterization of genes responsible for metabolism of nitrile compounds from *Pseudomonas chlororaphis* B23. *J. Bacteriol.* **173:** 2465-2472

OLESEN, K., VESELOV, A., ZHAO, Y., WANG, Y., DANNER, B., SCHOLES, C. P. & SHAPLEIGH, J. P. (1998) Spectroscopic, kinetic, and electrochemical characterization of heterologously expressed wild-type and mutant forms of copper-containing nitrite reductase from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *Biochemistry* **37:** 6086-6094.

OLSON, R. A. (1977) Fertilizers for food production *vs.* energy needs and environmental quality. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1:** 311-326

PALLERONI, N. J. (1984) *Pseudomonas* (Migula 1894). In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1 (Ed. by Krieg, N.R.; Holt, J.G.), pp. 141-199. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.

PASCHER, T., KARLSSON, B. G., NORDLING, M., MALMSTRÖM, B. G. & VÄNNGÅRD, T. (1993) Reduction potentials and their pH dependence in site-directed-mutant forms of azurin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Biochem.* **212:** 289-296.

PETTIGREW, G. W., LEITCH, F. A. & MOORE, G. R. (1983) The effect of iron-hexacyanide binding on the determination of redox potentials of cytochromes and copper proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **725:** 409-416.

PHILIPPOT, L. & HØJBERG, O. (1999) Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1446:** 1-23.

PIERLOOT, K., DE KERPEL, J. O. A., RYDE, U., OLSSON, M. H. M. & ROOS, B. O. (1998) Relation between the structure and spectroscopic properties of blue copper proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **120:** 13156-13166.

POTRAWFKE, T., TIMMIS, K. N. & WITTICH, R. M. (1998) Degradation of 1,2,3,4-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas chlororaphis* RW71. *Appl. Environ. Microbiol.* **64:** 3798-3806

POTRAWFKE, T., ARMENGAUD, J. & WITTICH, R. M. (2001) Chlorocatechols substituted at positions 4 and 5 are substrates of the broad-spectrum chlorocatechol 1,2-dioxygenase of *Pseudomonas chlororaphis* RW71. *J. Bacteriol.* **183:** 997-1011

RICHARDSON, D. J. & WATMOUGH, N. J. (1999). Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3:** 207-219.

RICHARDSON, D. J. (2000) Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology* **146:** 551–571

ROLDAN, M. D., SEARS, H. J., CHEESMAN, M. R., FERGUSON, S. J., THOMSON, A. J., BERKS, B. C. & RICHARDSON, D. J. (1998). Spectroscopic characterization of a novel multiheme c-type cytochrome widely implicated in bacterial electron transport. *J. Biol. Chem.* **273:** 28785-28790.

SARASTE, M. & CASTRESANA, J. (1994) Cytochrome oxidase evolved by tinkering with denitrification enzymes. *FEBS Lett.* **341:** 1-4.

SAVÉANT, J. M. & VIANELLO, E. (1965) Potential-sweep chronoamperometry: kinetic currents for first-order chemical reaction parallel to electron-transfer process (catalytic currents). *Electrochim. Acta* **10:** 905-920

SCHALK, J., OUTSTAD, H., KUENEN, J. G. & JETTEN, M. S. (1998): The anaerobic oxidation of hydrazine: a novel reaction in microbial nitrogen metabolism. *FEMS Microbiol. Lett.* **158:** 61-67.

SCHRODER, I., RECH, S., KRAFFT, T. & MACY, J. M. (1997). Purification and characterization of the selenate reductase from *Thauera selenatis*. *J. Biol. Chem.* **272:** 23765-23768.

SEEFELDT, L.C. & DEAN, D.R. (1997) Role of nucleotides in nitrogenase catalysis. *Accounts Chem. Res.* **30:** 260-266.

SHADLE, S. E., PENNER-HAHN, J. E., SCHUGAR, J. H., HEDMAN, B., HODGSON, K. O. & SOLOMON, E. I. (1993) X-ray absorption spectroscopy studies of the blue copper site - metal and ligand K-edge studies to probe the origen of the EPR hyperfine splitting in plastocyanin. *J. Am. Chem. Soc.* **115:** 767-776.

SHAPLEIGH, J. P. & PAYNE, W. J. (1985) Differentiation of cd_1 cytochrome and copper nitrite reductase production in denitrifiers. *FEMS Microbiol. Lett.* **26:** 275-279

SILVESTRINI, M. C., BRUNORI, M., WILSON, M. T. & DARLEY-USMAR, V. M. (1981) The electron-transfer system of *Pseudomonas aeruginosa*: a study of the pH-dependent transition between redox forms of azurin and cytochrome c_{551}. *J. Inorg. Biochem.* **14:** 327-338.

SILVESTRINI, M. C., BRUNORI, M., TEGONI, M., GERVAIS, M. & LABEYRIE, F. (1986) Kinetics of electron transfer between two *Hansenula anomala* flavocytochrome b_2 derivatives and two simple copper proteins (azurin and stellacyanin). *Eur. J. Biochem.* **161:** 465-472.

SKERMAN, V. B. D., MCGOWAN, V. & SNEATH, P. H. A. (eds.) (1980) Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30:** 225-420

SMITH, F. E., HERBERT, J., GAUDIN, J., HENNESSEY, D. J. & REID, G. R. (1984) Serum iron determination using ferene triazine. *Clin. Biochem.* **17:** 306-310.

SOLOMON, E. I., RAWLINGS, J., MCMILLIN, D. R., STEPHENS, P. J. & GRAY, H. B. (1976) Infrared and visible circular dichroism and magnetic circular dichroism studies on cobalt (II)-substituted blue copper proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **98:** 8046-8048.

SOLOMON, E. I., BALDWIN, M. J. & LOWERY, M. D. (1992) Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity. *Chem. Rev.* **92:** 521-542

STANIER, R. Y., PALLERONI, N. J. & DOUDOROFF, M. (1966) The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43:** 159-271

STERN, R.V. & HOWARD, G.T. (2000) The polyester polyurethanase gene (pueA) from *Pseudomonas chlororaphis* encodes a lipase. *FEMS Microbiol. Lett.* **185:** 163-168

SUZUKI, S., KOHZUMA, T., DELIGEER, YAMAGUCHI, K., NAKAMURA, N., SHIDARA, S., KOBAYASHI, K., & TAGAWA, S. (1994) Pulse radiolysis studies on nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes* IAM 1013: evidence for intramolecular electron transfer from type 1 Cu to type 2 Cu. *J. Am. Chem. Soc.* **116:** 11145-11156

SUZUKI, S., DELIGEER, YAMAGUCHI, K., KATAOKA, K., KOBAYASHI, K., TAGAWA, S., KOHZUMA, T., SHIDARA, S. & IWASAKI, H. (1997) Spectroscopic characterization and intramolecular electron transfer processes of native and type 2 Cu-depleted nitrite reductases. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2:** 265-274

SUZUKI, S., KATAOKA, K., YAMAGUCHI, K., INOUE, T. & KAI, Y. (1999a) Structure-function relationships of copper-containing nitrite reductases. *Coord. Chem. Rev.* **190-192:** 245-265

SUZUKI, S., NAKAMURA, N., YAMAGUCHI, K., KATAOKA, K., INOUE, T., NISHIO, N., KAI, Y. & TOBARI, J. (1999b) Spectroscopic and electrochemical properties of two azurins (Az-iso1 and Az-iso2) from the obligate methylotroph *Methylomonas* sp. strain J and the structure of novel Az-iso2. *J. Biol. Inorg. Chem.* **4:** 749-758.

SUZUKI, S., KATAOKA, K. & YAMAGUCHI K. (2000) Metal coordination and mechanism of multicopper nitrite reductase. *Acc. Chem. Res.* **33:** 728-735

TARAZ, K., SEIPOLD, L., AMANN, C. & BUDZIKIEWICZ, H. (2000) The complex structure of ferri-ferribactins. *Z. Naturforsch. [C]* **55:** 836-839

TRUMPOWER, B. L. (1990) The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc_1 complex. *J. Biol. Chem.* **265:** 11409-11412

VAN DE GRAF, A., DE BRUIJN, P., ROBERTSON, L. A., JETTEN, M. S. M. & KUENEN, J. G. (1998) Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ^{15}N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology* **143:** 2415-2421.

VAN DE PAS, B. A., SMIDT, H., HAGEN, W. R., VAN DER OOST, J., SCHRAA, G., STAMS, A. J. & DE VOS, W. M. (1999). Purification and molecular characterization of ortho-chlorophenol reductive dehalogenase, a key enzyme of halorespiration in *Desulfitobacterium dehalogenans*. *J. Biol. Chem.* **274:** 20287-20292.

VAN DEN BERG, W. A., HAGEN, W. R. & VAN DONGEN, W. M. (2000) The hybrid-cluster protein ('prismane protein') from *Escherichia coli*. Characterization of the hybrid-cluster protein, redox properties of the [2Fe-2S] and [4Fe-2S-2O] clusters and identification of an associated NADH oxidoreductase containing FAD and [2Fe-2S]. *Eur. J. Biochem.* **267:** 666-676

VAN DER OOST, J., DE BOER, A. P. N., DE GIER, J.-W. L., ZUMFT, W. G., STOUTHAMER, A. H. & VAN SPANNING, R. J. M. (1994). The heme-copper oxidase family consists of three distinct types of terminal oxidases and is related to nitric oxide reductase. *FEMS Microbiol. Lett.* **121:** 1–10.

VAN DIJK, C., MAYHEW, S. G., GRANDE, H. J. & VEEGER, C. (1979) Purification and properties of hydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. *Eur. J. Biochem.* **102:** 317-330

VAN POUDEROYEN, G., MAZUMDAR, S., HUNT, N. I., HILL, H. A. O. & CANTERS, G. W. (1994) The introduction of a negative charge into the hydrophobic patch of *Pseudomonas aeruginosa* azurin affects the electron self-exchange rate and the electrochemistry. *Eur. J. Biochem.* **222:** 583-588.

VAN SPANNING, R. J., DE BOER, A. P., REIJNDERS, W. N., DE GIER, J.-W. L., DELORME, C. O., STOUTHAMER, A. H., WESTERHOFF, H. V., HARMS, N. & VAN DER OOST, J. (1995) Regulation of oxidative phosphorylation: the flexible respiratory network of *Paracoccus denitrificans*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **23:** 187-210

VESELOV, A., OLESEN, K., SIENKIEWICZ, A., SHAPLEIGH, J. P. & SCHOLES, C. P. (1998) Electronic structural information from Q-band ENDOR on the type 1 and type 2 copper liganding environment in wild-type and mutant forms of copper-containing nitrite reductase. *Biochemistry* **37:** 6095-6105.

VINCENT, S. P. & BRAY, R. C. (1978) Electron-paramagnetic-resonance studies on nitrate reductase from *Escherichia coli* K12. *Biochem. J.* **171:** 639-647.

VOLKL, P., HUBER, R., DROBNER, E., RACHEL, R., BURGGRAF, S., TRINCONE, A. & STETTER, K. O. (1993). *Pyrobaculum aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum. *Appl. Environ. Microbiol.* **59:** 2918-2926.

WEEG-AERSSENS, E., WU, W., YE, R. W., TIEDJE, J. M. & C. K. CHANG. (1991). Purification of cytochrome *cd*1 nitrite reductase from *Pseudomonas stutzeri* JM300 and reconstitution with native and synthetic heme d1. *J. Biol. Chem.* **266:** 7496–7502.

WERMTER, U. & FISCHER, U. (1983) Cytochromes and anaerobic sulfide oxidation in the purple sulfur bacterium *Chromatium warmingii*. *Z. Naturforsch. [C]* **38:** 960-967

WERST, M. M., DAVOUST, C.E. & HOFFMAN, B. M. (1991) Ligand spin densities in blue copper proteins by Q-band ^{1}H and ^{14}N ENDOR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **113:** 1533-1538

ZHU, Z., SUN, D. & DAVIDSON, V. L. (1999) Localization of periplasmic redox proteins of *Alcaligenes faecalis* by a modified general method for fractionating gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **181:** 6540-6542

ZUMFT, W. G (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61:** 533-616

ZUMFT, W. G., GOTZMANN, D. J. & KRONECK, P. M. H. (1987) Type 1, blue copper proteins constitute a respiratory nitrite-reducing system in *Pseudomonas aureofaciens*. *Eur. J. Biochem.* **168:** 301-307.

ZUMFT, W. G., BRAUN, C. & CUYPERS,. H. (1994) Nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzer*i: primary structure and gene organization of a novel bacterial cytochrome *bc* complex. *Eur. J. Biochem.* **219:** 481–490.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Determinação do parâmetro cinético λ a partir da razão corrente catalítica/corrente de pico. Curvas de trabalho para os casos reversível e irreversível.

As velocidades de transferência electrónica homogénea entre enzimas redox e mediadores (corantes artificiais ou pequenas proteínas redox capazes de transferir electrões entre o eléctrodo e a enzima em estudo) podem ser medidas por voltametria cíclica (Hoogvliet *et al.*, 1988). Para este fim, comparam-se os voltamogramas do mediador em presença e ausência de enzima e substrato. Em presença de substrato, a adição da enzima à solução do mediador resulta na regeneração do mediador, permitindo que este volte a interagir com o eléctrodo. A intensidade de corrente catalítica medida nestas condições será portanto superior à intensidade de pico medida na ausência de catálise, e uma análise da dependência da corrente catalítica com a quantidade de enzima e com a velocidade de varrimento permite obter os parâmetros de transferência electrónica entre a enzima e o mediador.

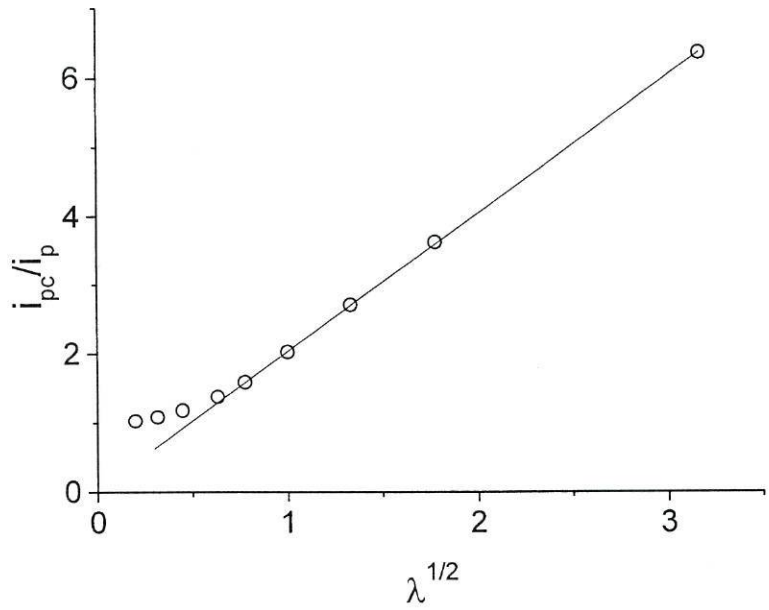
Nicholson & Shain (1964) calcularam detalhadamente a forma dos voltamogramas obtidos em condições catalíticas em função de um parâmetro cinético (λ) que depende simultaneamente da constante de transferência electrónica intermolecular e da velocidade de varrimento. A comparação destes resultados com os dados relativos a voltamogramas na ausência de catálise, obtidos pelos mesmos autores, permite elaborar uma curva de trabalho em que se representa a variação da razão das intensidades de corrente catalítica e de pico com o parâmetro cinético. Nas páginas seguintes apresentam-se as curvas de trabalho obtidas para sistemas irreversíveis e para sistemas reversíveis. A constante de transferência electrónica pode ser obtida a partir da derivada do parâmetro cinético em ordem à velocidade de varrimento, como descrito no texto.

Sistemas irreversíveis:

λ	$\sqrt{\lambda}$	i_{pc}/i_p
0.04	0.2	1.030658
0.1	0.316228	1.087132
0.2	0.447214	1.181928
0.4	0.632456	1.377572
0.6	0.774597	1.585317
1	1	2.018233
1.78	1.334166	2.697136
3.16	1.777639	3.613635
10	3.162278	6.360468

Para valores de i_{cat}/i_p superiores a 1.6 a curva de trabalho torna-se essencialmente linear, e pode ser aproximada com erro inferior a 1% pela equação:

$$\frac{icat}{ip} = 2.0063 \times \sqrt{\lambda} + 0.0239$$

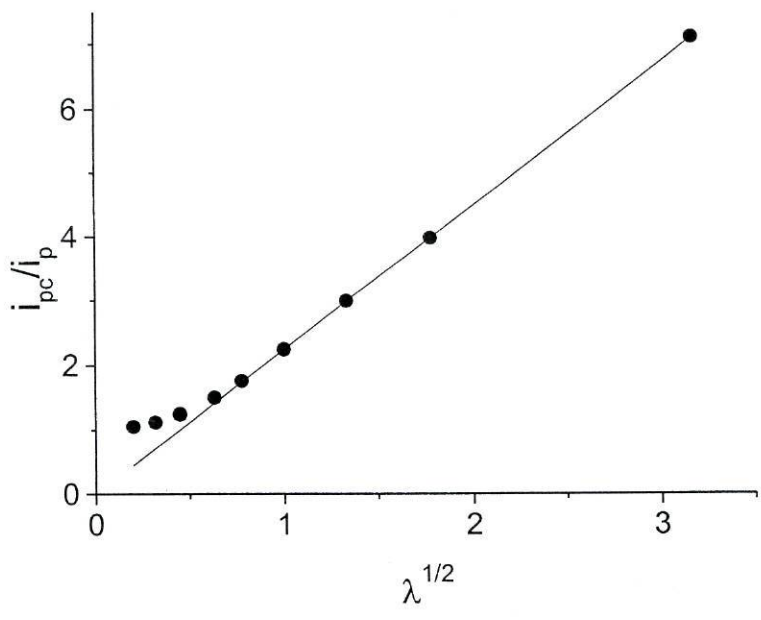


Sistemas reversíveis:

λ	$\sqrt{\lambda}$	i_{pc}/i_p
0.04	0.2	1.048622
0.1	0.316228	1.120323
0.2	0.447214	1.245799
0.4	0.632456	1.496751
0.6	0.774597	1.752185
1	1	2.23957
1.78	1.334166	2.990007
3.16	1.777639	3.979924
10	3.162278	7.093883

Para valores de i_{cat}/i_p superiores a 1.8 a curva de trabalho torna-se essencialmente linear, e pode ser aproximada com erro inferior a 1% pela equação:

$$\frac{icat}{ip} = \frac{\sqrt{\lambda}}{0.4463}$$



APÊNDICE 2

Ajuste das curvas de titulação redox com a equação de Nernst

A equação de Nernst indica que no equilíbrio:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF}\ln\frac{ox}{red} \Leftrightarrow \quad E - E^0 = \frac{RT}{nF}\ln\frac{ox}{red} \Leftrightarrow \quad \frac{nF}{RT}\left(E - E^0\right) = \ln\frac{ox}{red}$$

ou seja,

$$\frac{ox}{red} = e^{\frac{nF}{RT}\left(E-E^0\right)}$$

Como em qualquer momento, a soma das espécies oxidada e reduzida é constante, *i.e.*, $ox + red = A$, vem:

$$\frac{ox}{A-ox} = e^{\frac{nF}{RT}\left(E-E^0\right)}$$

$$ox = A\, e^{\frac{nF}{RT}\left(E-E^0\right)} - ox\, e^{\frac{nF}{RT}\left(E-E^0\right)}$$

$$ox + ox\, e^{\frac{nF}{RT}\left(E-E^0\right)} = A\, e^{\frac{nF}{RT}\left(E-E^0\right)}$$

$$ox\left(1 + e^{\frac{nF}{RT}\left(E-E^0\right)}\right) = A\, e^{\frac{nF}{RT}\left(E-E^0\right)}$$

$$\boxed{ox = A\frac{e^{\frac{nF}{RT}\left(E-E^0\right)}}{1 + e^{\frac{nF}{RT}\left(E-E^0\right)}}}$$

APÊNDICE 3

Dependência do coeficiente de difusão com o pH. Dedução da equação 3.3

Suponhamos que a variação do coeficiente de difusão da azurina está associada a um processo de protonação representado por $AzH \leftrightharpoons Az^- + H^+$, com um K_a definido pela equação:

$$K_a = \frac{Az^- H^+}{AzH}$$

Supondo $AzH + Az^- = 1$, vem:

$$AzH = \frac{(1 - AzH)\, H^+}{K_a} \Leftrightarrow AzH = \frac{H^+}{K_a} - AzH \times \frac{H^+}{K_a} \Leftrightarrow AzH\left(1 + \frac{H^+}{K_a}\right) = \frac{H^+}{K_a} \Leftrightarrow$$

$$AzH = \frac{H^+}{H^+ + K_a} \qquad \text{(equação 1)}$$

Definindo-se coeficiente de difusão médio, D_0, da espécie como:

$$D_0 = D_{Az^-}\, Az^- + D_{AzH}\, AzH$$

e substituindo, $Az^- = 1 - AzH$, vem:

$$D_0 = D_{Az^-}\,(1 - AzH) + D_{AzH}\, AzH \Leftrightarrow D_0 = D_{Az^-} - D_{Az^-}\, AzH + D_{AzH}\, AzH \Leftrightarrow$$

$$D_0 = D_{Az^-} + AzH\,(D_{AzH} - D_{Az^-})$$

Usando a equação 1 obtida acima vem:

$$D_0 = D_{Az^-} + \frac{H^+}{K_a + H^+}(D_{AzH} - D_{Az^-})$$

$$D_0 = \frac{K_a\, D_{Az^-} + D_{Az^-}\, H^+ + D_{AzH}\, H^+ - H^+\, D_{Az^-}}{K_a + H^+}$$

$$\boxed{D_0 = \frac{K_a\, D_{Az^-} + D_{AzH}\, H^+}{K_a + H^+}}$$