

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO DE DOIS NOVOS TIPOS DE CENTROS FERRO-ENXOFRE
EM DUAS PROTEÍNAS ISOLADAS DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO
(DESULFOVIBRIO GIGAS NCIB 9332)

POR

ISABEL MARIA ANDRADE MARTINS GALHARDAS DE MOURA

TESE APRESENTADA PARA OBTENÇÃO
DO GRAU DE DOUTOR

LISBOA, 1980

A meus pais

Ao zé

À Joana

AGRADECIMENTO

Esta tese foi realizada no Centro de Química Estrutural da Universidade de Lisboa.

Quero deixar aqui expresso o meu profundo reconhecimento ao Prof.Doutor António V.Xavier, pela orientação, condições e apoio que me proporcionou, sem as quais esta tese não teria podido ser realizada.

Para a realização deste trabalho contribuíram várias pessoas, a quem desejo expressar o meu agradecimento:

Ao prof.Jean Le Gall (Laboratoire de Chimie Bactérienne, CNRS, Marselha) um agradecimento especial, pois foi ele que pela primeira vez isolou a desulforedoxina uma das proteínas estudadas em detalhe nesta tese. À Dra. M.Bruschi, do mesmo laboratório, por me ter introduzido nas técnicas de determinação de sequências de ácidos aminados. Ao Dr.A.J.Thomson (da School of Chemical Sciences, Universidade de East Anglia,U.K.) por me ter possibilitado a realização de espectros de dicroísmo circular magnético no seu laboratório. Ao Dr.R.Cammack (do Department of Plant Sciences, King's College,Londres) pela oportunidade que me deu de realizar estudos de oxidação-redução por ressonância paramagnética electrónica, quando estas facilidades ainda não existiam no nosso laboratório.

Um agradecimento especial ao Prof.Eckard Münck e ao Dr. Boi Hanh Huynh (Freshwater Biological Institute, University of Minnesota, EUA) por me terem introduzido na técnica de espectroscopia de Mössbauer. Foi devido à ajuda e formação que me deram que uma grande parte desta tese pôde ser realizada.

Quero também expressar o meu agradecimento à *Freshwater Biological Research Foundation* pelas oportunidades que me proporcionou de deslocação aos Estados Unidos.

Aos meus colegas do Centro de Química Estrutural, em especial à Maria Helena Dias dos Santos, José do Rosário Ascenso, Maria Helena Mendonça Dias e José João Galhardas de Moura, pela amizade e sugestões.

À Isabel Pacheco pela ajuda laboratorial que me proporcionou.

O meu agradecimento à Margarida Senna Martinez pelo cuidado com que dactilografou esta tese.

Por fim, o meu profundo agradecimento ao Zé, meu marido, pelo seu constante encorajamento e presença. À Joana, minha filha, por todos os momentos roubados, e à minha família pela maneira como me soube substituir nas minhas ausências.

Agradeço os subsídios recebidos do Instituto Nacional de Investigação Científica, Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica, Fundação Calouste Gulbenkian e Serviços Culturais da Embaixada de França em Portugal, sem os quais não teria sido possível a realização desta tese.

ÍNDICE

PÁGINA

I - INTRODUÇÃO GERAL	
I.1 - <u>INTERESSE DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO</u>	1
I.2 - <u>METABOLISMO DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO</u>	2
I.3 - <u>OS TRANSPORTADORES DE ELECTRÕES NAS BACTÉRIAS</u> <u>REDUTORAS DE SULFATO</u>	4
I.3.1 - OS CITOCROMOS DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO	8
I.3.1.1 - <u>Citocromo c₃</u> (PM 13 000)	8
I.3.1.2 - <u>Citocromo c₃</u> (PM 26 000)	10
I.3.1.3 - <u>Citocromo c₅₅₃</u>	10
I.3.2 - OS TRANSPORTADORES DE ELECTRÕES NÃO CITOCRÓMICOS	11
I.3.2.1 - <u>Ferredoxina</u>	11
I.3.2.2 - <u>Flavodoxina</u>	12
I.3.2.3 - <u>Rubredoxina</u>	13
I.3.2.4 - <u>Hidrogenase</u>	13
I.3.2.5 - <u>Outras proteínas</u>	14
I.4 - <u>IMPORTÂNCIA DO FERRO E ENXOFRE NA CONSTITUIÇÃO</u> <u>DE CENTROS ACTIVOS DE PROTEÍNAS</u>	15
I.5 - BIBLIOGRAFIA	22
II.- PARTE EXPERIMENTAL	
II.1 - <u>PURIFICAÇÃO DOS TRANSPORTADORES ELECTRÓNICOS</u> <u>ESTUDADOS</u>	27
II.1.1 - NOTAS PRELIMINARES	27
II.1.2 - PREPARAÇÃO DO EXTRACTO BACTERIANO	28
II.1.3 - PURIFICAÇÃO DO CITOCROMO c ₃	28
II.1.4 - PREPARAÇÃO DO EXTRACTO ACÍDICO DE <u>D.gigas</u>	30
II.1.4.1 - <u>Etapas de purificação específicas</u>	33
II.1.4.1.1 - Desulforedoxina	33
II.1.4.1.2 - Rubredoxina	34
II.1.4.1.3 - Ferredoxina	35

II.2 - <u>ANÁLISE DOS CONSTITUINTES DAS PROTEÍNAS</u>	
<u>EM ESTUDO</u>	37
II.2.1 - FERRO E ENXOFRE	37
II.2.2 - COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS AMINADOS	37
II.2.3 - PONTO ISOELÉCTRICO	38
II.2.4 - PESO MOLECULAR	38
II.2.5 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EM PROTEÍNA	38
II.3 - <u>TÉCNICAS DE ANÁLISE DA ESTRUTURA PRIMÁRIA</u>	
<u>DE UMA PROTEÍNA</u>	39
II.3.1 - IDENTIFICAÇÃO DOS RESÍDUOS C-TERMINAL	39
II.3.1.1 - <u>Hidrazinólise. Método de Akabori</u>	39
II.3.1.2 - <u>Carboxipeptidase</u>	40
II.3.2 - HIDRÓLISE SELECTIVA DAS CADEIAS POLIPEPTÍDICAS	41
II.3.2.1 - <u>Corte químico das ligações peptídicas</u>	
<u>pelo brometo de cianogênio</u>	41
II.3.2.2 - <u>Hidrólise enzimática</u>	41
II.3.2.2.1 - Tripsina	42
II.3.2.2.2 - Peptidase isolada de <u>Staphylococcus aureus</u>	42
II.3.3 - PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS	43
II.3.3.1 - <u>Oxidação pelo ácido perfórmico</u>	44
II.3.4 - DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE ÁCIDOS AMINADOS -	
- DEGRADAÇÃO DE EDMAN	44
II.3.4.1 - <u>Mecanismo de degradação pelo isotiacianato</u>	44
II.3.4.2 - <u>Degradação de Edman em Fase Líquida</u>	46
II.4 - <u>RECONSTITUIÇÃO DA DESULFOREDOXINA</u>	47
II.5 - <u>REACÇÃO DA DESULFOREDOXINA NATIVA COM O ÁCIDO</u>	
<u>IDOACÉTICO</u>	48
II.6 - <u>PESQUISA DE PONTES DISSULFURETO NA DESULFOREDOXINA</u>	49

II.7 - <u>TITULAÇÃO DOS GRUPOS SULFIDRILLO - REACÇÃO COM REAGENTES ORGÂNICOS MERCURIAIS</u>	51
II.8 - <u>ESPECTROS DE ULTRA-VIOLETA E VISÍVEL</u>	52
II.9 - <u>ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR MAGNÉTICO</u>	52
II.10- <u>ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR</u>	53
II.10.1 - MEDIDAS DE SUSCEPTIBILIDADE MAGNÉTICA	54
II.10.1.1 - <u>Condições experimentais</u>	56
II.11 - <u>ESPECTROS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA</u>	56
II.11.1 - TITULAÇÃO REDOX POR RPE	57
II.11.2 - SISTEMA DE MEDIADORES	59
II.12 - <u>ESPECTROS DE MOSSBAUER</u>	61
II.13 - <u>BIBLIOGRAFIA</u>	62
III - A DESULFOREDOXINA DE D.gigas	
III.1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	65
III.2 - <u>PROPRIEDADES DAS RUBREDOXINAS</u>	66
III.2.1 - GENERALIDADES	66
III.2.2 - ANÁLISE DOS RESULTADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X EM RUBREDOXINAS	70
III.2.3 - ANÁLOGOS SINTÉTICOS AO TIPO DE CENTRO RUBREDOXINA	76
III.2.3.1 - <u>Síntese e estrutura</u>	77
III.2.3.2 - <u>Semelhanças entre o análogo e a proteína</u>	79
III.2.3.3 - <u>Extrusão do centro activo</u>	81
III.3 - <u>CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DESULFOREDOXINA DE D.gigas</u>	82
III.3.1 - PESO MOLECULAR	82
III.3.2 - COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS AMINADOS	85
III.3.3 - PONTO ISOELÉCTRICO	85
III.3.4 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE ULTRA-VIOLETA E VISÍVEL	87
III.3.5 - PROPRIEDADES DE OXIDAÇÃO-REDUÇÃO	87
III.3.6 - ANÁLISE DE FERRO	89

III.3.7 - ANÁLISE DE ENXOFRE LÁBIL	92
III.3.8 - RECONSTITUIÇÃO COM ^{57}Fe	92
III.3.9 - TITULAÇÃO DAS CISTEÍNAS PELO p-CLOROMERCURIO BENZOATO	93
III.3.10- ESTUDO DO ESTADO DAS CISTEÍNAS	95
III.3.11- SEQUÊNCIA	96
III.3.11.1 - <u>Análise da sequência N-terminal</u>	96
III.3.11.2 - <u>Digestão da proteína com carboxipeptidase A</u>	97
III.3.11.3 - <u>Peptídeos obtidos pelo brometo de cianogênio</u>	97
III.3.11.4 - <u>Peptídeos obtidos por hidrólise triptica</u>	100
III.3.11.5 - <u>Peptídeos obtidos por hidrólise com a protease de Staphylococcus aureus</u>	102
III.3.12- DISCUSSÃO	106
III.4 - <u>ANÁLISE DO ESPECTRO DE VISÍVEL E DOS ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR MAGNÉTICO DA DESULFOREDO- XINA - COMPARAÇÃO COM A RUBREDOXINA</u>	110
III.4.1 - TEORIA	110
III.4.2 - ESPECTRO ÓPTICO DA DESULFOREDOXINA DE D.gigas	113
III.4.3 - ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR MAGNÉTICO	115
III.5 - <u>ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR- - COMPARAÇÃO COM A RUBREDOXINA</u>	119
III.5.1 - INTRODUÇÃO	119
III.5.2 - RESULTADOS	122
III.5.2.1 - <u>Susceptibilidade Magnética</u>	123
III.5.2.2 - <u>Espectros de R.M.N.</u>	128

III.6 - <u>ESTUDOS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÔNICA</u> <u>E DE MÖSSBAUER NA DESULFOREDOXINA - COMPARAÇÃO</u> <u>COM A RUBREDOXINA</u>	128
III.6.1 - INTRODUÇÃO À TEORIA DA ESPECTROSCOPIA DE MÖSSBAUER E RPE	128
III.6.1.1 - <u>O Hamiltoneano nuclear</u>	131
III.6.1.2 - <u>O Hamiltoneano de spin</u>	135
III.6.1.3 - <u>Aplicação do formalismo do Hamiltoneano a</u> <u>um sistema de Kramer</u>	138
III.6.1.3.1 - Sistema com $S=5/2$	139
III.6.1.4 - <u>Sistema não-Kramer</u>	147
III.6.2 - ESTUDOS DE RPE NA DESULFOREDOXINA	149
III.6.2.1 - <u>Espectro de RPE da Desulforedoxina</u>	149
III.6.2.2 - <u>Cálculo do valor de D</u>	152
III.6.2.3 - <u>Efeito da força iônica no espectro de RPE</u>	153
III.6.2.4 - <u>Exemplificação de uma quantificação de spin</u>	155
III.6.2.5 - <u>Titulação redox</u>	157
III.6.2.6 - <u>Velocidade de relaxação</u>	157
III.6.2.7 - <u>Espectro de RPE da rubredoxina de <i>D.gigas</i></u>	157
III.6.2.8 - <u>Determinação dos potenciais redox de</u> <u>várias rubredoxinas</u>	160
III.6.3 - ESTUDOS DE MÖSSBAUER	165
III.6.3.1 - <u>Desulforedoxina oxidada</u>	165
III.6.3.1.1 - Estudos a campo baixo	165
III.6.3.1.2 - Estudos a campo elevado	173
III.6.3.2 - <u>Desulforedoxina reduzida</u>	180
III.6.3.3 - <u>Rubredoxina oxidada</u>	187
III.6.4 - DISCUSSÃO	192

IV - EVIDÊNCIA SOBRE A PRESENÇA DE UM NOVO TIPO DE CENTRO
CONTENDO TRÊS FERROS NA FERREDOXINA II DE D.GIGAS

IV.1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	201
IV.1.1 - PROTEÍNAS DE FERRO-ENXOFRE	201
IV.1.1.1 - Ferredoxinas com centros $[4\text{Fe}-4\text{S}]$	205
IV.1.2 - AS FERREDOXINAS DE <u>D.gigas</u>	207
IV.2 - <u>RESULTADOS</u>	214
IV.2.1 - ANÁLISE DE FERRO	214
IV.2.2 - MEDIDAS DE SUSCEPTIBILIDADE MAGNÉTICA	216
IV.2.3 - ESTUDOS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÔNICA	218
IV.2.4 - ESTUDOS DE MÖSSBAUER	225
IV.3 - <u>DISCUSSÃO</u>	232
IV.4 - <u>POSSÍVEL INTERCONVERSÃO ENTRE OS CENTROS $[3\text{Fe}, x\text{S}]$ E $[4\text{Fe}, 4\text{S}]$</u>	243
IV.5 - <u>BIBLIOGRAFIA</u>	249

SUMÁRIO

As bactérias redutoras de sulfato têm uma cadeia de transferência electrónica complexa, que conduz à redução do sulfato através da oxidação de substâncias orgânicas ou de hidrogénio molecular. Isolaram-se e caracterizaram-se duas proteínas, isoladas de um organismo redutor de sulfato (Desulfovibrio gigas), contendo dois novos tipos de centros ferro-enxofre: a desulforedoxina, com um centro de 1Fe, semelhante ao da rubredoxina, e a ferredoxina II, com um centro $[3Fe, xS]$ recentemente também identificado numa ferredoxina de Azotobacter vinelandii. A presença de ferro nestas proteínas permite a aplicação de técnicas espectroscópicas, de modo a que possa ser obtida informação estrutural (nomeadamente ressonância magnética nuclear (RMN), ressonância paramagnética electrónica (RPE) e espectroscopia de Mössbauer).

A desulforedoxina é um novo tipo de proteína contendo ferro não hémico sem enxofre lábil. A proteína é isolada como um dímero, de peso molecular 7 900, consistindo de duas subunidades idênticas, com um átomo de ferro e quatro cisteínas por monómero.

A composição de ácidos aminados é invulgar, pois no total estão ausentes sete ácidos aminados (arginina, histidina, triptofano, serina, prolina, isoleucina e fenilalanina).

Determinou-se a sequência em ácidos aminados da desulforedoxina. A elucidação da sequência foi obtida por degradação da proteína inteira no sequenciador de proteínas e pela determinação da sequência dos peptídeos, obtida pela digestão com a protease de Staphylococcus aureus.

Quando se compara a sequência da desulforedoxina com as sequências das rubredoxinas, a desulforedoxina mostra pouca homologia e só é conservada a sequência Tir-X-Cis-X-X-Cis-Gli na sequência N-terminal. As outras duas cisteínas encontram-se nas posições 28 e 29.

Esta sequência invulgar das cisteínas levantou-nos a dúvida se todas as cisteínas estariam ligadas ao ferro. Realizaram-se experiências com o ácido iodoacético e titulações com PCMB, que nos levaram a concluir que as quatro cisteínas da desulforedoxina devem estar ligadas ao ferro.

A sequência invulgar das cisteínas levou-nos a propor duas possíveis estruturas para a desulforedoxina

O espectro de ultra-violeta e visível da desulforedoxina, bem como o de dicroísmo circular magnético, mostram bastantes semelhanças com os das rubredoxinas. No entanto, existem algumas diferenças, que sugerem que o 1º estado excitado do ferro tem uma maior simetria na desulforedoxina.

Realizaram-se medidas de susceptibilidade magnética e de ressonância magnética nuclear nas formas oxidada e reduzida da desulforedoxina. Obtiveram-se $5,7\mu_B$ para a forma oxidada e $4,9\mu_B$ para a forma reduzida. O valor dos momentos magnéticos obtidos para a desulforedoxina indicam que o ferro associado com a desulforedoxina é Fe(III) de spin alto na forma oxidada e Fe(II) de spin alto na forma reduzida. Os espectros de ressonância magnética nuclear das duas formas redox não apresentam ressonâncias dependentes da temperatura. Tal como para a rubredoxina, os espectros de RMN são pouco informativos devido ao elevado momento magnético do ferro, que origina uma baixa resolução.

Os estudos de RPE e Mössbauer mostraram a existência de algumas diferenças geométricas entre a desulforedoxina e a rubredoxina; o valor baixo do parâmetro de rombicidade $E/D=0,08$ ($E/D=0,28$ para a rubredoxina) faz com que a desulforedoxina tenha um espectro de RPE mais axial (isto não implica necessariamente uma coordenação geométrica mais axial). Ambas as proteínas, na forma oxidada e reduzida, têm praticamente os mesmos desvios isoméricos, característicos de coordenação tetraédrica a enxofre. A constante de acoplamento magnética hiperfina, A_O , dada pelo campo de saturação $H_{sat} = -5 A_O / 2g_n \beta_n$, da desulforedoxina é $H_{sat} = -385$ KG, sendo ainda mais pequena do que o valor encontrado para as rubredoxinas de C.pasteurianum e de D.gigas, $H_{sat} = -410$ KG. Isto sugere uma ligação ligando-metal mais covalente para a desulforedoxina (compostos iônicos têm campos de saturação próximos de -550 KG).

Na forma reduzida, o ferro da desulforedoxina está no estado ferroso, com spin alto, $S=2$. O desvio de quadrupolo não depende da temperatura, o que implica que o estado orbital fundamental esteja separado do 1º estado orbital excitado pelo menos 800 cm^{-1} . Os resultados mostram que $\Delta E_Q > 0$ e $\eta < 0,5$; isto implica um estado orbital fundamental de carácter predominantemente $d_{x^2-y^2}$. Em contraste, o estado orbital fundamental da rubredoxina é praticamente uma orbital d_{z^2} pura.

A forma tetramérica da ferredoxina de D.gigas, FdII, media a transferência electrónica entre o citocromo c₃ e a sulfito reductase. Estudámos dois estados de oxidação desta proteína, por ressonância paramagnética electrónica e espectroscopia de Mössbauer. Encontramos 3 átomos de ferro/monómero e uma concentração de spin de $0,9$ spins/monómero, na forma oxidada.

O espectro ~~magnético~~ de Mössbauer da FdII oxidada a 4,2 K mostra três sítios de ferro distintos, que produzem o sinal de RPE. Após redução o centro torna-se silencioso em RPE. As medidas de susceptibilidade magnética e os resultados de Mössbauer mostram que, após redução, a FdII é paramagnética $S > 0$ (provavelmente $S=2$). Os espectros de Mössbauer mostram duas vizinhanças distintas para o ferro, numa proporção de 2:1. A forma do espectro de Mössbauer e o comportamento com a aplicação de campo magnético sugerem um spin electrónico comum, ou seja, um centro com spins acoplados. O acoplamento de spins é apoiado pelo facto de observarmos campos magnético hiperfinos positivos e negativos.

Os desvios isoméricos observados sugerem que os ferros têm coordenação tetraédrica a átomos de enxofre. Isto contudo não põe de parte a possibilidade de que um dos sítios possa ter um ligando oxigenado ou azotado.

Na forma oxidada do centro os três ferros são distintos. Na forma reduzida no entanto, dois átomos de ferro são indistinguíveis mesmo em campos magnéticos elevados. O aumento do desvio isomérico e do desdobramento de quadrupolo quando da redução sugere que os dois átomos de ferro do duplete I partilham o electrão que entra após a redução. Cada um destes ferros terá um estado de oxidação formal +2,5.

Além da forma tetramérica FdII, a mesma subunidade básica pode formar um trímero designado por FdI. Estudou-se por RPE e Mössbauer uma amostra desta proteína e chegou-se à conclusão que 30% do ferro estava presente em centros de três ferros, enquanto que 70% do ferro se apresentava na forma de centros $[4\text{Fe}, 4\text{S}]$.

Quando a Ferredoxina II é convertida em apoproteína com ácido tricloroacético e o centro de ferro-enxofre é reconstituído por adição de ferro e enxofre, a proteína transforma-se numa ferredoxina com centros $[4\text{Fe}, 4\text{S}]$.

Os resultados obtidos com as duas formas oligoméricas da ferredoxina de D.gigas e com a ferredoxina reconstituída, mostram que a mesma cadeia polipeptídica pode acomodar tanto centros $[3\text{Fe}, x\text{S}]$ como centros $[4\text{Fe}, 4\text{S}]$.

Com o estudo destas duas proteínas contendo dois novos tipos de centros obtivemos um conjunto de informações que permitem alargar o conhecimento sobre estruturas básicas em proteínas contendo centros ferro-enxofre.

Estas proteínas simples, cujo centro activo é bem definido, podem ser usadas como modelos de proteínas mais complexas. Nestas proteínas, devido à multiplicidade de centros, seria difícil identificar estes novos tipos de centro, se não se conhecessem previamente as suas propriedades.

SUMMARY

The electron transfer chain of sulphate reducing bacteria is very complex, the oxidation of organic substrates leading either to the reduction of sulphate or to molecular hydrogen. In an effort to further elucidate this chain we have isolated and characterized two proteins from a sulphate reducing organism (Desulfovibrio gigas), containing two new types of iron-sulphur centres: desulforedoxin, with a centre similar to rubredoxin and ferredoxin II with one $[3\text{Fe}, x\text{S}]$, also recently identified in a ferredoxin from Azotobacter vinelandii. The presence of iron in these proteins allows the utilization of spectroscopic techniques to obtain structural information (such as nuclear magnetic resonance (NMR), electron paramagnetic resonance (EPR) and Mössbauer spectroscopy).

Desulforedoxin is a new type of protein containing non-heme iron and no labile sulphur.

The protein is isolated as a dimer of 7900 molecular weight consisting of two identical subunits with one iron atom and four cysteines per monomer. The amino acid composition is very unusual, since in the total there are seven amino acids absent (arginine, histidine, tryptophan, serine, proline, isoleucine and phenylalanine).

The amino-acid sequence was determined. The sequence was elucidated by the degradation of the all protein in the protein sequenator and from the sequence determination of the peptides obtained by the cleavage of the protein with S.aureus protease.

The N-terminal series of residues Tyr-x-Cys-x-x-Cys-Gly is the only homologous portion of the sequence to that of the rubredoxins. The other two cysteines are placed at the 28 and 29 position.

This unusual sequence of cysteines raises the question of whether all four cysteines are iron ligands. The experiments on the sulphhydryl content of apo and holoprotein and the PCMB titration study indicate that each iron atom is coordinated to four cysteines.

With the unusual sequence of cysteines it is possible to postulate two structures for desulforedoxin.

The visible and magnetic circular dichroism spectra of desulforedoxin show close similarities to those of rubredoxin type proteins. However there are certain differences that indicate a lower symmetry for the first electronic excited state of iron in the desulforedoxin.

Magnetic susceptibility measurements of the oxidized and reduced states of the proteins were also carried out. The magnetic moments are 5.70 and 4.90 Bohr magnetons for the oxidized and reduced form, respectively. These susceptibility results indicate that the iron associated with desulforedoxin is high-spin Fe(III) in the oxidized form and high-spin Fe(II) in the reduced form.

The nuclear magnetic resonance spectra of both redox forms does not show temperature dependent resonances. As in rubredoxin the NMR spectra are of low resolution due to the high magnetic moment of the iron.

The EPR and Mössbauer data indicate certain geometrical differences between desulforedoxin and rubredoxin; the small

rhombicity parameter $E/D = 0.08$ (as compared to an $E/D = 0.28$ for rubredoxin) gives a more axial EPR spectrum for desulfo-redoxin (this does not necessarily imply a more axial coordination geometry). Both proteins, in the oxidized and in the reduced state, have nearly the same isomeric shifts, characteristic of tetrahedral sulphur coordination. Magnetic hyperfine coupling constant, A_0 of desulfo-redoxin, generally quoted as the saturation field, $H_{sat} = 5A_0/2g_n\beta_n$, by Mössbauer spectroscopists, is $H_{sat} = -385$ kG, and has an even lower value than that found for the rubredoxins from C.pasteurianum and D.gigas, $H_{sat} = -410$ kG. This suggests a larger metal-ligand bond covalency for desulfo-redoxin (ionic compounds have saturation fields of about -550 kG).

In the reduced form the iron sites of desulfo-redoxin are in a high spin ferrous state, $S=2$. The nearly temperature independent quadrupole splitting implies an isolated orbital ground state, separated in energy by at least 800 cm^{-1} from the first excited (orbital) state. The data shows that $\Delta E_Q > 0$ and $\eta < 0.5$; this implies an orbital ground state of predominantly $d_{x^2-y^2}$ character. In contrast, the ground state of rubredoxin is almost a pure d_{z^2} orbital.

The tetrameric form of the Desulfovibrio gigas ferredoxin, named FdII, mediates electron transfer between cytochrome c_3 and the sulfite reductase. We have studied two stable oxidation states of this protein with electron paramagnetic resonance and Mössbauer spectroscopy. We found 3 iron atoms/monomer and a spin concentration of 0.9 spins/monomer for the oxidized protein.

The magnetic Mössbauer spectrum of oxidized FdII observed at 4.2 K shows three distinct iron sites belonging to EPR-

-active centres. Upon reduction by 1 electron the centres become EPR-silent. The magnetic susceptibility measurements and the Mössbauer results reveal that reduced FdII is paramagnetic $S > 0$ (probably $S=2$). The Mössbauer spectra demonstrate two distinct iron environments which are present in the ratio 2:1

The features of the magnetic Mössbauer spectra and their response to applied magnetic field, suggest a common electronic spin. Spin coupling is indicated by the observation of positive and negative magnetic hyperfine fields.

The observed isomeric shifts suggest that the irons have tetrahedral environments of sulphur atoms. This, however, does not rule out the possibility that a site might have one oxygenic or nitrogenic ligand. The three irons are distinguishable in the oxidized state of the cluster. In the reduced state, however, two iron atoms (doublet I) are indistinguishable even in strong applied fields. The increased isomeric shift and the quadrupole splitting suggests that the two iron atoms of doublet I share the electron that enters the complex upon reduction; both sites have a formal oxidation of $\text{Fe}^{+2.5}$.

Besides the tetrameric FdII the basic subunit can form a trimeric protein, named FdI. EPR and Mössbauer studies of this protein show that approximately 30% of the iron is present as a three-iron centre and 70% of the iron in a $[\text{4Fe}, \text{4S}]$ centre.

When ferredoxin II is converted into apoprotein with trichloroacetic acid and the iron sulfur centre is reconstituted by the addition of iron and sulfide the protein becomes a ferredoxin with $[\text{4Fe}, \text{4S}]$ centres.

The obtained results with the two oligomeric forms of D.gigas ferredoxin and with the reconstituted ferredoxin show that the same polipeptide chain can accomodate either $[3\text{Fe}, x\text{S}]$ or $[4\text{Fe}, 4\text{S}]$ centres.

With the study of these two proteins containing two new types of centres a set of informations was obtained about basic structures in proteins containing iron-sulphur centres. These simple proteins with a very well defined centre can be used as models for more complex proteins. In these proteins, due to the multiplicity of centres it would be difficult to identify these new types of centres without previously knowing their properties.

I . I N T R O D U Ç Ã O G E R A L

I.1 ~ INTERESSE DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

A redução dos sulfatos em ácido sulfídrico pode realizar-se segundo duas vias diferentes, nos organismos vivos.

A via assimilativa é utilizada por diversos organismos para a biossíntese de certos compostos orgânicos sulfurados, em particular os ácidos aminados (cisteína e metionina). A via dissimilativa, específica das bactérias redutoras de sulfato, utiliza o sulfato como aceitador final de electrões conduzindo à acumulação de quantidades importantes de sulfureto.

As bactérias redutoras de sulfato são os primeiros micro-organismos anaeróbicos estrictos nos quais uma fosforilação oxidativa ligada ao transporte de electrões pode ser posta em evidência. Pode-se considerar estas bactérias como os representantes actuais de um processo muito antigo: a redução dissimilativa (ou "respiração") dos sulfatos. Com efeito, os depósitos mais antigos de enxofre reduzido biologicamente a partir dos sulfatos datariam de dois ou três $\times 10^9$ anos (1).

As bactérias redutoras de sulfato estão presentes nas águas doces e nos sedimentos marinhos; em certas condições favoráveis para o seu desenvolvimento, produzem quantidades enormes de sulfureto de hidrogénio (H_2S) tóxico para os outros organismos vivos.

O papel ecológico e económico das bactérias redutoras de sulfato é particularmente importante. Se por um lado elas são responsáveis pela formação de depósitos de enxofre não vulcânico como os da Sicília e Texas, por outro lado são responsáveis pela corrosão anaeróbica de metais.

A corrosão associada com as bactérias redutoras de sulfato em tanques de armazenamento de petróleo tem sido um problema para a navegação, especialmente em navios que usam a água do mar para substituição da carga. A corrosão dá-se por um processo de despolarização catódica no qual as bactérias retiram hidrogênio da superfície do metal e usam os elétrons para reduzir o sulfato e formar sulfureto. Estes sulfuretos são muito acídicos e fazem com que o líquido onde se dissolvem se torne corrosivo.

Uma outra propriedade importante das bactérias redutoras de sulfato é a produção ou consumo de hidrogênio molecular (ver Fig. I.1). O hidrogênio produzido pode ser oxidado pelas bactérias metanogênicas para produzir metano por redução de CO_2 ou acetato. A formação de hidrogênio a partir da degradação de compostos orgânicos tem sido discutida várias vezes como uma possível fonte energética. Thauer (2) calculou que só 33% da energia combustível presente no substrato orgânico é conservada na forma de hidrogênio molecular, através do processo fermentativo. No entanto 85% de energia é conservada se o produto final for metano.

I.2 - METABOLISMO DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

As bactérias redutoras de sulfato podem reduzir o sulfato por oxidação de substratos orgânicos ou de hidrogênio molecular.

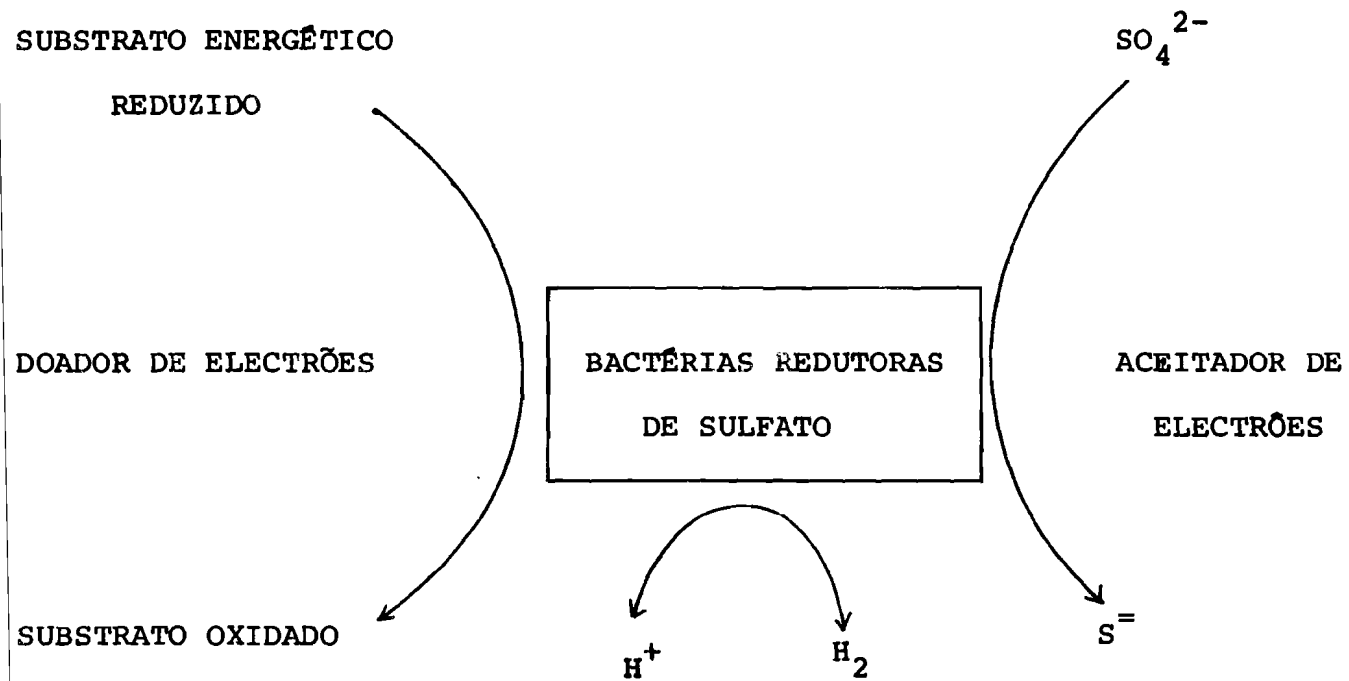


Figura I.1 - Esquema simplificado dos processos metabólicos em bactérias redutoras de sulfato.

As cadeias de transferência electrónica que permitem a realização destas reacções são complicadas e muitos dos componentes são ainda desconhecidos.

O papel biológico das proteínas de transferência electrónica justifica a quantidade de trabalho dedicado à compreensão do seu mecanismo de acção (3,4).

As proteínas de transferência electrónica pertencem ao grupo de proteínas melhor caracterizadas em termos das propriedades fisico-químicas e estruturais. Muitos dos conhecimentos sobre os diversos tipos de centros activos têm sido proporcionados pelo estudo de compostos sintéticos análogos (5,6,7).

O uso de diversas técnicas espectroscópicas que permitem uma melhor caracterização estrutural destas proteínas tem levado a desenvolver várias hipóteses e por outro lado a eliminar outros mecanismos possíveis.

Uma compreensão dos mecanismos das reacções de transferência electrónica é importante na procura de novas formas de energia (como por exemplo a produção biológica de hidrogénio a partir de resíduos agrícolas).

I.3 - OS TRANSPORTADORES DE ELECTRÕES NAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

São necessários quatro pares de electrões para reduzir o sulfato a sulfureto de hidrogénio. A redução dissimilativa do sulfato faz intervir uma ou várias cadeias de transferência de electrões e nem todos os intermediários foram ainda caracterizados.

Na verdade é já conhecida uma variedade enorme de transportadores electrónicos que têm sido purificados e caracterizados (8,9,10): sistema citocrômico (tipo c, b e d), proteínas com ferro não-hémico (ferredoxinas, rubredoxinas, hidrogenase, etc.), flavoproteínas, quinonas, proteínas complexas contendo molibdénio, cobalto, etc. Na Tabela I.1 são indicadas algumas propriedades de transportadores típicos. No entanto, a cadeia de transferência electrónica está longe de ser conhecida em detalhe, e uma das principais razões deve-se ao facto de existir uma heterogeneidade importante nas espécies de Desulfovibrio, o que permite uma grande variação do equipamento enzimático.

Para dar uma ideia da variedade de proteínas já identificadas nas várias espécies Desulfovibrio, apresenta-se na Tabela I.2 a distribuição de algumas das proteínas transportadoras de electrões mais importantes.

Em seguida descreve-se de um modo resumido algumas das suas propriedades mais relevantes.

TABELA I.1

PROTEÍNA	PESO MOLECULAR $\times 10^{-3}$	TIPO DE CENTRO	PROPRIEDADES DE RPE Valores de g	POTENCIAL REDOX (mV)	ABSORTIVIDADE MOLAR $\times 10^{-3}$ (Monômero)
Ferredoxina I	18 (3x6)	3 [4Fe, 4S]	2,07;1,94;1,92 (forma reduzida)	-455	16(405);20,6(300)
Ferredoxina II	24 (4x6)	4 [3Fe, xS]	2,02;2,00;1,97	-130	15,7(415);23,1(305)
Rubredoxina	6	1 Rd	9,4;4,3	+6	7(493);8,4(376)
Desulforedoxina	7,6(2x3,8)	2Fe (2 "Rd" distorcidos)	7,7;5,7;4,1;1,8	-35	4,6(507);7,8(370) $\frac{1}{1}$
Flavodoxina	16	1FMN			10,2(456,5)8,2(374)
Citocromo c_3 (PM 13,000)	13	4 hemos	2,96;2,85;2,30; 1,65;1,54	-315;-306;-235; -235	47(533); 540(409)
Citocromo c_3 (PM 26.000)	26	8 hemos	2,97;2,00;1,57	negativo	108(533); 1040(409)
Citocromo c_{553}	9	1 hemo	2,06;2,25;1,25	0 a -100 mV	

TABELA I.2

ESPÉCIES DE DESULFOVIBRIO	FERREDOXINA	FLAVODOXINA	RUBREDOXINA	CITOCROMO c_3 (PM 13 000)	CITOCROMO c_3 (PM 26 000)	CITOCROMO c_{553}
<u>gigas</u>	S	P	S	S	P	PNP
<u>vulgaris</u> Hildenborough	P	S	S	S	P	S
<u>vulgaris</u> Miyazaki	NE	PNP	ND	P	ND	ND
<u>desulfuricans</u> Norway 4	P	NE	P	S	NE	P
<u>desulfuricans</u> El Alghella z	PNP	P	P	S	ND	ND
<u>saalexigens</u>	PNP	P	P	S	PNP	PNP

S - sequência conhecida

NE - não encontrada

PNP - presente mas não purificado

P - purificado

ND - não descrita

I.3.1 - OS CITOCROMOS DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

Existem três famílias de citocromos c nas bactérias redutoras de sulfato do tipo Desulfovibrio; citocromo c₃, PM 26 000, citocromo c₃, PM 13 000 e citocromo c₅₅₃.

I.3.1.1 - O Citocromo c₃ (PM 13000)

O citocromo c₃ (peso molecular 13 000 Daltons) foi descoberto em 1954 por Postgate (13) e Ishimoto (14) e está presente em todas as bactérias do gênero Desulfovibrio. Foi o primeiro citocromo a ser descoberto num microorganismo anaeróbico não fotossintético. Difere do citocromo c mitocondrial pelo seu potencial de oxidação-redução muito baixo (em média à volta de -250 mV), pela sua autoxibilidade e pela presença de quatro hemos por molécula que são ligados à proteína por dois tipos de cadeia: -Cis-x-x-Cis-His- ou -Cis-X-X-X-X-Cis-His-.

As posições de coordenação axiais do ferro são feitas através de dois resíduos histidina da molécula (15,16). Os citocromos c₃ pertencem à classe de citocromos do tipo c devido à ligação covalente dos hemos à apoproteína, embora eles se aproximem aos do tipo b pela natureza dos ligandos de ferro (com excepção do citocromo b₅₆₂ de Escherichia coli que tem uma histidina e uma metionina como ligandos de ferro) (17).

É conhecida a composição de ácidos aminados de vários citocromos c_3 de várias espécies Desulfovibrio: D.vulgaris Hildenborough (18), D.gigas (19), D.salexigens British Guiana (20), D.desulfuricans El Algeila z (21), D.desulfuricans Norway (22) e D.strain 9974 (23). A comparação das estruturas primárias e as homologias de sequência permitem agrupar os citocromos c_3 numa família de proteínas homólogas (24).

O papel fisiológico do citocromo c_3 é ainda mal conhecido, parecendo que o citocromo c_3 tem um efeito estimulador nas reacções em que está implicado: redução do sulfito (25), sistema fosforoclástico (26), redução do tiosulfato (27). O doador fisiológico de electrões ao citocromo c_3 é a hidrogenase pois a hidrogenase reduzida na presença de hidrogénio gasoso reduz completamente o citocromo c_3 .

Os quatro hemos do citocromo c_3 não têm o mesmo potencial de oxidação-redução, como tem sido bem demonstrado por titulações redox feitas por RMN (15,16) e RPE (28). DerVartanian et al. (28) mostraram que os quatro hemos do citocromo c_3 de D.vulgaris Hildenborough têm potenciais de oxidação-redução variando entre -324 mV e -284 mV. Estes valores estão próximos do único valor determinado por Niki (29) para o potencial redox do citocromo c_3 de D.vulgaris Miyazaki por polarografia e voltametria ciclica ($E'_0 = -270$ mV). Por espectroscopia de RPE, o ferricitocromo c_3 de D.gigas mostra somente duas ressonâncias "low-spin" hêmicas: cada uma delas corresponde a dois hemos que são titulados com valores diferentes de potencial (30). A diferença de potencial entre os vários hemos do citocromo c_3 de D.gigas é de 80 mV. O citocromo c_3 de D.desulfuricans Norway é um citocromo c_3 completamente homólogo e a

sua estrutura foi elucidada por Raios-X (31,32). A distância entre os vários hemos varia entre 11 Å e 15 Å. Três dos hemos têm uma orientação mais ou menos paralela estando o quarto orientado perpendicularmente aos outros.

A determinação do potencial de oxidação-redução deste citocromo c₃ foi feita por RPE por Cammack (33). Os valores encontrados foram -125, -125, -305, -375 mV.

I.3.1.2 - Citocromo c₃ (PM 26 000)

O citocromo c₃ (PM 26 000) foi isolado em D.gigas, D.vulgaris e D.desulfuricans El Algeila z (34,35). Têm oito hemos por molécula e possuem um número suficiente de resíduos de cisteína para ligar estes hemos de maneira covalente. Cristalizam muito facilmente e o potencial de oxidação-redução é negativo. Hatchikian et al. (36) mostraram que o citocromo c₃ (PM 26000) de D.gigas é o transportador mais eficaz no acoplamento entre a hidrogenase e a tiosulfato-reduc_utase.

I.3.1.3 - Citocromo c₅₅₃

O citocromo c₅₅₃ foi isolado em D.vulgaris Hildenborough em 1968 por Le Gall e Bruschi-Heriaud (37). A composição de ácidos aminados (38) e a estrutura primária (39) são conhecidas. O citocromo c₅₅₃ difere do citocromo c₃ isolado do mesmo organismo pelo seu peso molecular pouco elevado (PM 9100), pela

composição de ácidos aminados, pelo espectro de absorção (existem dois picos na forma oxidada a 280 nm e a 695 nm) a presença de um único hemo por molécula e pelo potencial de oxidação-redução mais elevado (entre 0 e -100 mV), o que explica a sua redução pelo ácido ascórbico. Como nos citocromos c de tipo mitocondrial a quinta e a sexta ligações de coordenação ao ferro fazem-se pelo resíduo de histidina adjacente às cisteínas e por um resíduo de metionina. O papel fisiológico do citocromo c₅₅₃ é desconhecido. No entanto, Yagi (41) isolou um citocromo c₅₅₃ (PM 6500) de D.vulgaris Miyakazi que serve de aceitador de electrões da formiato desidrogenase isolada do mesmo organismo.

I.3.2 - TRANSPORTADORES DE ELECTRÕES NÃO-CITOCRÓMICOS

Um grande número de proteínas de oxidação-redução têm sido isoladas e caracterizadas nas diferentes espécies de bactérias redutoras de sulfato.

I.3.2.1 - A Ferredoxina

A presença de ferredoxina nas bactérias redutoras de sulfato foi primeiro posta em evidência em 1962 por Tagawa e Arnon (41). Em 1967 Akagi (25) purificou parcialmente uma ferredoxina de D.vulgaris Hildenborough, que é activa na reacção fosforoclástica do piruvato. Le Gall e Dragoni (42) purificaram a ferredoxina de D.gigas e mostraram que ela está

implicada na redução do sulfito. Mais tarde três formas oligoméricas da ferredoxina de D.gigas foram isoladas (43) e caracterizadas por RMN (44) e RPE (45). São dois trimeros (FdI e FdI') e um tetramero (FdII) da mesma unidade base de PM 6000 Daltons mas cujos potenciais redox e actividades biológicas são diferentes. Recentemente várias ferredoxinas foram isoladas de D.desulfuricans Norway (22), D.africanus (46) e D.vulgaris Hildenborough (47). Nestas espécies foram encontradas duas ferredoxinas com diferente composição em ácidos aminados.

I.3.2.2.- Flavodoxina

A flavodoxina isolada a partir de D.gigas foi purificada a primeira vez em 1967 (48). É um proteína de peso molecular igual a 15000 Daltons e intervém na redução do sulfito (49).

Mais tarde, outra flavodoxina foi isolada a partir de D.vulgaris Hildenborough (50). Em 1972, Watenpaugh e col. (51) obtiveram a primeira estrutura tridimensional da flavodoxina de D.vulgaris Hildenborough a uma resolução de 2.5 Å⁰. A sequência desta flavodoxina foi determinada em 1973 por Dubourdieu e col. (52).

Recentemente foram isoladas duas flavodoxinas a partir de D.salexigens (53) e D.desulfuricans 27774 (54).

I.3.2.3 - Rubredoxina

Nas bactérias redutoras de sulfato a rubredoxina foi primeiramente isolada em D.gigas por Le Gall e Dragoni, depois a partir de D.desulfuricans azotovorans "Berre S" por Newman e Postgate (55) e em D.vulgaris Hildenborough por Bruschi e Le Gall (56). Recentemente foram isoladas rubredoxinas de D.desulfuricans Norway (22), D.salexigens (53), D.africanus (46) e D.desulfuricans 27774 (51)

As rubredoxinas são proteínas de peso molecular 6 000 Daltons, tendo um átomo de ferro ligado a quatro resíduos de cisteína num arranjo tetraédrico. As sequências das rubredoxinas de D.vulgaris Hildenborough e D.gigas foram determinadas e comparadas com outras rubredoxinas de bactérias anaeróbicas (57,58). Em 1968, Le Gall (59) purificou uma NADH-rubredoxina-oxido-reductase. Odom e col. (60), mostraram a especificidade desta enzima para a rubredoxina de D.gigas. Vogel e col. (61) mostraram que as ferredoxinas das bactérias, as ferredoxinas das plantas e as rubredoxinas têm uma ancestralidade comum.

I.3.2.4 - Hidrogenase

Das bactérias redutoras de sulfato foi purificada uma hidrogenase solúvel a partir de D.vulgaris Hildenborough (62) e de D.gigas (63) enquanto que a partir de D.vulgaris Miyazaki (64) foi isolada uma hidrogenase membranar. Recentemente, Hatchikian e col. (65) caracterizaram a hidrogenase periplas-

mática de D.gigas: é uma proteína de peso molecular 89.500 Daltons, composta por duas subunidades diferentes e contém 12 átomos de ferro.

I.3.2.5 - Outras Proteínas

Outras proteínas foram recentemente purificadas e caracterizadas; uma proteína com molibdênio contendo centros [2Fe-2S] foi isolada a partir de D.gigas por Moura e col. (66). A desulforedoxina (cuja caracterização faz parte desta tese) foi isolada a partir de D.gigas e é uma proteína de peso molecular 7 900 Daltons, contendo dois átomos de ferro e não tendo enxofre lábil. Uma proteína contendo cobalto foi isolada a partir de D.gigas por Moura et al. (70).

A superóxido-dismutase de D.desulfuricans Norway foi isolada e caracterizada por Hatchikian (71). Uma proteína azul, que contém molibdênio foi isolada a partir de D.africanus (67) e D.salexigens (68).

I.4 - IMPORTÂNCIA DO FERRO E ENXOFRE NA CONSTITUIÇÃO DE CENTROS ACTIVOS DE PROTEÍNAS

Muitas das proteínas de transferência electrónica contêm ferro como elemento constituinte do centro activo.

O ferro pode estar inserido em vários tipos de estruturas:

hemo , 1 Fe (tipo rubredoxina) , [2Fe-2S] e [4Fe,4S] descritas na Figura I.2.

O enxofre desempenha também um papel importante em sistemas biológicos. Na Figura I.3 põe-se em evidência o papel das cisteínas em quase todas as proteínas de oxidação-redução assim como o do enxofre inorgânico (ou lábil).

O ferro é especialmente importante nos processos de vida, uma vez que está directamente envolvido no transporte e armazenamento de oxigénio (hemoglobina e mioglobina), transporte de electrões (citocromos e ferredoxinas), no metabolismo do hidrogénio pela hidrogenase, na utilização do peróxido (peroxidases) e noutras funções metabólicas vitais. Pode dizer-se, salvo raras excepções, que não existiria vida sem o ferro. Em geral, a importância do ferro nos vários processos de vida deve-se ao facto de o ferro poder existir em dois estados de oxidação, Fe(II) e Fe(III) e, ocasionalmente, como Fe(I) e Fe(IV) assim como em diferentes estados de spin (spin alto ou spin baixo, conforme a natureza dos ligandos e simetria). Os potenciais de oxidação-redução do ferro que ocorre em diferentes funções metabólicas, podem variar numa gama muito grande, dependendo do tipo dos seus ligandos e da vizinhança polipeptídica. Na tabela I.3, apresenta-se o valor dos potenciais redox para diferentes tipos de centros activos de proteínas contendo ferro.

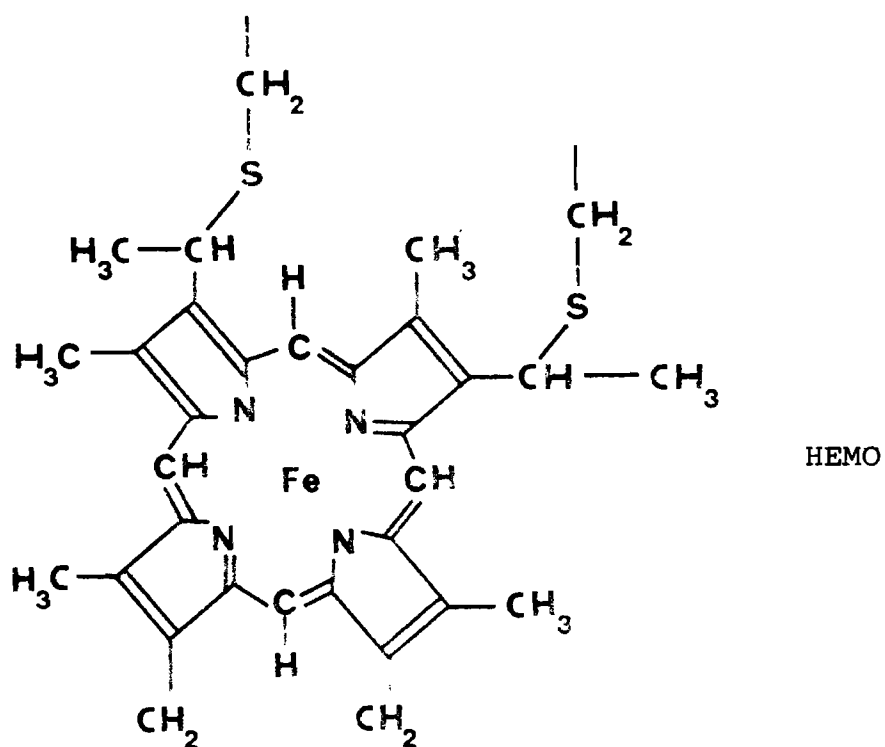
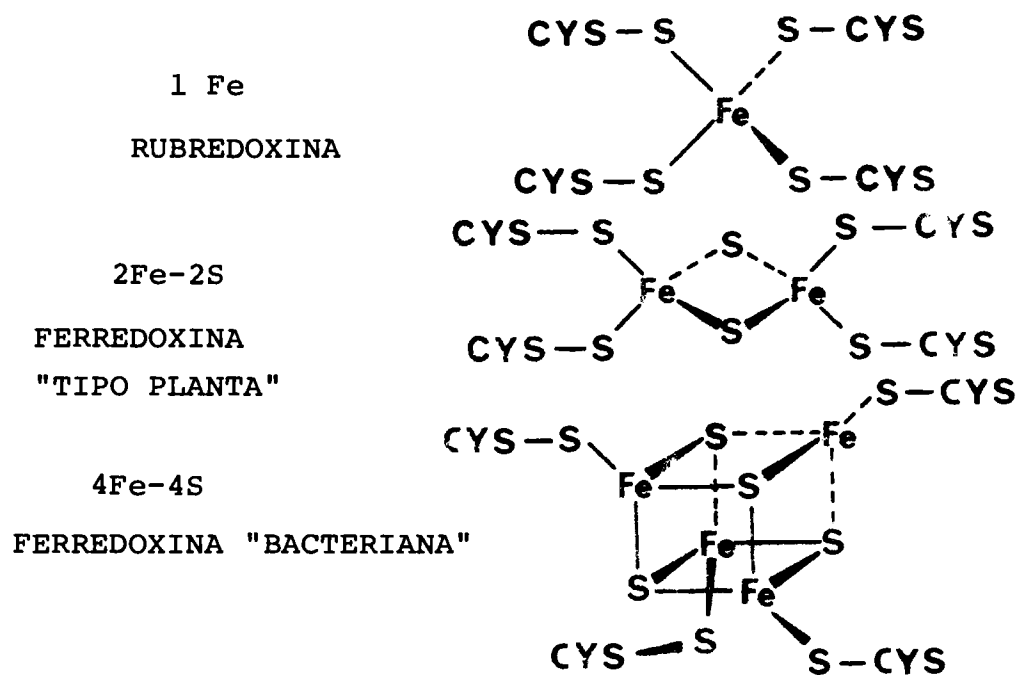


Figura I.2. Estruturas básicas em proteínas contendo ferro .

TABELA I.3

GAMA DE POTENCIAIS REDOX APRESENTADO POR
FERROPROTEÍNAS

<u>Proteína</u>	<u>E' (mV)</u>
Mioglobina	+50
Citocromo <u>b</u>	~0 (média)
Citocromo <u>c</u>	+250 (média)
Citocromo <u>c</u> ₃	-300
Citocromo <u>a</u>	+210
Citocromo <u>a</u> ₃	+390
Ferredoxinas	-400 (média)
Rubredoxinas	~0
HiPIP	+350
Peroxidase	-170

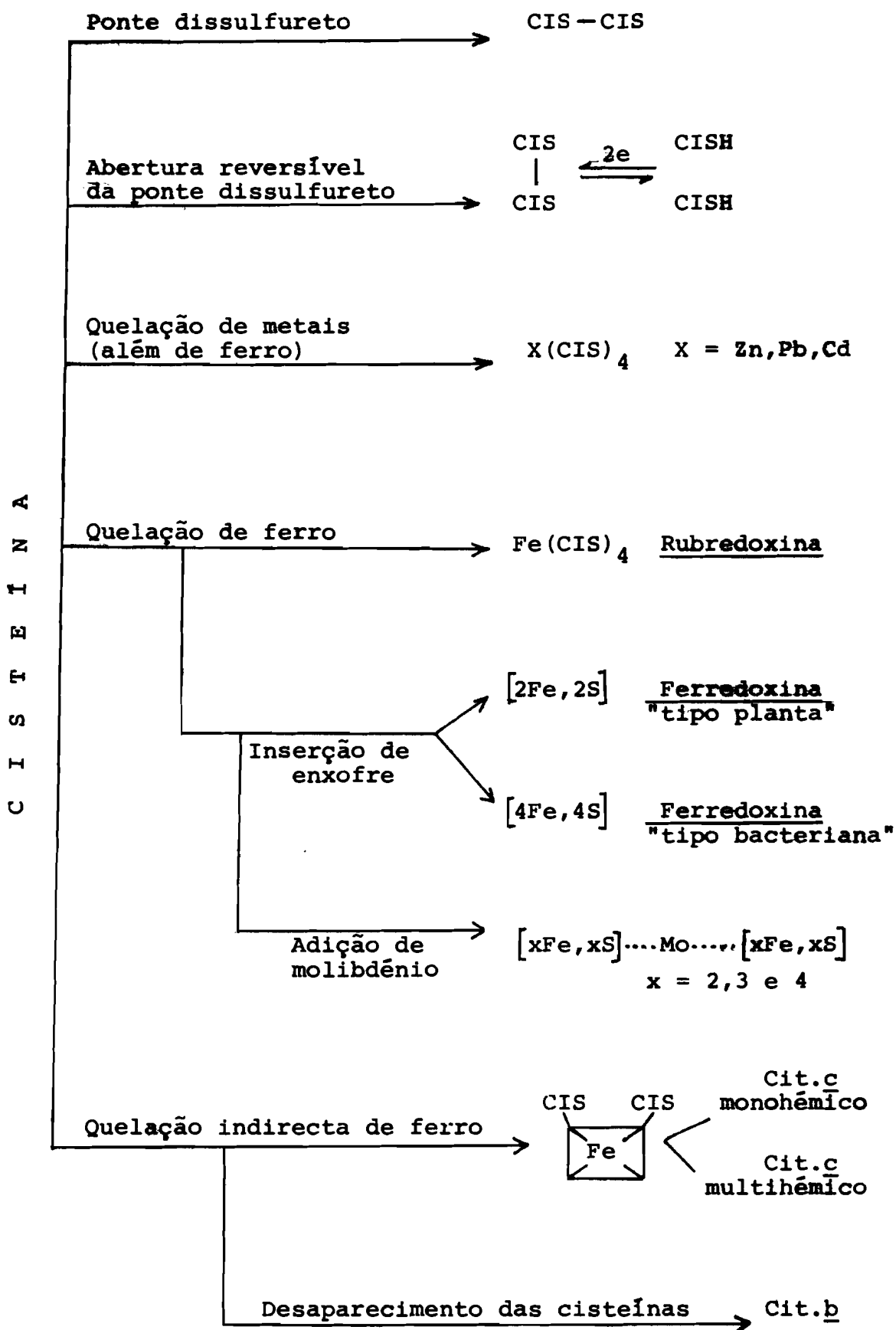


Figura I.3 .Papel da cisteína e enxofre lábil em proteínas de oxidação-redução (75).

Têm sido discutidos na literatura os factores ~~que afectam~~ o potencial redox (72,73,74). Moore e Williams sistematizaram estes factores a partir dos resultados obtidos em compostos modelo, em solventes aquosos:

- a) a existência de carga electrostática (negativa) no ligando, favorece estados de oxidação elevados; quanto maior a carga negativa, mais negativo é o valor do potencial redox;
- b) Quanto maior o poder doador electrónico do ligando (relacionado com um maior pKa) mais negativo é o potencial redox;
- c) quando aumenta o poder aceitador electrónico do ligando (por exemplo, maior carácter π) mais positivo se torna o potencial redox;
- d) a quelação preferencial de um dado estado de oxidação pode variar o potencial redox (pois de uma maneira geral a estabilização da forma reduzida diminui o potencial redox);
- e) mudanças de estado de spin e factores estereoquímicos podem ainda alterar os pontos anteriores.

Na Tabela I.4 apresenta-se a distribuição de certos iões metálicos de transição em proteínas que desempenham funções moleculares específicas. O sinal + quer dizer que o ião metálico está pelo menos presente numa proteína com função específica e - indica que não se conhece nenhuma proteína com função específica contendo esse ião metálico. Nesta tabela vê-se bem a importância do ferro na constituição de proteínas desempenhando as mais diversas funções.

TABELA I.4

PAPEL DE ALGUNS IÕES METÁLICOS EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

<u>Função molecular</u>	<u>Fe</u> (não-porfirínico)	<u>Fe</u> (porfirínico)	<u>Cu</u>	<u>Mo</u>	<u>Zn</u>
Transportadores de O ₂	+	+	+	-	-
Consumo de O ₂	+	+	+	+	-
Catálise de H ₂ O ₂	-	+	-	-	-
Transferência electrónica	+	+	+	-	-
Transferência do átomo de hidrogénio	+	+	-	-	-
Consumo de azoto	+	-	-	+	-
Consumo de hidrogénio	+	-	-	-	-
Catálise do radical super- oxido	+	-	+	-	+

Além dos centros ferro-enxofre descritos foi recentemente posta em evidência a presença de um centro contendo três ferros cujos dados estruturais preliminares foram descritos por difracção de Raios-X a 2,5 Å de resolução (11) .Um dos capítulos desta Tese caracteriza uma proteína , ferredoxina II de D.gigas , que contem este tipo de centro.

A maior parte desta Tese é dedicada ao estudo de uma nova proteína contendo dois átomos de ferro por molécula, designada por desulforedoxina.Os centros contendo ferro têm propriedades semelhantes às proteínas tipo rubredoxina, e podem representar uma variação deste tipo de centro.

I.5 - BIBLIOGRAFIA

1. Ault, M.W. e Kulp, J.L., *Geochim. Cosmochim. Acta*, 16, 201 (1959)
2. Thauer, R. Limitation of Microbial H_2 Formation via Fermentation "Microbial Energy Conversion", em *Proceeding of the Seminar held in Gottingen*, ed. Shlegel, H.G., e Barnea, J., Pergamon Press, 201-204. (1976)
3. Moore, G.R. e Williams, R.J.P., *Coord. Chem. Rev.*, 18, 125-197 (1976).
4. Wherlands, S. e Gray, H.B., in "Biological Aspects of Inorganic Chemistry" (Addison, A.W., Gullen, W.R., Dolphin, D. e James, B.R. ed.) pp. 289-367, Wiley and Sons, N.Y. (1977).
5. Holm, R.H. in "Biological Aspects of Inorganic Chemistry" (Addison, A.W., Cullen, W.R., Dolphin, D. e James, B.R., ed), p.71, Wiley and Sons, N.Y. (1977).
6. LaMar, G.N. *Pure and Applied Chemistry*, 40, 13-23 (1974).
7. Goff, H. e LaMar, G.N., *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 6599-6606 (1977).
8. Le Gall, J. e Postgate, J.R. em "Advances in Microbial Physiology" (A.H. Rose, e D.W. Tempest, eds.) vol. 10, Academic Press, Londres, p.81-133 (1973).
9. Le Gall, J., Bruschi, M., e Hatchikian, E.C., *Proc. Tenth FEBS Meeting* (P. Desnuelle e A.M. Michelson, eds.) North Holland/American Elsevier, 40, 277 (1975).
10. Le Gall, J., e Forget, N., em "Methods in Enzymology" Vol. XVI (P.D. Boyer, ed.), Academic Press (1978).
11. Stout, C.D., Gosh, D. Pattabhi, and Robbins, A. *J. Biol. Chem.* 255, 1797 (1980).
12. Bach, R. (comunicação pessoal)
13. Postgate, J.R., *Biochem. J.*, 56, 221 (1954).
14. Ishimoto, M., Koyama, J. e Nagay, Y., *J. Biochem.*, 41, 763 (1954)
15. Dobson, C.M., Hoyle, N.J., Gerald, C.F., Wright, P.E., Williams,

- R.J.P., Bruschi,M. e Le Gall,J., Nature, 249,425 (1974).
16. MacDonald,C.C., Philips,W.D., e Le Gall,J., Biochemistry, 13, 1952 (1974).
17. Xavier,A.V., Czerwinski,E.W., Bethge,P.H., e Mathews,I.S., Nature, 275, 245 (1978).
18. Ambler,R.P., Biochem.J., 109, 47 (1968).
19. Ambler,R.P., Bruschi,M. e Le Gall,J., FEBS Lett., 5,115 (1969).
20. Drucker,H., Trousil,E.B., e Campbell,L.L., Biochemistry, 9, 3395 (1970).
21. Ambler,R.P., Bruschi,M. e Le Gall,J., FEBS Lett., 18, 347(1971)
22. Bruschi,M., Hatchikian,E.C., Golovleva,L.A. e Le Gall,J., J.Bacteriol., 129, 30 (1977).
23. Fauque,G., "Reduction Physiologique du soufre colloidal chez les bacteries sulfato-reductrices", tese de Doctorat de Spécialité, Universidade de Marselha I (1979).
24. Bruschi,M., "Structure et biochimie comparée des cytochromes c chez les bactéries sulfato-reductrices", tese de Doctorat en Sciences, Université d'Aix-Marseille II, p.105 (1972).
25. Postgate,J.R., J.Gen Microbiol., 14, 545 (1956).
26. Akagi,J.M., J.Biol.Chem., 242, 2478 (1967).
27. Le Gall,J., "Etude des mecanismes de transport des electrons chez les bactéries sulfato-reductrices", tese de Doctorat en Sciences, Université d'Aix-Marseille, p.67 (1967).
28. DerVartanian,D.V., Xavier,A.V. e Le Gall,J., Biochimie,321 (1978).
29. Niki,K., Yagi,T., Inokuchi,H. e Kimura,K., J.Electrochem.Soc. 124, 1839 (1977).
30. Xavier,A.V., Moura,J.J.G., Le Gall,J., e DerVartanian,D.V., Biochimie, 61, 689 (1979).

31. Frey,M., Haser,R., Pierrot,M., Bruschi,M., e Le Gall,J.,
J.Mol.Biol., 104, 741 (1976).
32. Haser,R.,Pierrot,M., Frey,M., Payan,F., Astier,J.P., Bruschi
M., e Le Gall,J., Nature, 282, 608 (1979).
33. Cammack,R. (comunicação pessoal).
34. Bruschi,M., Le Gall,J., Hatchikian,E.C., e Dubourdieu,M.,
Bull.Soc.Franc.Physiol.Veget., 15, 381 (1969).
35. Ambler,R.P., Bruschi,M., e Le Gall,J., em "Recent Advances in
Microbiology", 10th International Congress of Microbiology
(Mexico, 1971), p.25.
36. Hatchikian,E.C., Le Gall,J., Bruschi,M., e Dubourdieu,M.,
Biochim.Biophys.Acta, 258, 701 (1972).
37. Le Gall,J., e Bruschi-Herlaud,M., in "Structure and Function
of Cytochromes", (Okumuki,K., Kamen,M.D., Seikuzu,I., eds.)
University of Tokio. Press and Univ. Park Press, p.467 (1968).
38. Bruschi,M., Le Gall,J., e Dus,K., Biochem.Biophys.Res.Commun.
38, 607 (1970).
39. Bruschi,M. e Le Gall,J., Biochim.Biophys.Acta, 271, 48 (1972).
40. Yagi,T., J.Biochem., 66, 473 (1969).
41. Tagawa,K. e Arnon,D.I., Nature, 195, 537 (1962).
42. Le Gall,J. e Dragoni,N. Biochem.Biophys.Res.Comm., 23, 145
(1966).
43. Bruschi,M., Hatchikian,E.C., Le Gall,J., Moura,J.J.G., e
Xavier,A.V., Biochim.Biophys.Acta, 449, 275 (1976).
44. Moura,J.J.G., Xavier,A.V., Bruschi,M., e Le Gall,J., Biochim.
Biophys.Acta, 459, 278 (1977).
45. Cammack,R., Rao,K.K., Hall,D.O., Moura,J.J.G., Xavier,A.V.,
Bruschi,M., Le Gall,J., Deville,A., e Gayda,J.P., Biochim.
Biophys.Acta, 490, 311 (1977).

46. Hatchikian,E.C., Jones,H.E., e Bruschi,M., Biochim.Biophys. Acta, 548, 471 (1979).
47. Moura,I., Moura, J.J.G., Santo,M.H., Xavier,A.V., Bruschi,M., Le Gall,J. (artigo em preparação).
48. Le Gall,J., e Hatchikian,E.C., C.R.Acad.Sci., 264, 2580 (1967).
49. Dubourdieu,M., Le Gall,J., e Letterier,F., C.R.Acad.Sci., 267, 1653 (1968).
50. Dubourdieu,M. e Le Gall,J., Biochem.Biophys.Res.Comm., 38, 965 (1970).
51. Watenpaugh,K.D., Sieker,L.C., Jensen,L.H , Le Gall,J. e Dubourdieu,M., Proc.Nat.Acad.Sci., 69, 3185 (1972).
52. Dubourdieu,M., Le Gall,J., e Fox,J.L., Biochem.Biophys.Res. Commun., 52, 1418 (1973).
53. Moura,I., Moura,J.J.G., Bruschi,M. e Le Gall,J., Biochim. Biophys.Acta,591 , 1 (1980).
54. Moura,I., Moura,J.J.G., Le Gall,J., (resultados não publicados)
55. Newman,D.J. e Postgate,J.R., Eur.J.Biochem., 7, 45 (1968).
56. Bruschi,M., e Le Gall,J., Biochim.Biophys.Acta,263,279 (1972).
57. Bruschi,M., Bonicel,J., Bovier-Lapierre,G., Couchoud,P., Biochem.Biophys.Res.Comm., 70, 615 (1976).
58. Bruschi,M., Bonicel,J., Bovier-Lapierre,G., Couchoud,P., Biochem.Biophys.Res.Comm., 434, 4 (1976).
59. Le Gall,J., Ann.Inst.Pasteur, 114, 109 (1968).
60. Odom,J.M., Bruschi,M., Peck,H.D.Jr. e Le Gall,J., Fed.Proc., 35, 1360 (1976).
61. Vogel,H., Bruschi,M. e Le Gall,J., J.Mol.Evol.,9,111 (1977).
62. Le Gall,J., DerVartanian,D.V., Spieker,E., Lee,J.P., e Peck,H.D.Jr., Biochim.Biophys.Acta, 234, 525 (1971).

63. Bell,G.R., Lee,J.P., e Le Gall,J., Abstracts of the Annual Meeting on Hidrogenase, 319 (1973).
64. Yagi,T., Kimura,K., Daidoji,H., Sakai,F., Tamura,S., e Inokuchi,H., J.Biochem., 79, 661 (1976).
65. Hatchikian,E.C., Bruschi,M., e Le Gall,J., Biochem.Biophys. Res.Comm., 82, 451 (1978).
66. Moura,J.J.G., Xavier,A.V., Bruschi,M., Le Gall,J., Hall,D.O. e Cammack,R., Biochem.Biophys.Res.Comm., 72, 782 (1976).
67. Hatchikian,E.C., e Bruschi,M., Biochem.Biophys.Res.Comm., 86, 725 (1979).
68. Moura,I., Moura,J.J.G., e Le Gall,J., (resultados não publicados).
69. Moura,I., Bruschi,M., Le Gall,J., Moura,J.J.G., e Xavier,A.V., Biochem.Biophys.Res.Comm., 75, 1037 (1977).
70. Moura,J.J.G., Moura,I., Bruschi,M., Le Gall,J. e Xavier,A.V., Biochem.Biophys.Res.Comm., 92 , 962 (1980).
71. Hatchikian,E.C., e Henry,Y.A., Biochimie, 59, 153 (1977).
72. Philips,C.S.G. e Williams,R.J.P., em "Inorganic Chemistry" Oxford University Press, Oxford (1966).
73. Graddon,L., em "An Introduction to Coordination Chemistry", 2nd ed., Pergamon Press, Oxford, (1968).
74. Sutin,N., in "Inorganic Biochemistry", (G.I.Eichorn,ed.) Elsevier,Amsterdam (1973).
75. Le Gall,J., Rapport d'Activité, Laboratoire de Chimie Bactérienne, CNRS (1979).

III. PARTE EXPERIMENTAL

II.1 - PURIFICAÇÃO DOS TRANSPORTADORES ELECTRÓNICOS ESTUDADOS

II.1.1 - NOTAS PRELIMINARES

Todas as etapas de purificação foram realizadas a 4°C e com tampões de pH=7,6.

Usou-se um gradiente descontínuo em vez de contínuo devido ao facto de as quantidades relativas dos diversos transportadores electrónicos variarem de um extracto para outro. É assim muito mais fácil modificar a migração das bandas das proteínas ao longo das colunas.

Durante os primeiros passos de purificação, o factor mais importante reside nos olhos do experimentador, uma vez que as proteínas a purificar têm todas elas uma cor característica. A rubredoxina e a desulforedoxina são vermelho-púrpura (1), a flavodoxina (2) é amarelo-vivo, as ferredoxinas I e I' (3) são castanhas, a ferredoxina II (3) é castanho-avermelhada, o citocromo c_3 (4) é vermelho vivo, a desulfovirdina (5) é verde, a molibdo-proteína (6) é castanho-avermelhada e a cobalto-proteína (7) é violeta.

Uma das maiores dificuldades encontradas na purificação de algumas destas proteínas a partir de extractos de Desulfovibrio spp. deve-se ao facto de haver proteínas, tais como a desulfovirdina (5), que existem em grandes quantidades e que podem mascarar espectralmente a existência de outras, cujos coeficientes de extinção molar são baixos. Por exemplo, a presença de traços de citocromo pode mascarar completamente a presença de centros ferro-enxofre, uma vez que a banda de Soret dos citocromos se encontra a 410 nm (com um $\epsilon \approx 700\ 000$) enquanto que um centro ferro-enxofre pode ter um valor de ϵ muito menor (entre 10 000 e 20 000) como é o caso da proteína de

molibdênio). Só nos últimos passos de purificação, após eliminação do citocromo, se consegue obter o espectro característico desta proteína.

É devido a este facto que só ultimamente se conseguiu por em evidência a presença da desulforedoxina (1) e da cobalto-proteína (7).

Uma revisão dos métodos gerais de purificação de proteínas nas componentes das cadeias de transferência electrónica das bactérias redutoras de sulfato foi apresentada por Le Gall e Forget (8).

II.1.2 - PREPARAÇÃO DO EXTRACTO BACTERIANO

A pasta de células é homogeneizada em tampão de Tris 0,01 M, pH=7,6, a que se adiciona DNase para diminuir a viscosidade. As bactérias são partidas pela prensa de French onde o princípio é o seguinte: a suspensão bacteriana é submetida a uma pressão que pode atingir 250Kg por cm²; depois, passa através de um orifício de pequeno diâmetro, onde a diferença de pressão faz rebentar as células. O extracto obtido é centrifugado 30 minutos a 78000 g e o sobrenadante é o extracto bruto.

II.1.3 - PURIFICAÇÃO DO CITOCROMO c₃

O citocromo c₃ (PM 13 000) de D.gigas foi purificado pelo método descrito por Le Gall e Forget (8) com algumas alterações de modo a tornar mais rápido o processo.

ETAPA 1 - Adsorção em sílica (processo em "batch")

Adicionam-se 300 ml de sílica gel ao extracto bruto. Deixa-se três horas sob agitação a 0°C. Após este tempo para-se a agitação e espera-se que a sílica decante. Retira-se o sobrenadante que é sujeito a 2ª batch de sílica de maneira semelhante ao anterior. A sílica que contém o citocromo c_3 adsorvido é lavada várias vezes com tampão Tris-HCl 0,01 M, pH=7,6 até as águas de lavagem se apresentarem limpas (livres de sulfureto de ferro).

A sílica gel contendo o citocromo c_3 é colocada num funil Buckner de 10 cm de diâmetro. O citocromo c_3 é desadsorvido da sílica com monohidrogenofosfato de potássio (1M) em cloreto de sódio (1M).

ETAPA 2 - Cromatografia em DEAE-celulose

Após diálise durante 36 horas (contra um volume de água destilada suficiente para baixar a concentração de sal a 0,01 M e após várias mudanças de água destilada) a solução contendo o citocromo c_3 é adsorvida numa coluna de DEAE 52 (40x250 mm) equilibrada com Tris-HCl 0,01M. Após um gradiente muito fino em Tris/HCl pH 7,6 (0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05 ...) recolhe-se a banda principal do citocromo c_3 (eluída entre 0,03 e 0,05). Existem bandas menores que se retêm na DEAE.

O coeficiente de pureza do citocromo c_3 já é elevado nesta etapa (2 a 2,3). O índice de pureza é definido pela razão $A_{555}^{red} - A_{570}^{red} / A_{280}^{ox}$.

ETAPA 3 - Adsorção em Hidroxiapatite

O citocromo c_3 é adsorvido numa coluna (40x100 mm) de hidroxiapatite equilibrada com Tris/HCl 0,01 M pH=7,6. Após lavagem com o mesmo tampão faz-se um gradiente em tampão de fosfato a pH=7,6 (0,01, 0,05, 0,1, 0,15 ...). O citocromo c_3 após esta etapa tem um coeficiente da ordem de 2,8 e pode considerar-se puro.

ETAPA 4 - Filtração em Sephadex G-50

Para garantir a não existência de espécies poliméricas o citocromo c_3 proveniente da etapa anterior é passado numa coluna de Sephadex G-50 (50x1000 mm) sendo usado Tris-HCl, 0,01 M como eluente.

Após esta etapa o citocromo c_3 apresenta um coeficiente da ordem de 2,9 a 3,0.

II.1.4 - PREPARAÇÃO DO EXTRACTO ACÍDICO DE D.GIGAS

Após os dois "batches" de sílica o sobrenadante é sujeito a dois "batches" de DEAE 52. Cerca de 400 ml de DEAE-52 previamente lavada e seca num funil Buckner sobre vácuo são adicionados ao sobrenadante. A mistura é agitada durante quatro horas a 0°C.

A DEAE-celulose é separada do extracto por filtração sob vácuo num funil Buckner (10 cm de diâmetro). Realiza-se segundo

"batch" no sobrenadante de maneira idêntica. A DEAE-celulose na qual ficam adsorvidas todas as proteínas acídicas é lavada várias vezes com tampão Tris-HCl 0,01 M, pH=7,6 até as águas de lavagem estarem livres de sulfureto de ferro.

As proteínas acídicas são depois desadsorvidas com Tris-HCl 1 M, pH=7,6. Este extracto contendo as proteínas acídicas é em seguida dialisado contra água destilada durante uma noite.

Após diálise, o extracto contendo as proteínas acídicas é adsorvido numa coluna de DEAE-52 (50 x 400 mm). As proteínas adsorvidas são desadsorvidas com um gradiente descontínuo de Tris-HCl, pH=7,6 (200 ml de cada uma das seguintes molaridades: 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,60 ... 1 M). Este gradiente permite a separação em cinco fracções principais:

a) até 0,15M - flavoproteínas, APS reductase (9) e uma proteína contendo molibdénio e ferro (7).

b) de 0,15 a 0,25M - desulfovirdina (sulfito-reductase) (5) e citocromo c_3 (10).

c) de 0,25 a 0,30 M - fracção contendo rubredoxina (1) desulforedoxina (1) e citocromo c_3 (10).

d) de 0,30 a 0,35 - flavodoxina (2).

e) 0,40 M ... - ferredoxinas (3).

Na figura II.1 apresenta-se o esquema geral da purificação.

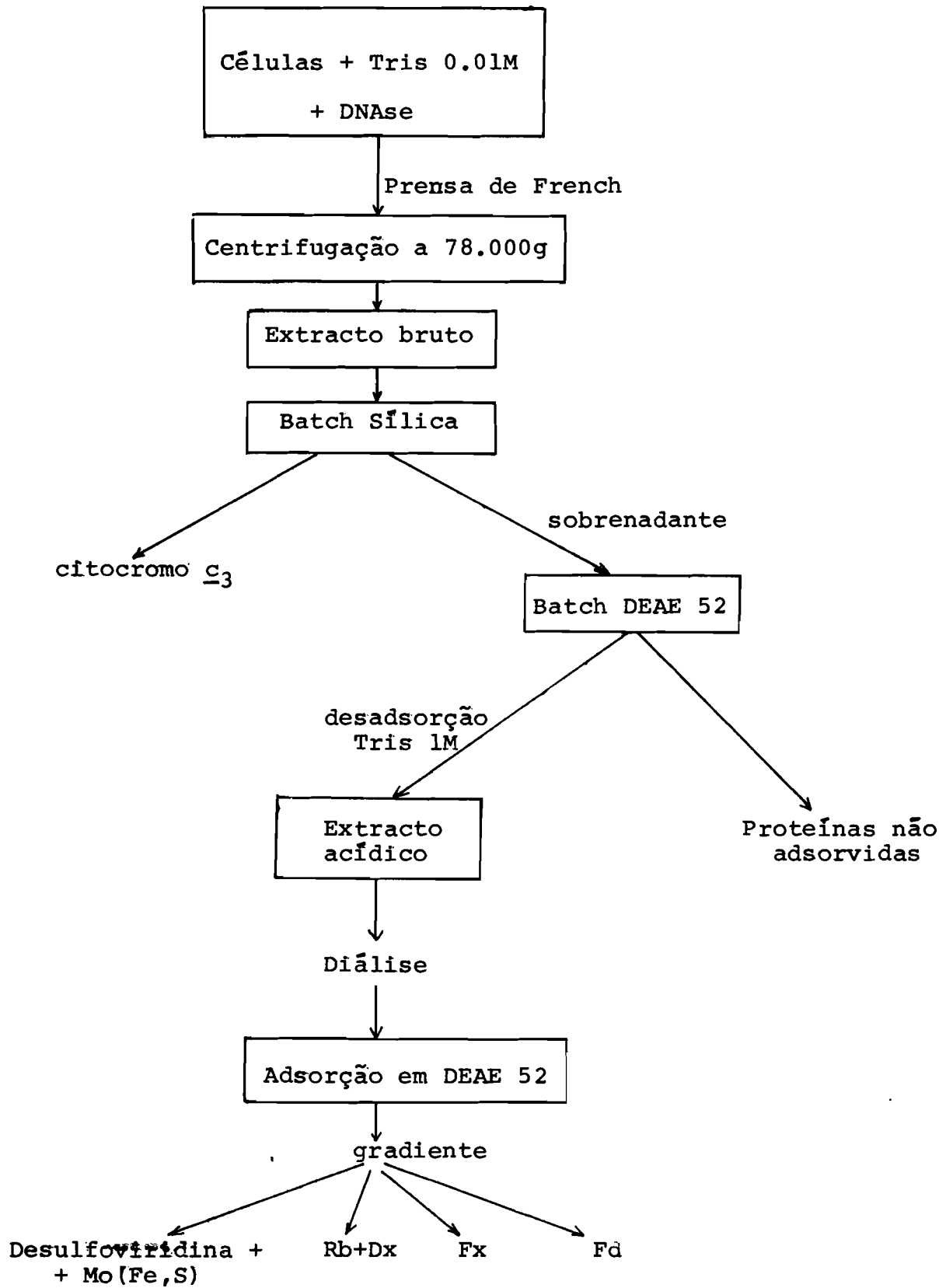


Figura II.1 - Esquema Geral de Purificação

II.1.4.1 - Etapas de Purificação Específicas

II.1.4.1.1 - Desulforedoxina

ETAPA D1 - Cromatografia em DEAE

A fracção contendo a rubredoxina e desulforedoxina foi dialisada durante a noite contra 10 l de água destilada e adsorvida numa coluna de DEAE-52 (40x350 mm). Utilizou-se um gradiente fino de NaCl, usando 200 ml de cada uma das seguintes molaridades em NaCl em Tris-HCl, 0,01 M: 0,010, 0,025, 0,075, 0,100 até 0,500

Durante a eluição entre 0,25 - 0,30 M NaCl, obteve-se uma boa separação entre a rubredoxina e a desulforedoxina que é mais acídica. Estas fracções de proteínas foram colectadas em volumes de 170 ml e 420 ml, respectivamente.

ETAPA D2 - Cromatografia em Silica

A fracção contendo desulforedoxina é adsorvida numa coluna (25 x 270 mm) de silica (Backer) equilibrada com NaCl 0,30 M. A fracção não fixada contém desulforedoxina e traços de desulfoviridina (300 ml). Traços de rubredoxina ainda presentes são separados nesta etapa, uma vez que a rubredoxina se retarda sob silica. Todo o citocromo presente é eliminado nesta etapa por adsorção na silica.

ETAPA D3- Cromatografia em hidroxiapatite

A remoção de traços de desulforedoxina é realizada por cromatografia em hidroxiapatite numa coluna (25 x 50 mm) equilibrada com 0,30 M NaCl e eluída com tampão de fosfato 0,01-0,05 M. A proteína obtida num volume de 25 ml tem uma razão $A_{278}/A_{507} = 1,41$.

ETAPA D4- Cromatografia em Sephadex G-50

A fracção concentrada de desulforedoxina é passada numa coluna de Sephadex G-50 (50x1000 mm) equilibrada com Tris/HCl 0,01 M. A proteína obtida num volume de 75 ml tem um razão $A_{278}/A_{507} = 1,23$.

II.1.4.1.2 - Rubredoxina

ETAPA R1 - Cromatografia em sílica

A fracção contendo rubredoxina proveniente da etapa D₁ da purificação da desulforedoxina foi adsorvida numa coluna (25x270 mm) de sílica (Backer) equilibrada com NaCl 0,30 M. A rubredoxina fixa-se e é desadsorvida quando se faz um gradiente em NaCl decrescente. Neste passo todo o citocromo é fixado na sílica.

ETAPA R2 - Cromatografia em Hidroxiapatite

A rubredoxina é dialisada e adsorvida numa coluna de hidroxiapatite (25x50 mm) equilibrada com tampão Tris/HCl 0,01 M pH=7,6. Após lavagem com o mesmo tampão a rubredoxina é eluída com tampão de fosfato 0,01-0,05 M. A proteína obtida num volume de 20 ml tem uma razão de $A_{278}/A_{497} = 2,35$.

II.1.4.1.3 - Ferredoxina

ETAPA F1 - Cromatografia em DEAE-52

A fracção contendo ferredoxina (fracção e) é diluída duas vezes e adsorvida numa coluna de DEAE-52 (40x350 mm). Utiliza-se um gradiente fino de NaCl usando 200ml de cada uma das seguintes molaridades em NaCl em Tris/HCl 0,01 M: 0,150, 0,200, 0,225, 0,250, 0,300, 0,325, 0,350, 0,375 ... até 0,500. Este gradiente permite eliminar parte do contaminante que absorve a 260 nm.

As fracções com menos contaminante são concentradas numa coluna pequena de DEAE-52 e a ferredoxina é eluída com Tris/HCl, 0,7 M, pH=7,6.

ETAPA F2 - Cromatografia em Sephadex G-50

A fracção concentrada de ferredoxina é passada numa coluna de Sephadex G-50 (50x1000mm) equilibrada com Tris/HCl 0,01 M. Formam-se duas bandas correspondentes à FdII (peso molecular

mais elevado) e FdI + FdI'. As bandas são concentradas em DEAE-52 e desadsorvidas com tampão Tris-HCl 0,5 M, pH=7,6

ETAPA F3 - Cromatografia em DEAE - Sephadex A-50

As duas fracções de ferredoxina são adsorvidas em duas colunas de DEAE Sephadex A-50 (40x300 mm) equilibradas com Tris/HCl usando 300 ml de cada uma das seguintes molaridades: 0,450, 0,475, 0,500, 0,525, 0,550, 0,600. Na coluna onde se adsorve a FdI+FdI' formam-se quatro bandas. A primeira corresponde à FdI', a segunda à FdI, a terceira foi designada por FdII' e a quarta corresponde à FdII. Na coluna correspondente à FdII formam-se algumas bandas menores e no topo mais ácido a FdII.

ETAPA F4 - Cromatografia em hidroxiapatite

As várias ferredoxinas provenientes da etapa anterior contêm ainda muito contaminante a 260 nm. Este contaminante é eliminado pela passagem por uma coluna de hidroxiapatite. As ferredoxinas provenientes da etapa anterior são concentradas em DEAE-52 e desadsorvidas com NaCl 0,5 M, em Tris/HCl 0,01 M, pH=7,6 e passadas em colunas de hidroxiapatite equilibradas com a mesma força iônica. Em geral as ferredoxinas não se adsorvem mas o contaminante fica adsorvido. O gradiente usado nestas colunas quando a ferredoxina se adsorve é de fosfato de potássio, pH=7,6 (0,001, 0,005, 0,010, 0,015 M ...).

A ferredoxina I tem uma razão $A_{405}/A_{300}=0,77$ e a ferredoxina II tem uma razão $A_{415}/A_{305}=0,68$.

II.2 - ANÁLISE DOS CONSTITUINTES DAS PROTEÍNAS EM ESTUDO

II.2.1 - FERRO E ENXOFRE

O ferro foi determinado por absorção atômica, usando um espectrofotômetro modelo SP1900 (Pye Unicam Ltd., Cambridge, UK) e por espectrometria, usando o método da 0-fenantrolina (11,12) ou o método da 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) descrito por Fisher e Price (13). Ambos os métodos dão os mesmos resultados.

O enxofre inorgânico foi determinado pelo método descrito por Fogo e Popowsky (14).

II.2.2 - COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS AMINADOS

As análises de ácidos aminados foram feitas num analisador de ácidos aminados Beckman Multichrom e num LKB 3201.

As amostras de proteínas foram hidrolizadas em 200 µl de HCl 6M a 110°C durante 18 horas (15) em tubos selados onde previamente se tinha feito o vácuo. Os valores de treonina, serina, e tirosina foram corrigidos depois de extrapolação ao tempo zero de hidrólise. A cisteína e a metionina foram analisadas depois de oxidação perfórmica com o ácido cisteico e metionina sulfona (16). O triptofano foi determinado pelo método colorimétrico de Spies e Chambers (17).

II.2.3 - PONTO ISOELECTRICO

O ponto isoelectrico foi determinado por focalização electroforética na presença de amfolinas LKB (gradiente de pH entre 3 e 10) num aparelho LKB Multiphor (18).

II.2.4 - PESO MOLECULAR

O peso molecular foi determinado por filtração em gel numa coluna de Sephadex G-50 pelo método de Whitaker (19) usando os seguintes padrões: quimotripsinogénio A (PM 24 000), citocromo c (PM 12 500), citocromo c₅₅₃ de D.vulgaris (PM 9 100) e rubredoxina de D.vulgaris (PM 6.000).

II.2.5 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EM PROTEÍNA

As concentração em proteína foram determinadas por análise de ácidos aminados e baseadas no peso molecular determinado. Como base de cálculo escolheram-se resíduos glutâmico, aspártico, alanina e glicina, por serem estáveis durante a hidrólise em meio ácido, determinando-se assim um valor médio para a concentração em proteína.

II.3 - TÉCNICAS DE ANÁLISE DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DE UMA PROTEÍNA

II.3.1 - IDENTIFICAÇÃO DOS RESÍDUOS C-TERMINAL

II.3.1.1 - Hidrazinólise. Método de Akabori

Para identificar o resíduo C-terminal foi utilizado o método de hidrazinólise, proposto por Akabori et al. (20) e modificado por Niu e Fraenkel-Conrat (21).

Aquecendo uma proteína com hidrazina anidra todos os ácidos aminados são transformados em hidrazidos menos o ácido aminado C-terminal, que fica no estado de ácido aminado livre.

A proteína (0,5 μ moles) é introduzida num tubo de hidrólise e seca na estufa. Adicionam-se 0,2 ml de hidrazina seca recentemente destilada. O tubo é selado sob azoto e incubado durante 8 horas a 100°C. O conteúdo dos tubos é evaporado sob vázio. O resíduo seco é dissolvido em 1 ml de água e os hidrazidos presentes são então precipitados por 0,2 ml de benzaldeído. A mistura é agitada durante 2 horas e depois centrifugada. O precipitado é lavado duas vezes com 0,2 ml de água. Os sobrenadantes contêm os ácidos aminados e juntam-se, sendo depois lavados com éter para eliminar todos os traços de benzaldeído. Após evaporação a seco, os ácidos aminados são caracterizados num analisador de ácidos aminados.

II.3.1.2 - Carboxipeptidase

A carboxipeptidase A degrada sequencialmente uma cadeia peptídica em que o ácido aminado C-terminal contém um resíduo aromático ou um resíduo de cadeia alifática longa. Também a glicina e os ácidos aminados acídicos são degradados pela carboxipeptidase A, embora mais lentamente.

A carboxipeptidase B tem uma especificidade mais pequena, ataca rapidamente a lisina e a arginina, mas pode em alguns casos retirar ácidos aminados neutros.

As condições experimentais são as seguintes:

Utilizam-se 10 µg de carboxipeptidase A para 0,02 µmoles de amostra (relação enzima/substrato 1/70). A hidrólise é feita por incubação a 37°C. Alíquotas do hidrolisado são retiradas em função do tempo. Estas fracções são secas e dissolvidas em 1 ml de tampão de citrato a pH=2,2 e caracterizadas por um analisador de ácidos aminados.

Em alguns casos podem-se identificar por electroforese os ácidos aminados libertados pela carboxipeptidase. O peptídeo residual é separado dos ácidos aminados por electroforese em papel Whatman nº 1 durante 1 hora (60 V/cm). Esta separação faz-se a pH=6,5, se o peptídeo inicial está electricamente carregado a este pH, e a pH=3,5 se o peptídeo inicial é electricamente neutro a pH=6,5.

Depois da electroforese, a região do papel contendo os ácidos libertados não é relevada mas cosida com uma máquina de costura a uma outra folha de papel. Os ácidos aminados são então separados e identificados em relação a ácidos aminados testemunhas por electroforese a pH=2,0 (120 volts/cm durante 20 min.). O papel é revelado por uma mistura de ninidrina/colidina (22,23).

II.3.2 - HIDRÓLISE SELECTIVA DAS CADEIAS POLIPEPTÍDICAS

II.3.2.1 - Corte químico das ligações peptídicas pelo brometo de cianogênio

O brometo de cianogênio é capaz de produzir a ruptura de ligações tioéter, no caso de proteínas. Gross e Witkop (24) mostraram que o brometo de cianogênio reage com a metionina dando origem a uma quebra da ligação peptídica. O resíduo da metionina é convertido em homoserina (lactona) ficando na extremidade carboxílica do fragmento peptídico.

A proteína é dissolvida em ácido fórmico a 50% e tratada com um peso igual de brometo de cianogênio durante 20 horas a 20°C. O produto da reacção é diluído duas vezes com água e liofilizado. Os peptídeos são purificados por filtração em gel em Sephadex G-25 com ácido fórmico a 10%. Completa-se depois a purificação por electroforese de alta voltagem em papel.

II.3.2.2 - Hidrólise enzimática

Certas enzimas hidrolisam unicamente as ligações peptídicas formadas por ácidos aminados específicos, o que permite obter peptídeos com um bom rendimento.

As condições exactas de digestão dependem da enzima empregue mas de maneira geral é importante controlar os seguintes factores: pH, temperatura, relação enzima/substrato e tempo de incubação.

As condições óptimas para uma digestão completa devem ser determinadas para cada proteína. Fazem-se ensaios sobre pequenas quantidades de proteína e o hidrolisado é examinado pela técnica bidimensional da impressão digital, que dá informações úteis com respeito ao número de peptídeos ácidos, básicos e neutros, assim como a complexidade de cada grupo de peptídeos.

II.3.2.2.1 - Tripsina

A tripsina corta a ligação entre o resíduo carboxílico de um ácido aminado básico e o resíduo aminado de um outro ácido aminado.

A ruptura é mais lenta quando o resíduo básico está adjacente a um resíduo ácido ou a uma cisteína. Por outro lado, a ligação não é cortada quando o resíduo básico está adjacente a uma prolina ou quando o grupo ϵ -NH₂ da lisina está bloqueado.

A proteína é dissolvida em acetado de amônio 0,2 M, pH=8,5. Adiciona-se uma solução de enzima (10 mg/ml) preparada na altura. A razão de enzima/substrato é de 1:50. A digestão é feita a 27°C durante três horas. A reacção é parada por liofilização.

II.3.2.2.2 - Peptidase isolada de *Staphylococcus aureus* ----- (oferta do Dr.R.P.Ambler)

A peptidase de *Staphylococcus aureus* corta a ligação entre o grupo carboxílico do ácido glutâmico e o grupo amino de um

outro ácido aminado (25).

A hidrólise é feita de maneira semelhante à da tripsina e a reacção é parada por liofilização.

Outros enzimas proteolíticos, como por exemplo a quimotripsina, subtilisina, termolisina, etc., não foram usados na determinação da sequência da desulforedoxina de D.gigas.

II.3.3 - PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

A electroforese de alta voltagem em papel é uma técnica frutuosa e rápida que pode ser utilizada para a separação de peptídeos e para a caracterização de ácidos aminados.

Os peptídeos foram purificados por electroforese de alta voltagem em papel usando um aparelho de electroforese de alta voltagem Gilson a pH=1,9, 3,5 e 6,5. Usaram-se os seguintes sistemas de tampão: piridina/ácido acético/água (25:1:225, em volume) pH=6,5; piridina/ácido acético/água (1:10:89) pH=3,5; ácido fórmico/ácido acético/água (1:4:45, em volume) pH=1,9.

As tinas do tipo "Michl" (26) são cheias de solvente orgânico "Whith Spirit 100 ESSO" ou Varsol.

A voltagem usada é de 60V/cm e a duração da separação varia de 20 min a 4 horas.

Para separar pequenas quantidades de peptídeos utiliza-se papel Whatman nº 1 e 0,02 a 0,1 µmole de peptídeo por cm de depósito. Para maiores quantidades, escolhe-se papel Whatman nº 3 MM e 0,1 a 0,5 µmoles/cm de depósito.

Os peptídeos são depositados no papel com a ajuda de uma pipeta capilar de maneira a ter 1 mg de enzima digerido por cm de comprimento.

Prepara-se a folha fazendo dois depósitos de 1 cm e um outro de vários cm que serve para eluir os peptídeos depois da purificação. Para localizar a posição dos peptídeos ou grupo de peptídeos nas outras bandas, uma das bandas de 1 cm é cortada depois da electroforese e revelada pela ninidrina a 0,2%. As bandas correspondentes a cada grupo de peptídeos localizado são cortadas e cosidas sobre uma outra folha de papel para serem posteriormente purificadas.

II.3.3.1 - Oxidação pelo Ácido Perfórmico

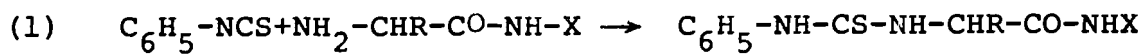
Alguns peptídeos foram oxidados no papel pelos vapores do ácido perfórmico (ácido fórmico /30% H_2O_2 (95:5, V/V)) durante 1,5 horas num excicador sob vácuo. Deste modo, os resíduos de cisteína são transformados em ácido cisteico, o que facilita a sua identificação posterior.

II.3.4 - DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE ÁCIDOS AMINADOS

DEGRADAÇÃO DE EDMAN

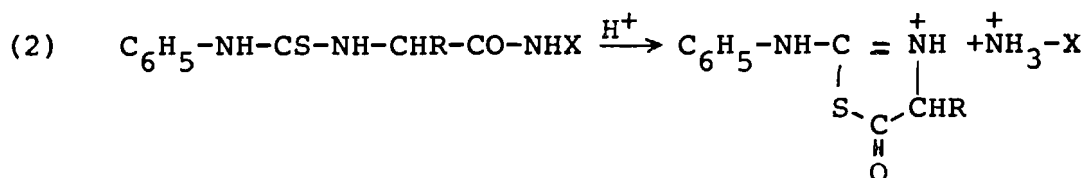
II.3.4.1 - Mecanismo de Degradação pelo Isotiocianato

A degradação de uma proteína ou de um peptídeo utilizando o isotiocianato foi descrita há uns trinta anos por Edman (27, 28). Desde então esta técnica não deixou de se desenvolver e de se aperfeiçoar, tendo sido automatizada. O mecanismo da reacção é o seguinte:



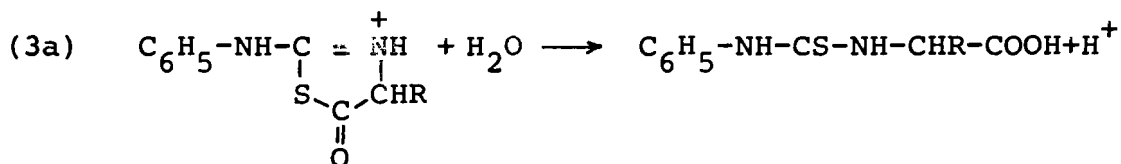
Derivado feniltiocarbamil (PTC)

Reacção de condensação

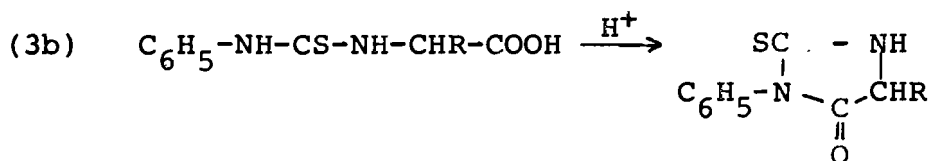


5-tiazolinona

Reacção de clivagem



Conversão



Feniltioidantoína

PTH ácido aminado

A reacção (1) é a formação do derivado feniltiocarbamil do peptídeo por condensação do grupo aminado α livre com o fenil isotiocianato.

A segunda reacção é a clivagem do peptídeo PTC ao nível da ligação peptídica perto do grupo PTC, por um ácido forte (ácido trifluoracético) que dá origem à formação de um derivado

2-anilino-5-tiazolinona e de um peptídeo, um resíduo mais curto. Este peptídeo tendo de novo um grupo α -amino livre pode ser sujeito a um novo ciclo de degradação.

O derivado tiazolinona libertado podia em princípio ser identificado, mas como é instável é convertido numa forma estável, a 3-fenil-2-tioidantoína e depois identificado. Esta reação é feita em meio ácido e aquoso.

II.3.4.2 - Degradação de Edman em Fase Líquida

As determinações das sequências foram feitas num sequenciador de proteínas Socosi (p.s. 100). Adicionou-se apocitocromo de coração de cavalo (Sigma) como proteína protectora durante a reacção da proteína no vaso reaccional (29). Usou-se o tampão DMBA (N,N,dimetilbenzilamina) em vez de quadrol, como é costume usar-se para proteínas de peso molecular pequeno.

A determinação quantitativa dos derivados PTH (fenil tioidantoína) foi feita em relação às quantidades conhecidas dos padrões apropriados, num cromatógrafo em fase gasosa (cromatógrafo em fase gasosa Beckman GC45, com SP400 como fase estacionária, segundo o método de Pisano et al. (30)). Os derivados PTH sililados foram também analisados por cromatografia em fase gasosa. Identificaram-se também os derivados PTH por cromatografia em camada fina em gel de sílica, contendo um indicador fluorescente no ultravioleta (sílica gel GF254, Merck) pelo método de Edman (30,31), particularmente para a identificação dos resíduos Glu/Gln e Asp/Asn (32). Em algumas ocasiões, os derivados PTH foram caracterizados por análise de ácidos aminados

depois da conversão ao ácido aminado correspondente por hidrólise com ácido clorídrico (33) ou iodídrico (34) para os resíduos serina.

II.3.4.3 - Degradação de Edman em Fase Sólida

A degradação foi feita utilizando o método de Laursen (35). Neste método a proteína ou o peptídeo é ligada ao suporte (amino ethyl propyl glass) quer através do grupo carboxílico C-terminal, usando carbodiimida, quer através de grupos funcionais laterais, usando p-fenileno diisotiocianato (DIIC) para fazer ligações com grupos NH_2 .

II.4 - RECONSTITUIÇÃO DA DESULFOREDOXINA

O enriquecimento em ^{57}Fe (90% em ^{57}Fe) foi conseguido do seguinte modo:

Preparação da apoproteína - A desulforedoxina foi precipitada a 4°C com ácido tricloroacético (5% de concentração final) na presença de mercaptoetanol 0,5 M. O precipitado incolor foi recolhido por centrifugação e foi dissolvido em Tris-base 0,5 M contendo mercaptoetanol 0,06 M, como tem sido descrito por Lode e Coon (36).

Preparação da desulforedoxina reconstituída - A apoproteína numa concentração de 5mg/ml em Tris-base 0,5 M contendo mercaptoetanol 0,06 M (solução incolor e transparente) foi

incubada sob argon à temperatura de 25°C. Após trinta minutos adicionou-se uma solução aquosa de ^{57}Fe numa concentração molar igual a duas vezes a concentração molar em apoproteína. Deixou-se esta mistura ligeiramente amarela durante 10 minutos sob argon. Após exposição ao ar, a solução tornou-se rapidamente vermelha escura. Usou-se uma coluna de Sephadex G-25 (1x25 cm) equilibrada com um tampão de Tris-HCl 0,01 M, pH=7,6 para dessalinizar. A desulforedoxina foi eluída da coluna como uma banda vermelha. A esta banda principal seguia-se uma banda mais pequena rosada, que continha um complexo de ferro-tiol formado pelo excesso de reagentes de peso molecular mais pequeno.

A percentagem de reconstituição é de cerca de 80% e o espectro de U.V e visível da proteína reconstituída é idêntico ao da proteína nativa.

II.5 - REACÇÃO DA DESULFOREDOXINA NATIVA COM ÁCIDO IODOACÉTICO

Para estabelecer a ausência de tióis livres, desnaturaram-se 200 nmoles de proteína nativa (800 nmoles de cisteínas) em ureia 7M sob azoto. Seguiu-se a absorvância a 507 nm durante 30 minutos. Durante esse tempo não houve variação da absorvância o que indica que o centro de ferro se manteve intacto. Ao fim deste tempo, adicionaram-se 30 µl de ácido ^3H -iodoacético (1 mCi/800 µl; 82 mCi /nmole; obtido de Amersham/Searle) e deixou-se reagir durante 10 minutos. Parou-se a reacção pela adição de mercaptoetanol (concentração final 150 mM) e passou-se

a mistura reaccional numa coluna de Sephadex G-25 (30x200 mm) equilibrada com tampão de acetato de amônio 10 mM, pH=8,5. Alíquotas da fracção de proteína e do solvente foram contadas num contador de cintilação para verificar a incorporação. Só se encontraram 0,3% das oito cisteínas marcadas por dímero.

Para verificar que a proteína não continha cisteínas livres a experiência foi repetida em condições muito mais drásticas. Usou-se uma concentração de ácido iodoacético 25 mM e a absorvância a 507 nm diminuiu 15% ao fim de dez minutos. Adicionou-se mercaptoetanol, para parar a reacção. Retirou-se o ferro baixando o pH a 2 na presença de EDTA 10 mM. Passou-se a solução numa coluna de Sephadex G-25 (30x200 mm) equilibrada com tampão de acetato de amônio 10 mM, pH=8,5. O rendimento da carboximetilação foi determinado por análise de ácidos aminados, depois da hidrólise, como descrito por Moore e Stein (15). A análise mostrou que 40% de um resíduo por monômero ou 10% de todas as cisteínas foram carboximetiladas.

II.6 - PESQUISA DE PONTES DISSULFURETO NA DESULFOREDOXINA

O número de cisteínas possivelmente envolvidas em pontes dissulfureto foi determinado por carboximetilação da apoproteína seguida por redução exaustiva e carboximetilação com ácido iodoacético marcado com ^3H .

O ferro foi removido a 200 nmoles (monômero) de desulfo-redoxina baixando o pH com ácido clorídrico até 2, na presença de EDTA 10 mM. Depois de a proteína ter perdido toda a cor

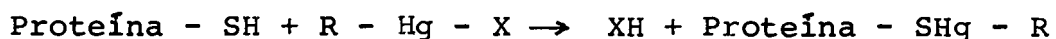
adicionou-se ácido iodoacético (concentração final 25 mM) e aumentou-se o pH com Tris sólido (base) até pH=8. Parou-se a reação ao fim de dez minutos com a adição de mercaptoetanol (concentração final 0,15 M). A reação foi realizada sob azoto e após a adição do ácido iodoacético na ausência de luz. A mistura reaccional foi passada numa coluna de Sephadex G-25 (30x200 mm) equilibrada com acetato de amônio pH=8,5. A fracção contendo a proteína foi liofilizada e dissolvida em 0,5 ml de uma solução 1 M Tris-HCl, pH=8, 6 M guanidina e 10 mM EDTA (37). Desarejou-se a solução sob argon. Para reduzir alguma ponte dissulfureto eventualmente existente, adicionou-se um excesso de 10 vezes de ditiotreitól e manteve-se a mistura reaccional durante quatro horas a 50°C para a desnaturar. Após este tempo adicionaram-se, na ausência de luz, 100 µl de ácido ³H-iodoacético (1mCi/100 µl e 82 mCi/mmoles) e 1,95 mg de ácido iodoacético não marcado. Após 30 minutos parou-se a reação pela adição de mercaptoetanol. Passou-se a mistura por uma coluna de Sephadex G-25 e as fracções contendo a proteína e o pico do solvente foram contadas num contador de cintilação. A incorporação de radioactividade corresponde a 30% do valor esperado se houvesse uma ponte dissulfureto. Por análise de ácidos aminados obtiveram-se 3,6 cisteínas carboximetiladas (ou seja 90%).

Para se ter a certeza se o valor de 30% de marcação de um resíduo era devido a uma ponte de dissulfureto específica ou a ligações aleatórias quer na apoproteína quer provenientes de limitações do método, repetiu-se a experiência com as seguintes modificações: usou-se 6 M-guanidina-HCl na primeira carboximetilação para permitir uma melhor desnaturação e ácido [¹⁴C] iodoacético (0,72 mCi/mmole, obtido de Amersham/Searle) para a

redução exaustiva, que foi seguida por uma carboximetilação, para evitar a possibilidade de permuta com o solvente. A proteína foi sequenciada e alíquotas de cada resíduo foram contados num cintilador. As actividades específicas dos quatro resíduos de cisteína foram 145, 185, 205 e 163 cpm/nmole, correspondendo no total à actividade encontrada por monômero. Portanto, a marcação encontrada é aleatória e não corresponde à existência de uma ponte dissulfureto.

II.7 - TITULAÇÃO DOS GRUPOS SULFIDRILLO - REACÇÃO COM REAGENTES ORGÂNICOS MERCURIAIS

O p-cloromercuribenzoato (PCMB) e o p-hidroximercuribenzoato (PHMB) reagem com os grupos SH formando um mercaptidico mercurial conforme a reacção



As condições experimentais da titulação do grupo SH pelo PCMB foram descritas por Boyer (38). O PCMB reage na razão 2:1 com enxofre inorgânico, e 1:1 com os grupos sulfidrillo. Caso haja uma ponte dissulfureto o PCMB não reage a não ser em condições redutoras para as quais a ponte dissulfureto é quebrada.

Fizeram-se várias soluções em que se manteve constante a concentração de PCMB ($5,13 \times 10^{-5}$ mmoles) em tampão de fosfato (0,05 M, pH=7,0) e se foi aumentando a concentração de proteína. Calculou-se a concentração máxima de proteína de modo a que todo o PCMB reaja. Espera-se 2 horas e lê-se no espectrômetro a 255 nm, comprimento de onda ao qual o mercaptidico mercurial

tem um máximo de absorção (desconta-se a absorvância da proteína nesta zona que é mínima). Traça-se o gráfico da densidade óptica em função da concentração de proteína. Os pontos experimentais distribuem-se por duas rectas. O ponto de intersecção entre as duas rectas corresponde ao máximo de absorção e permite determinar o número total de grupos sulfidriilo que reagiram com a quantidade de PCMB introduzido.

II.8 - ESPECTROS ÓPTICOS (VISÍVEL, ULTRA-VIOLETA)

Os espectros ópticos (visível e ultra-violeta) foram obtidos num Cary 14 (Varian Associated, Palo Alto, California) ou num Beckman, modelo 35.

Coeficientes de extinção molar

Os coeficientes de extinção molar foram calculados a partir da densidade óptica de soluções da proteína cuja concentração foi determinada conforme anteriormente descrito.

II.9 - ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR MAGNÉTICO

Os espectros de dicroísmo circular magnético foram traçados com um espectrômetro de dicroísmo circular Cary 61, adaptado com um selenóide superconductor capaz de gerar um campo magnético de 5,1 T. As amostras usadas para traçar os espectros a baixa

temperatura foram saturadas com sucrose e colocadas em células especialmente construídas com um percurso óptico de 0,8 mm e rapidamente congeladas abaixo de 100K num crióstato semelhante ao construído por Briat (39). A temperatura da amostra foi medida por um termopar Au/Fe e variada controlando a velocidade do fluxo de hélio gasoso.

Os resultados são apresentados em termos de $\Delta\epsilon/\mu_B B$ em função do comprimento de onda. $\Delta\epsilon$ ($l \text{ mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = $\epsilon_L - \epsilon_R$, onde ϵ_L e ϵ_R são os coeficientes de extinção molar para a luz polarizada circularmente, respectivamente para a esquerda e para a direita. B é o campo magnético (T). Os espectros de dicroísmo circular magnético foram realizados no Laboratório do Prof. A.J. Thomson, na School of Chemical Sciences, Universidade de East Anglia.

II.10 - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os estudos de RMN do próton foram realizados num espectrômetro Bruker 270 MHz, equipado com um computador Nicoleta 1080. Quando necessário, o pico do solvente foi suprimido, através da aplicação à amostra de uma segunda frequência de irradiação f_2 , em adição à frequência de observação f_1 . A frequência f_2 foi escolhida de modo a coincidir com a frequência de ressonância do pico do solvente e aplicada continuamente durante cerca de 1 segundo, sendo suprimida 40 μ segundos antes do pulso de frequência f_1 (40,41).

Valores positivos de desvio químico correspondem a desvios para campo baixo referidos ao DTSS (ácido propiônico 2,2,3,3-tetradeutero-3-(trimetilsilil) sal sódico).

A temperatura da amostra é controlada a $\pm 1^\circ\text{C}$, tendo sido realizada uma calibração prévia do aparelho, através do desvio

químico das ressonâncias do metanol e etilenoglicol (42).

II.10.1 - MEDIDAS DE SUSCEPTIBILIDADE MAGNÉTICA

Dickinson (43) mostrou que o desvio do campo induzido num meio diamagnético é dado por:

$$\frac{\Delta H}{H_0} = \left(\frac{4\pi}{3} - \alpha \right) \Delta K$$

onde α é o factor de diamagnetização (relacionado com a simetria da amostra) que tem em conta a orientação relativa do eixo principal de simetria do tubo contendo a amostra e o campo polarizante, H_0 . Os valores de α para as várias geometrias postuladas estão indicados na Tabela II.1 e ΔK mede em Hz a mudança na susceptibilidade volumétrica causada pela introdução do soluto. A equação pode ser descrita na forma (44,45,46):

$$\chi = - \frac{\Delta f}{\left(\frac{4\pi}{3} - \alpha \right) f_m} + \chi_0 + \frac{\chi_0 (d_0 - d_s)}{m}$$

χ - susceptibilidade magnética

f - frequência de ressonância do meio

Δf - mudança de frequência observada por introdução do soluto paramagnético

χ_0 - susceptibilidade mássica do solvente

d_0 e d_s - densidade, respectivamente do solvente e da solução

m - concentração mássica da amostra.

O método usado na determinação de susceptibilidades magnéticas por RMN foi o seguinte: num tubo de RMN (4 mm de diâmetro interno) introduziu-se a amostra a analisar (solvente +

+ soluto). Introduziu-se também uma sonda em pequena quantidade. Podem usar-se uma grande variedade de sondas como por exemplo o tetrametilsilano para solventes não aquosos ou o 2, ~~4~~-dimetil-2-silapentanosulfonato ou cloreto de tetrametilamônio, para solventes aquosos. A sonda é escolhida de modo a que a ressonância a que dá origem aparece em regiões espectrais onde possa ser facilmente detectada e não interfira com o soluto em estudo. Introduz-se um capilar contendo só a sonda de susceptibilidade e o solvente no tubo de RMN em que se encontra a amostra com a sonda. Quando se usam soluções diluídas ($d_o \approx d_s$) o último termo da equação pode ser desprezado.

TABELA II.1

Factores de diamagnetização (α) para várias geometrias da amostra

<u>Geometria da amostra</u>	α	$4\pi/3 - \alpha$
esférica	$4\pi/3$	0
cilíndrica transversal (a)	2π	$-2\pi/3$
cilíndrica longitudinal (b)	0	$4\pi/3$

- (a) geometria frequentemente encontrada para as células normais em espectrômetros de ressonância nuclear com magnetos permanentes ou electro-magnetos (caso do JEOL PFT-100 usado neste estudo) em que o eixo da amostra é perpendicular a H_o .
- (b) geometria referente a superconductores (solenóides) em que o eixo da amostra é paralelo a H_o .

II.10.1.1 - Condições Experimentais

A concentração das soluções de proteína usadas variam entre 3 e 4 mM, 0,005 M Tris/HCl e pH nominal 7,6. As concentrações de proteína foram determinadas usando-se os valores dos coeficientes de extinção molar.

As medidas de susceptibilidade magnética foram feitas em células cilíndricas concêntricas com o tubo de RMN (Wilmad Glass Co., Inc. WGS-5BL). O tubo capilar interno continha só solvente e o marcador de susceptibilidade magnética. Usou-se como marcador o próton do grupo metil do 2,2,3,3-tetradeutero-3-(trimetilsilil) propionato de sódio.

II.11 - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÔNICA

Os espectros de RPE foram registados ou num espectrómetro Varian E₉ (Varian Associates, Palo Alto, California, USA) ou num Bruker ER 200tt. As amostras foram arrefecidas com hélio líquido através de um "flow cryostat" da Oxford Instruments. A temperatura foi calibrada com um termopar de ouro/chromel colocado na corrente gasosa. As condições experimentais (velocidade da corrente gasosa) foram ajustadas e calibradas colocando um diodo de silicon calibrado (Lake Shore Cryotronics, Inc.) num tubo de RPE. Com uma corrente gasosa apropriada, a temperatura da amostra podia ser estabilizada a $4,8 \pm 0,1\text{K}$, como pode ser julgado pela reproducibilidade da amplitude do sinal de RPE depois de ter variado a temperatura numa gama larga.

Os espectros de RPE foram obtidos em condições experimentais (temperatura e potência) nas quais não havia saturação de intensidade do sinal. As condições experimentais encontram-se descritas nas legendas das figuras.

As integrações foram feitas numericamente através da fórmula de Wyard (47) com correcção para a inclinação da linha de base. Foi aplicada ainda a correcção sugerida por Aasa e Vanngard (48) para a dependência da probabilidade de transição do valor de g .

II.11.1 - TITULAÇÃO REDOX POR RPE

O método usado para a determinação do potencial de oxidação-redução baseia-se no uso quantitativo da intensidade do sinal de ressonância paramagnética electrónica (RPE) originado por cada espécie componente do par redox. Para este fim, procedeu-se a uma titulação potenciométrica de metaloproteína (com electrodo de platina) na presença de mediadores redox, e retiraram-se amostras a diferentes valores de potencial para posterior quantificação por RPE. Construiu-se uma célula anaeróbica, semelhante à usada por Dutton (49) e representada esquematicamente na Figura II.2.

Mantém-se a solução (3 a 10 ml) a 25°C no interior da célula. Mediu-se o potencial redox através de um electrodo de platina e um electrodo de referência (Radiometer Pl01 e K401). O sistema foi calibrado com quinohidrona (50). O pH foi medido directamente no vaso de titulação com um electrodo combinado (Radiometer GK 230113). Manteve-se o sistema numa atmosfera de Argon, o qual foi purificado por passagem num aparelho NILOX

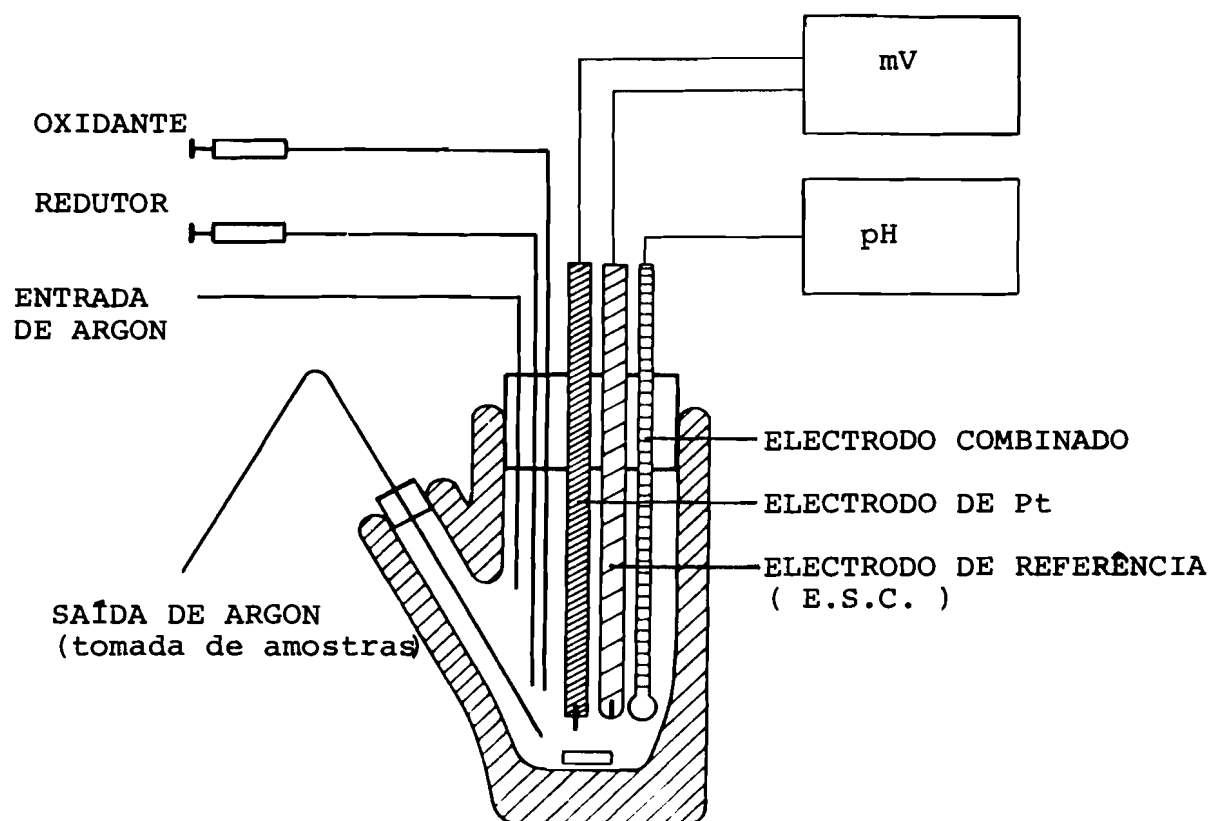


Figura II.2. Célula anaeróbia usada nas titulações redox segundo o esquema descrito por Dutton.

(Jencons Scientific Ltd., Hemel Hempstead, UK), contendo uma solução alcalina de ditionito, e introduzido no aparelho por agulhas de aço inoxidável.

O potencial redox do sistema foi ajustado com pequenas adições de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 0,1 M (em Tris/HCl 0,2 M, pH=9,0) e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0,2 M, e as amostras foram transferidas a diferentes valores de potencial directamente do vaso de titulação para o tubo de RPE (calibrado e de diâmetro interno cerca de 3 mm) através de sobrepressão de argon. As amostras foram congeladas em azoto líquido sempre sob atmosfera de azoto.

II.11.2 - SISTEMAS DE MEDIADORES

Na Tabela II.2 apresenta-se uma lista de mediadores de oxidação-redução usados nas titulações redox. A escolha dos mediadores a usar obedece aos seguintes pontos:

1. Devem ser adequados à gama de potenciais redox a medir.
2. Não interferirem quimicamente com o sistema em estudo (o que pode ser detectado através do uso de diferentes concentrações de mediadores e posterior comparação dos resultados obtidos (51)).
3. Não originarem sinais de RPE que se sobreponham aos do sistema em estudo e que se pretende quantificar.

TABELA II.2

Mediadores redox usados nas titulações redox descritas

<u>Mediador</u>	<u>E' (pH=7.0) mV</u>
tetrametil-p-fenilenodiamina	+260
2,6-dicloroindofenol	+217
2,5-dimetilbenzoquinona	+180
fenazinametasulfato	+ 80
azul de metileno	+ 11
indigotetrasulfonato	- 46
piocianina	- 60
2-hidroxi-1,4-naftoquinona	-145
antraquinona-1,5-disulfonato	-170
antraquinona-2-sulfonato	-225
fenosafranina	-255
safranina T	-289
benzilviologênio	-311
diquat	-350
metilviologênio	-440
triquat	-540
N,N'-dimetil-3-metil-4,4'bipiridil	-617

II.12 - ESPECTROS DE MÖSSBAUER

Os espectros de Mössbauer foram realizados no laboratório do Prof. Eckard Münck, no Gray Freshwater Biological Institute, Universidade de Minnesota, EUA. Os espectrômetros de Mössbauer são do tipo de aceleração constante. A fonte de ^{57}Co (30 mCi) está implantada em Rodium e tem uma largura mínima de linha de 0,24 mm/s. O sistema foi calibrado com uma amostra de ferro metálico. Para as medidas realizadas em campos aplicados de 600 gauss usou-se um "Dewar" Banis Super Vari Temp. As amostras são introduzidas dentro do dewar e os raios γ da fonte de ^{57}Co passam através da amostra através de duas janelas "mylar". Tanto para campos perpendiculares como para campos paralelos, usou-se um pequeno magneto permanente feito de placas de Indox V colocado na parte inferior do crióstato. As medidas a campo elevado foram realizadas num sistema de magneto supercondutor (Janis Research Co., Dewar and American Magnetics magnet with quick null). A fonte de ^{57}Co e a amostra foram colocadas num sistema de suspensão vertical e introduzidas no hélio líquido. Os desvios isoméricos apresentados são medidos em relação ao centro do espectro do ferro (metal) à temperatura ambiente.

II.13 - BIBLIOGRAFIA

1. Moura, I., Bruschi, M., Le Gall, J., Moura, J.J.G., e Xavier, A.V., Biochim.Biophys.Acta, 75, 1037 (1977).
2. Le Gall, J. e Hatchikian, E.C., C.R.Acad.Sci.Ser., 264, 2580 (1967)
3. Bruschi, M., Hatchikian, E.C., Le Gall, J., Moura, J.J.G. e Xavier, A.V., Biochim.Biophys.Acta, 449, 275 (1976).
4. Postgate, J.R., Biochem.J., 58, 9 (1954).
5. Lee, J.P. e Peck, H.D.Jr., Biochem.Biophys.Res.Comm., 45, 583 (1971).
6. Moura, J.J.G., Xavier, A.V., Bruschi, M., Le Gall, J., Hall, D.O. e Cammack, R., Biochem.Biophys.Res.Comm., 72, 782 (1976).
7. Moura, J.J.G., Moura, I., Bruschi, M., Le Gall, J., e Xavier, A.V., Biochem.Biophys.Res.Comm., 92, 962 (1980).
8. Le Gall, J. e Forget, N., em "Methods in Enzymology, vol.53, pag. 613, Academic Press, (1978).
9. Bramlett, R.N., e Peck, H.D.Jr., J.Biol.Chem., 250, 2979 (1975).
10. Bruschi, M., Le Gall, J., Hatchikian, E.C., e Dubourdieu, M., Bull. Soc.Frac.Physiol.Veget., 15, 381 (1969).
11. Harvey, A.E., Smart, J.A., e Amis, E.S., Anal.Chem., 27, 21 (1955).
12. Lovenberg, W., Buchanan, B.B., e Rabinowitz, J.C., J.Biol.Chem., 238, 3899 (1963).
13. Fisher, D.C., e Price, D.C., Clin.Chem., 10, 21 (1964).
14. Fogo, J.K. e Popowski, M., Anal.Chem., 21, 732 (1949).
15. Moore, S. e Stein, W.H., em "Methods in Enzymology", (Colowick, S.P., e Kaplan, N.O., eds.) Vol.6, p.819 (1963).
16. Hirs, C.H.W., em "Methods in Enzymology", (Hirs, C.H.W., ed.) Vol.11, pag.167, Academic Press, (1976).

17. Spies, J.R., e Chambers, D.C., Anal.Chem., 20, 20 (1948).
18. Vesterberg, O., Biochim.Biophys.Acta, 257, 11 (1972).
19. Whitaker, J.R., Anal.Chem., 35, 1950 (1963).
20. Akabori, S., Ohno, K., e Narita, K., Bull.Chem.Soc.Jap., 25, 597, (1952).
21. Niu, C.J. e Fraenkel-Conrat, H., Biochim.Biophys.Acta, 16, 597, (1955).
22. Ambler, R.P., Biochem.J., 89, 349 (1963).
23. Ambler, R.P., em "Methods in Enzymology", 11, 436 (1967).
24. Gross, E. e Witkop, B., J.Biol.Chem., 237, 1856 (1962).
25. Houmard, J. e Drapeau, G.R., Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 69, 3506 (1972).
26. Michl, H., Meth.Chem., 82, 489 (1951).
27. Edman, P., Arch.Biochem., Biophys., 2, 475 (1949).
28. Edman, P., Acta.Chem.Scand., 4, 283 (1950).
29. Pisano, J.J., Bronzert, T.J. e Brewer, H.B.Jr., Anal.Biochem., 45, 43 (1972).
30. Edman, P., e Sjoquist, J., Acta.Chem.Scand., 10, 1507 (1956).
31. Edman, P. e Begg, G., Eur.J.Biochem., 1, 80 (1967).
32. Edman, P., em "Protein Sequence Determination", S.B.Needleman, ed. p.211, Sping-Verlag, Berlim (1970).
33. VanOrden, H.O., e Carpenter, F.H., Biochem.Biophys.Res.Comm., 14, 399 (1964).
34. Smithies, O., Gibson, D., Fanning, E.M., Goodflesh, R.M., Gilman, J.G., e Ballantyne, D.L. Biochemistry, 10, 4912 (1971).
35. Laursen, R.A., Eur.J.Biochem., 20, 89 (1971).
36. Lode, E.T., e Coon, M.J., J.Biol.Chem., 246, 791 (1971).
37. Lundell, D.J., e Howard, J.B., J.Biol.Chem., 253, 3422 (1978).

38. Boyer, P.D., J.Am.Chem.Soc., 76, 4331 (1954).
39. Briat, B., Berger, D. e Leliboux, M., J.Chem.Phys., 57, 5606 (1972).
40. Campbell, L.L., Dobson, C.M., Jeminet, G.J. e Williams, R.J.P., FEBS Lett., 49, 115, (1974).
41. Bleich, H.E., e Glasel, J.A., J.Mag.Res.x 18, 401 (1975).
42. Van Geet, A.L., Anal.Chem., 40, 2227 (1968).
43. Dickinson, W.C., Phys.Rev., 81, 317 (1951).
44. Eaton, D.R. e Philips, W.D., Advan.Magn.Res., 1, 103 (1965).
45. Evans, D.F., J.Chem.Soc., 2003 (1959).
46. Bartle, K.D., Jones, D.W., e Mariac, S., Croat.Chem.Acta, 40, 227 (1968).
47. Wyard, S.J., J.Sci.Instrum., 42, 769 (1965).
48. Aasa, R. e Vanngard, T., J.Magn.Res., 19, 308 (1975).
49. Dutton, P.L., Biochim.Biophys.Acta, 226, 63 (1971).
50. Clark, W.M., em "Oxidation-Reduction Potentials of Organic Systems", p.184, (Williams e Wilkins, eds.), Baltimore, (1960).
51. Cammack, R., Barber, M.J., e Bray, R.C., Biochem.J., 157, 469, (1976).

I I I . A D E S U L F O R E D O X I N A D E D . G I G A S

III.1 - INTRODUÇÃO

A desulforedoxina é uma proteína nova, recentemente isolada, de D.gigas. A razão deste nome não está directamente relacionada com alguma propriedade especial desta proteína. Desulfo porque foi isolada de um desulfovibrio, não querendo isto implicar que esta proteína não possa existir noutros organismos (uma proteína semelhante parece estar presente em Desulfuromonas acetoxidans (1)). O restante nome implica que é uma proteína de oxidação-redução.

Este tipo de nomenclatura é desencorajado pelas recentes normas sugeridas pela IUPACIUB (2) para as proteínas de "ferro-enxofre", que sugere que a proteína deve ser designada de acordo com o tipo de centro activo presente. O facto de o centro activo desta proteína não se enquadrar nos tipos de centros conhecidos levou-nos até agora a continuar a usar este nome.

Esta proteína no entanto assemelha-se em algumas propriedades à classe das proteínas tipo rubredoxina, como se irá demonstrar neste capítulo e, futuramente, deverá ser incluída nesta classe.

Uma vez que esta proteína contém um tipo de centro que é pela primeira vez caracterizado, iremos sempre compará-la com as propriedades das rubredoxinas.

III.2 - PROPRIEDADES DAS RUBREDOXINAS

III.2.1 - GENERALIDADES

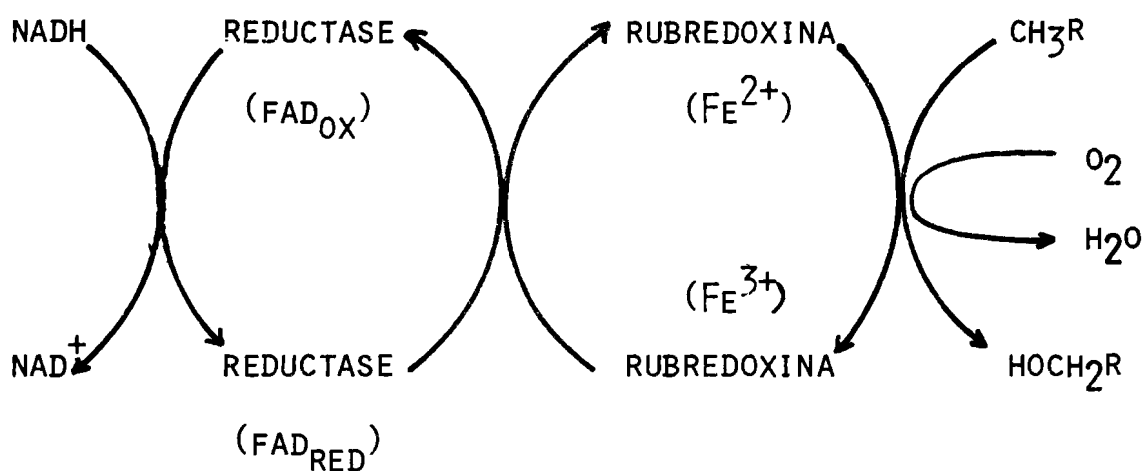
As rubredoxinas constituem um grupo de proteínas de peso molecular pequeno isoladas a partir de bactérias aeróbicas e anaeróbicas. São classificadas conjuntamente devido ao seu distinto espectro óptico e porque contêm geralmente um só átomo de ferro por molécula. A grande diferença entre as rubredoxinas e as outras proteínas de ferro-enxofre é exactamente a ausência de enxofre lábil. O conhecimento sobre estas proteínas encontra-se numa situação invulgar. Enquanto que a estrutura a três dimensões da rubredoxina de Clostridium pasteurianum (3,4) e Desulfovibrio vulgaris (5) é conhecida a partir de estudos de difracção de Raios-X, não se sabe qual a função bioquímica destas proteínas ou de qualquer outra isolada de outro organismo anaeróbico.

O nome rubredoxina foi pela primeira vez aplicado a uma proteína de "ferro-enxofre" isolada de C.pasteurianum. A proteína tinha sido primeiramente observada por Buchanan et al. (6) e Mortenson (7) como uma fracção avermelhada durante o isolamento da ferredoxina, que é castanha escura. Em 1965, Lovenberg e Sobel concentraram e purificaram esta proteína e conseguiram obter cristais de boa qualidade por fraccionação em sulfato de amónio. Verificaram que esta proteína podia reduzir-se e oxidar-se reversivelmente e que podia actuar como transportadora de electrões em certas reacções que requerem ferredoxina. Contudo não há absoluta necessidade da presença

da rubredoxina nestas reacções em organismos anaeróbicos. Após o aparecimento desta rubredoxina algumas outras foram encontradas em outros organismos anaeróbicos, tendo propriedades muito semelhantes, particularmente o espectro de visível muito característico (8 a 19).

De grande interesse foi a descoberta por Peterson et al. (20) de uma rubredoxina de Pseudomonas oleovorans. É só neste organismo aeróbico que se conhece um papel fisiológico definido para a rubredoxina. Neste organismo, a rubredoxina é um transportador electrónico no sistema ω -hidroxilação. Nesta reacção, a rubredoxina parece ser o doador electrónico directo da ω -hidroxilase. A rubredoxina por sua vez, é reduzida pelo nucleotídeo piridínico e um sistema reductor. Esta reacção é esquematizada na Figura III.1.

FIGURA III.1



Neste sistema, que hidroxila alcanos, a rubredoxina é relativamente específica observando-se muito pouca actividade com rubredoxinas de organismos anaeróbicos ou com ferredoxinas de várias fontes.

A rubredoxina de P.oleovorans foi imobilizada em Sepharose 4B (25) tratada por brometo de cianogénio e as propriedades espectrais observadas são semelhantes. Esta forma imobilizada pode aceitar electrões do ditionito e do NADPH na presença da ferredoxina -NADP reductase, de espinafre. O potencial de redução da proteína imobilizada é semelhante ao da proteína solúvel e o átomo de ferro pode ser retirado e substituído. A rubredoxina ligada é no entanto mais resistente à desnaturação pelo cloreto de guanidina.

Considerando o sucesso obtido na determinação da estrutura da rubredoxina de organismos anaeróbicos strictos é paradoxal que não se conheça ainda o seu papel fisiológico. O potencial relativamente elevado das rubredoxinas (perto de 0 mV) (21) torna difícil acomodá-la nas reacções fisiológicas mais comuns, que são usadas para testar actividade, como é o caso das bactérias redutoras de sulfato.

A proteína prototípica desta classe é a rubredoxina de C.pasteurianum. Estudos de Raios-X mostraram que o ferro está ligado a quatro átomos de enxofre de cisteínas numa forma aproximadamente tetraédrica.

Para além da rubredoxina de C.pasteurianum, também as rubredoxinas de D.vulgaris e de D.gigas foram cristalizadas e sujeitas a análise de Raios-X (23). Apesar dos parâmetros da célula e os grupos espaciais serem idênticos, tanto os mapas de difracção de Raios-X, como as sequências e a reactividade revelam diferenças estruturais. As três proteínas têm 37 amino-ácidos totais comuns às três cadeias polipeptídicas.

Os aspectos filogenéticos das sequências de ácidos aminados da rubredoxina de D.vulgaris e de D.gigas foram discutidos por Vogel (24). As estruturas primárias quando comparadas com as rubredoxinas de outros organismos anaeróbicos revelam só 12 resíduos idênticos na proximidade dos dois grupos de cisteínas que ligam o ferro.

Odom et al. (26) isolaram uma $\text{NADH}+\text{H}^+$ rubredoxina oxido-reductase em D.gigas, que tem uma elevada especificidade para a rubredoxina isolada do mesmo organismo (Tabela III.1).

TABELA III.1

K_m de rubredoxinas de diversas origens em relação à $\text{NADH}+\text{H}^+$ rubredoxina oxido-reductase

Rubredoxina de <u>D.gigas</u>	$6,2 \times 10^{-6}$ M
Rubredoxina de <u>D.vulgaris</u>	$5,3 \times 10^{-5}$ M
Rubredoxina de <u>C.pasteurianum</u>	$1,0 \times 10^{-4}$ M

Na Figura III.2 faz-se uma comparação interessante entre as sequências de ácidos aminados das rubredoxinas de C.pasteurianum, D.vulgaris e D.gigas (15,16,24). Verifica-se que a posição de um grande número de resíduos carregados não é mantida ao longo das três proteínas. Estas diferenças são dramáticas numa proteína tão pequena e podem explicar as diferenças observadas entre a afinidade para a reductase. A Figura III.2 mostra no entanto que a cadeia peptídica perto do centro activo se mantém praticamente inalterada.

III.2.2 - ANÁLISE DOS RESULTADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X EM RUBREDOXINAS

A informação estrutural em rubredoxinas proveio inicialmente de duas fontes além de vários compostos modelo.

O enrolamento da rubredoxina foi determinado originalmente a partir de um mapa de densidade electrónica a 3,0 Å (27) (subsequentemente analisado a 2,5 Å com dois derivados) e é bastante simples (ver Figura III.3). A parte N-terminal forma duas das três cadeias em folha β -antiparalela que forma um dos lados de uma caixa de três lados e fornece duas das quatro cisteínas que ligam o ferro. A porção seguinte da cadeia está enrolada num "loop" em zig-zag mantido em conjunto por ligações de hidrogénio formando assim o segundo lado da caixa; a fracção seguinte da cadeia forma uma curva que fornece os dois ligandos que faltavam ao ferro e corresponde ao terceiro lado da caixa. Os resíduos finais formam a terceira

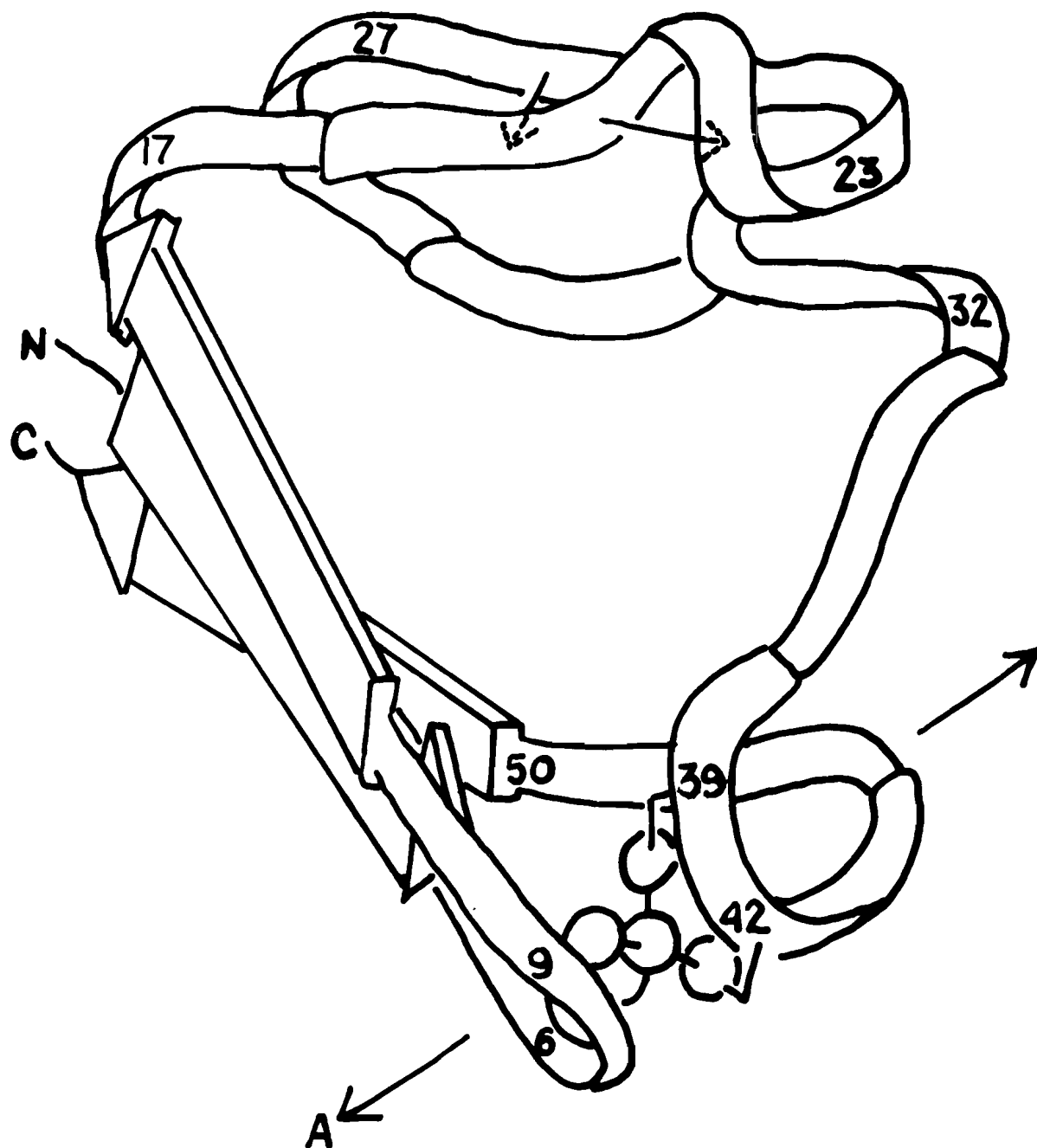


Figura III.3 - Esquema da estrutura da rubredoxina de D.vulgaris. O interior aparentemente vazio está preenchido por resíduos hidrofóbicos. 'A' representa a direcção hipotética de expansão perto do centro.

cadeia em folha β . O interior é hidrofóbico e há uma superfície hidrofóbica praticamente contínua que vai desde o cimo da cadeia até ao centro ferro-enxofre.

Perto do ferro e enxofre os peptídeos estão orientados com os grupos carbonílicos dirigidos exteriormente, a não ser que haja ligações de hidrogénio a outras porções peptídicas, sugerindo que há uma neutralização parcial do centro FeS_4 carregado negativamente por estes hidrogénios amídicos. Não existe nenhum grupo carregado positivamente na vizinhança.

Com vista a examinar com mais detalhe a geometria do centro de ferro-enxofre, a rubredoxina de C.pasteurianum (oxidada) foi cristalograficamente refinada em dois passos. Os resultados do refinamento a 1,5 Å indicaram que três das quatro ligações Fe-S não diferiam apreciavelmente de 2,28 Å enquanto que a quarta era 2,02 Å (3). Contudo, estudos mais recentes com dados num cristal maior a 1,2 Å, mostram que o comprimento da ligação, é $2,24 \pm 0,01$ Å (28). Estes resultados mais recentes estão de acordo com os valores de $2,26 \pm 0,06$ Å (29) e $2,30 \pm 0,04$ Å (30) obtidos a partir de estudos de absorção de estrutura fina de Raios-X (EXAFS). Estes resultados estão mais de acordo com os resultados de dicroísmo circular magnético que sugerem que a maior simetria que o centro pode ter é D_{2d} (31) enquanto que uma ligação mais curta sugeriria uma simetria trigonal.

Ainda mais evidência de comprimentos de ligações equivalentes provém da estrutura da rubredoxina de D.vulgaris (5).

Num artigo recente Adman et al. (15) apresentaram a determinação da estrutura da rubredoxina de D.vulgaris a 2 Å de resolução usando os dados de Raios-X em conjunto com um método de substituição molecular. O modelo de partida foi derivado do da rubredoxina de C.pasteuriana usando os átomos em comum às duas proteínas de acordo com a sequência. Usaram métodos de Fourier diferenciais para obter um refinamento parcial e verificaram que as duas rubredoxinas diferem principalmente no número de grupos expostos à superfície da molécula. Não notaram diferenças na conformação ou ligações de hidrogênio. O comprimento da ligação Fe-S variava entre 2.15 a 2.35 Å mas não difere significativamente do valor médio 2.29 Å.

Alguns anos atrás obtiveram-se dados de difracção de dois cristais da rubredoxina de C.pasteuriana (32) que tinha sido reduzida com ditionito. A análise dos resultados tornou-se complicada devido a um certo número de factores. Primeiro o cristal não se manteve completamente reduzido durante a recolha de dados, uma vez que apareceu no cristal alguma cor vermelha. Este cristal foi usado para um grande conjunto de resultados a 2.5 Å. O segundo cristal manteve-se reduzido; contudo só se obteve um conjunto de dados parciais a 2.5-2.0 Å. Parece pela análise qualitativa dos resultados que a extensão de simetria de grau dois local (S(9)-Fe-S(42) e S(6)-Fe-S(39)) é menor na forma reduzida.

Estudos de compostos análogos da rubredoxina oxidada e reduzida, nomeadamente bis(0-(xylyl- α,α' -ditiolato)ferrato (II,III) (40,41) mostraram que (1) o potencial redox deste

par é 0,7 V mais negativo do que na proteína, o que acontece também para compostos análogos da ferredoxina e (2) a média do comprimento da ligação Fe-S no anião oxidado é 2,267 Å enquanto que é 2,356 Å no anião reduzido. Os aniões que são formados com dois ligando bidentados podem ter simetria de grau 2 mas de facto não a têm. Cada metade da molécula comporta-se semelhantemente na redução e o átomo de ferro move-se para o plano formado pelos dois enxofres e pelos átomos de carbono a eles ligados. Foram determinadas as estruturas de três outros aniões $\text{Fe}(\text{SR})_4$ (III) (33,34): os parâmetros da estrutura estão indicados na Tabela III.2. A variação dos comprimentos das ligações é significativa em termos da determinação de estrutura. Estes resultados levam a concluir que: (1) a geometria local é bastante insensível aos ligandos envolvidos; (2) os comprimentos das ligações Fe-S são consistentemente 0,1 Å maiores na forma reduzida; e (3) não há geometria previsível a não ser assimétrica.

Na proteína há um aspecto especial na estrutura que possivelmente pode permitir uma extensão do comprimento das ligações Fe-S na proteína reduzida. O centro de ferro é mantido ligado à proteína por duas "pinças". Uma vez que no interior dessas pinças só existem resíduos hidrofóbicos pode ser favorecida uma expansão que afasta as pinças uma da outra como se indica na Figura III.3 pela letra A. Contudo as distâncias movidas seriam pequenas.

TABELA III.2

Comprimentos das ligações Fe-S em rubredoxinas e compostos análogos

	oxidada	reduzida
<u>C.pasteurianum</u>	2,29 A	
Análogos		
bis(o-xylyl- α - α' -ditiolato)	2,267(2,252-2,279)	2,356(2,324-2,378)
$[(SPMe_2)_2N]_2$		2,360(2,339-2,380)
ditiosquarate		2,390(2,380-2,397)
catiofenolato		2,356(2,353-2,372)

III.2.3 - ANÁLOGOS SINTÉTICOS AO TIPO DE CENTRO RUBREDOXINA

Vários complexos de ferro mononuclear com quatro ligandos sulfurados foram já sintetizados incluindo $Fe[(SPR_2)_2N]_2$ (35) $Fe[(SPR_2)_2CH]_2$ (36) bis(ditiosquarato)ferrato(II), $[Fe(dts)_2]^{2-}$ (37) e $[Fe(dts)(SPh)_2]^{2-}$ (38). Apesar de ter sido demonstrada coordenação tetraédrica Fe(II)-S₄ pelas estruturas de Raios-X de $Fe[(SPMe_2)_2N]_2$ (33) e $[Fe(dts)_2]^{2-}$ (34) os ligandos nestes complexos não são claramente ligandos tiois simples análogos aos resíduos cisteinilos mercaptídicos dum polipeptídeo.

Nas secções que se seguem apresentam-se somente algumas propriedades dos complexos tetraédricos mercaptídicos férricos e ferrosos que são modelos mais semelhantes ao cromóforo das rubredoxinas.

III.2.3.1 - Síntese e Estrutura

O primeiro complexo mononuclear Fe(II)-(SR)_4 referido na literatura usava o dodecapeptídeo $\text{BOC(Gli-Cis-Gli)}_4\text{-NH}_2$; dava-se a formação de um complexo tetraédrico ferroso em solução (39) mas este não podia ser isolado. O uso subsequente de mercaptídeos mais simples por outros grupos deu origem à formação de $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{-o-xyl})_2]^-$ (40), $[\text{Fe}(\text{SPh})_4]^{2-}$ (38) e $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{-o-xyl})_2]^{2-}$ (41) como sais cristalinos.

Na Figura III.4 comparam-se as estruturas dos análogos sintéticos com o centro Fe-S_4 da rubredoxina. É particularmente interessante a comparação dos parâmetros estruturais da Rd_{ox} e do análogo $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{-o-xyl})_2]^-$. O centro Fe-S_4 deste último apresenta só uma pequena distorção da simetria tetraédrica em contraste com o da Rd_{ox} que mostra grandes desvios de simetria tetraédrica nos ângulos das ligações e distâncias. A ausência de uma ligação mais curta Fe-S (2,05 Å) no análogo sugere que este facto seja o resultado de uma forte tensão exercida pela proteína ou um artefacto de refinamento. Este último caso parece ser o verdadeiro pois recentes estudos de EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure) feitos em duas rubredoxinas diferentes (29,30) sugerem que as ligações Fe-S não podem diferir mais do que 0,7 Å.

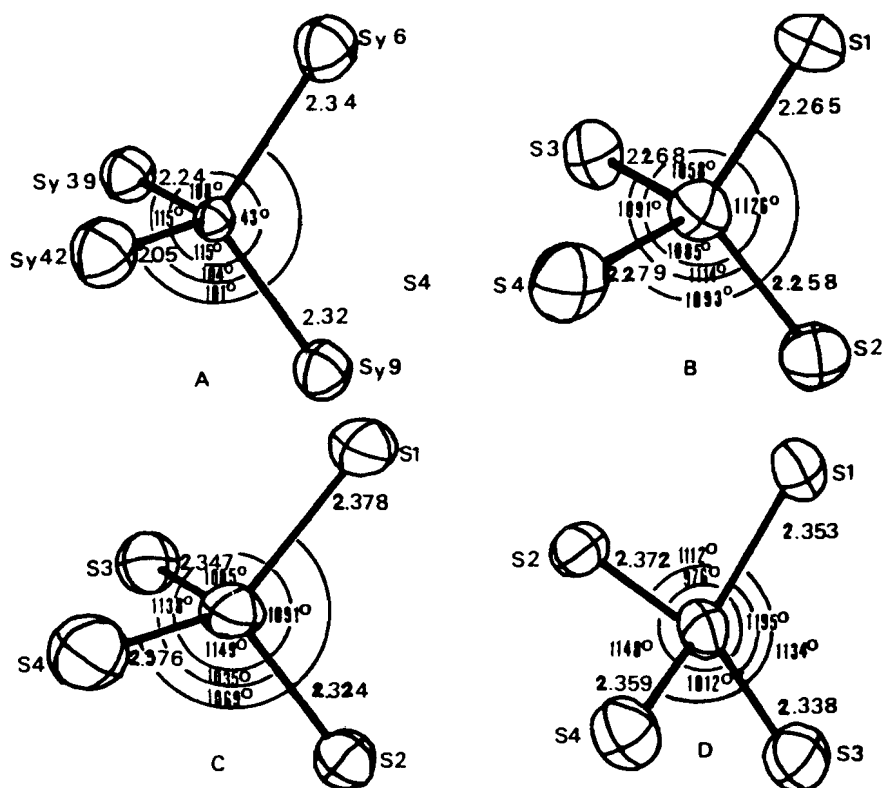
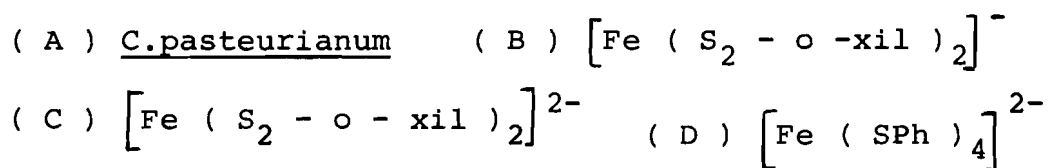


Figura III.4. Estrutura das unidades Fe - S₄

aproximadamente com a mesma orientação:



Os resultados de EXAFS da Rd_{red} mostram um aumento de 0.05 Å na média das ligações Fe-S (29). Isto está de acordo com os dados estruturais de $[Fe(SPh)_4]^{2-}$ e $[Fe(S_2O-xy1)_2]^{2-}$ nos quais os comprimentos das ligações Fe-S são em média 2,36 Å o que é 0.05 Å maior do que o valor médio obtido para $[Fe(S_2O-xy1)_2]^-$.

III.2.3.2 - Semelhança entre o Análogo e a Proteína

Os espectros ópticos do $[Fe(S_2O-xy1)_2]^-$ e Rd_{ox} (Figura III.5) são claramente semelhantes, com as bandas do lado dos comprimentos de onda mais elevados deslocadas para a zona do vermelho no análogo comparado com a proteína. Além disso os espectros de infra-vermelho próximo do $[Fe(S_2O-xy1)_2]^-$ (41), $Fe(SPh)_4^{2-}$ (38) e Rd_{red} (31) mostram bandas semelhantes a 5,600, 5,900 e 6,250 cm^{-1} , respectivamente; para um íão metálico de alto-spin d^6 com simetria tetraédrica T_d esta transição ($^5E \rightarrow ^5T_2$) corresponde directamente ao desdobramento do campo dos ligandos Δ_t .

Os resultados das medidas de susceptibilidade magnética mostram que tanto o $[Fe_2(S_2O-xy1)_2]^-$ (40) como a Rd_{ox} (42) obedecem ao comportamento simples da lei de Curie com um μ_{eff}/Fe de 5,8-5,9 Magnetões de Bohr, consistente com Ferro(II) de alto spin.

Os parâmetros de Mössbauer para os complexos ferrosos e Rd_{red} indicam também uma semelhança estrutural electrónica. Ambos apresentam desdobramentos de quadrupolo independentes da temperatura e grandeza semelhante (3,1-3,3 $mm\ seg^{-1}$) assim

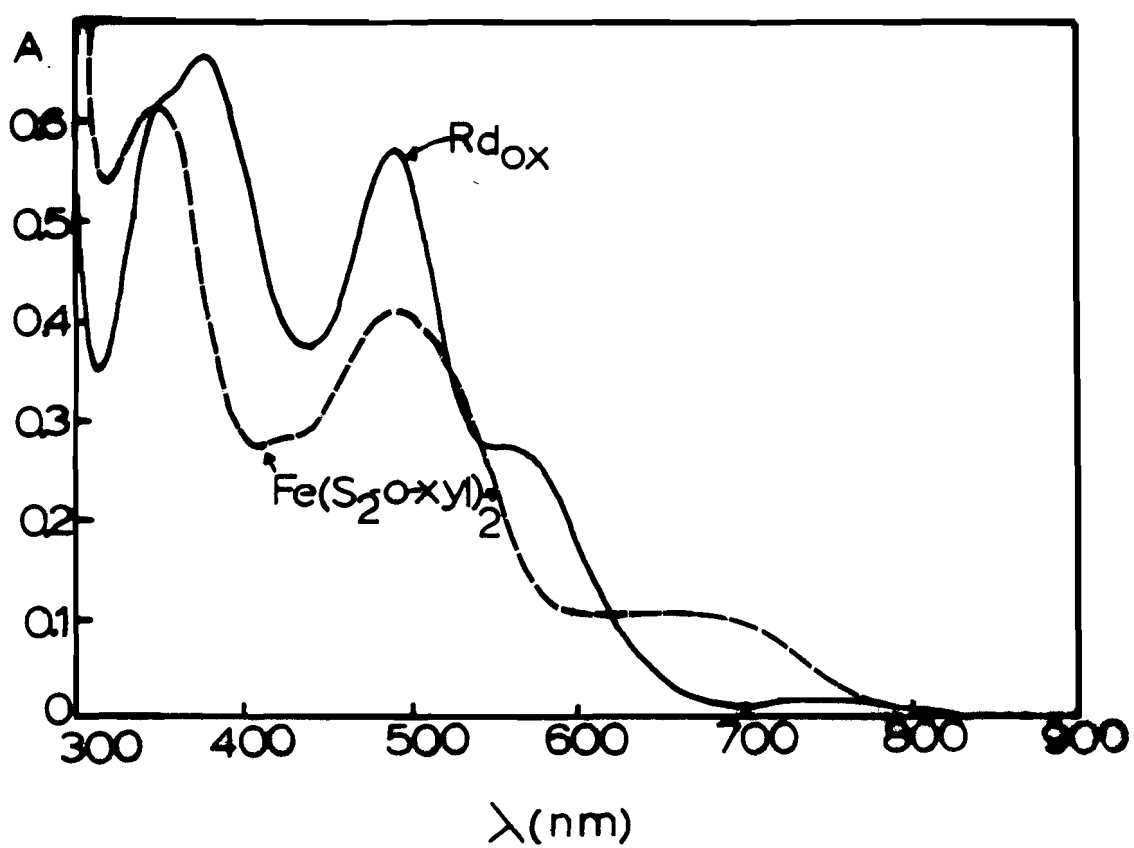


Figura III.5 - Espectro óptico da rubredoxina de C.pasteurianum (—); Fe(S₂-o-xyl)₂ em 80% DMSO-H₂O (----)

como valores muito semelhantes de desvio isomérico (0,54-0,66 mm seg⁻¹) e o mesmo sinal (negativo) para a principal componente do gradiente de campo eléctrico (41,43,44,45).

Todos os métodos espectroscópicos aplicados a estes sistemas até agora mostram que os complexos sintéticos são análogos bastante bons do centro da Rd_{ox} e Rd_{red}.

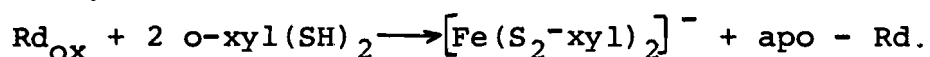
Reacções de oxidação-redução

Só o complexo monomérico com o-xililditiol é estável no estado férrico assim como no estado ferroso. O potencial deste par determinado polarograficamente em dimetil formamida é -790 mV (9). Este potencial é significativamente mais baixo do que o do par Rd_{ox}/Rd_{red}, cujo potencial tem valores que variam entre 0 e -60 mV (21,42,46). Isto pode ser devido ao facto de as condições em que são feitas as medidas não serem as mesmas. Contudo é claro que os análogos Fe-S₄ sofrem uma oxidação-redução equivalente à observada nas rubredoxinas.

III.2.3.3 - Extrusão do Centro Activo

No caso das rubredoxinas o nome extrusão não tem o mesmo significado que no caso das ferredoxinas. Neste caso é possível remover um único átomo de ferro e não um centro subestrutural por molécula de proteína.

A reacção que se dá é uma simples substituição de ligandos



Na Figura III.6 apresenta-se o espectro obtido utilizando este composto para extrair o ferro da rubredoxina de C.acidi-urici

III.3 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DESULFOREDOXINA DE D.GIGAS

III.3.1 - PESO MOLECULAR

O peso molecular foi determinado por filtração molecular em Sephadex G-50. Na Figura III.7 apresenta-se a recta do logarítmo do peso molecular em função do volume de eluição (referida ao azul de dextran) para os padrões usados. A partir do valor de volume de eluição da desulforedoxina obteve-se um valor de peso molecular de 7 900 Daltons.

Além do peso molecular da proteína nativa foi determinado o peso molecular da apoproteína. O valor obtido é semelhante ao da proteína nativa.

Testou-se também o valor do peso molecular da desulforedoxina com as cisteínas carboximetiladas e aminoetiladas. Em nenhum dos casos se detectou a presença de espécies com peso molecular de 4 000.

No entanto, após a determinação da sequência da desulforedoxina demonstrou-se que esta proteína se apresenta na forma de um dímero.

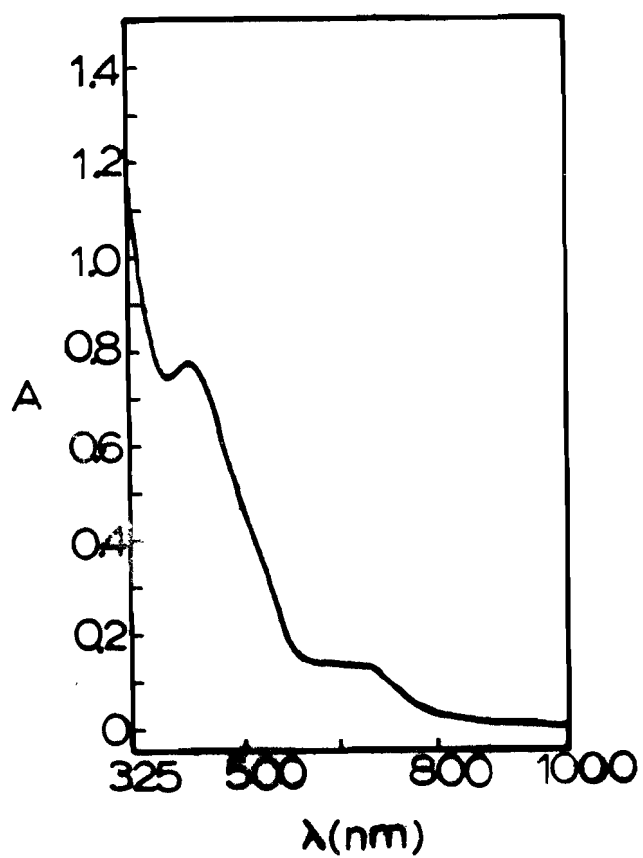


Figura III.6 - Espectro óptico da rubredoxina de C.pasteurianum tratada com 0-xylylditiol em 80% (V/V) HMPA-H₂O

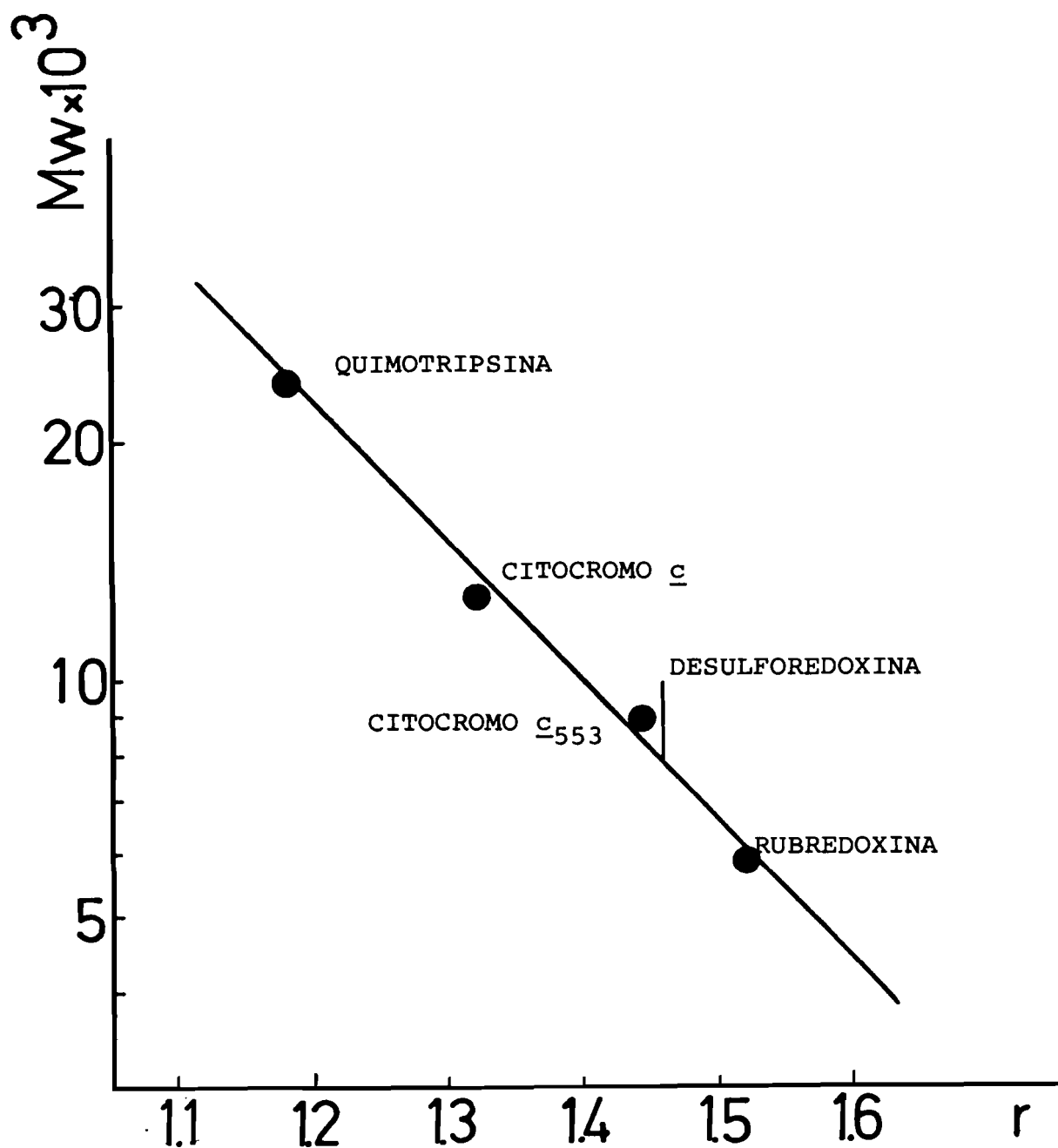


Figura III.7 - Determinação do peso molecular da desulforedoxina de D.gigas em Sephadex G-50. Recta de correlação do logaritmo de peso molecular em função do volume de retenção relativo ao azul de dextran.

III.3.2 - COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS AMINADOS DA DESULFOREDOXINA

Na Tabela III.3 apresenta-se a composição de ácidos aminados da desulforedoxina. Não contém histidina, arginina, serina, prolina, isoleucina, fenilalanina nem triptofano, o que é bastante invulgar numa proteína. Tem quatro resíduos de cisteína por ferro e tem um elevado conteúdo em valina e ácido glutâmico. Os cálculos para os valores da treonina e tirosina foram obtidos por extrapolação ao tempo zero de hidrólises de maior duração.

III.3.3 - PONTO ISOELECTRICO

O valor do ponto isoeléctrico obtido para a desulforedoxina $p_i=3,5$ é muito semelhante ao da rubredoxina de D.gigas ($p_i=3,2$) e D.salexigens ($p_i=3,1$) também determinados por nós.

TABELA III.3

Composição em ácidos aminados da desulforedoxina

	24h	48h	72h	inteiro mais próximo	
				por dímero	por monômero
Lisina	6,0	6,0	6,0	6	3
Histidina	0	0	0	0	0
Arginina	0	0	0	0	0
Triptofano	0	0	0	0	0
Ácido Aspártico	6,1	6,0	6,1	6	3
Treonina	2,2	1,9	1,7	2	1
Serina	1,0	0,7	0,5	(1)	0
Ácido glutâmico	13,9	14,0	13,5	14	7
Prolina	0	0	0	0	0
Glicina	11,7	11,5	11,4	12	6
Alanina	2,0	2,2	2,0	2	1
Cistina(Meia)				8	4
Valina	11,5	12,2	11,5	12	6
Metionina				2	1
Isoleucina	0	0	0	0	0
Leucina	6,2	6,5	6,8	6	3
Tirosina	1,8	1,4	1,1	2	1
Fenilalanina	0	0	0	0	0
TOTAL				72	36

III.3.4 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO, VISÍVEL E ULTRA-VIOLETA

Na Figura III.8 é apresentado o espectro óptico da desulforedoxina oxidada.

Na sua forma geral o espectro da desulforedoxina é semelhante ao da rubredoxina parecendo indicar uma espécie semelhante de ferro. Contudo há certas diferenças.

Os máximos do espectro de visível da desulforedoxina estão deslocados e o ombro característico da rubredoxina a 350 nm não é observado na desulforedoxina. A absorção da desulforedoxina na região do ultra-violeta é devida à presença de tirosina (1 Tir/monomero). A contribuição mais baixa do espectro na zona do ultra-violeta em comparação com a rubredoxina é devida ao diferente conteúdo em resíduos aromáticos (1 Trp, 3 Tir, e 2 Fen na rubredoxina).

III.3.5 - PROPRIEDADES DE OXIDAÇÃO-REDUÇÃO

A desulforedoxina é reduzida pelo ditionito e não contribui na zona do visível. Por reoxidação ao ar 90-95% da cor é recuperada. A redução pelo ácido ascórbico é muito lenta e o processo para quando a proteína ainda mantém 90% da cor. No entanto, a rubredoxina de D.gigas é completamente reduzida pelo ácido ascórbico. Existem outras rubredoxinas estudadas por nós que não são completamente reduzidas pelo ácido ascórbico, como por exemplo a rubredoxina de D.salexigens (18). Isto sugere que nem todas as rubredoxinas têm poten

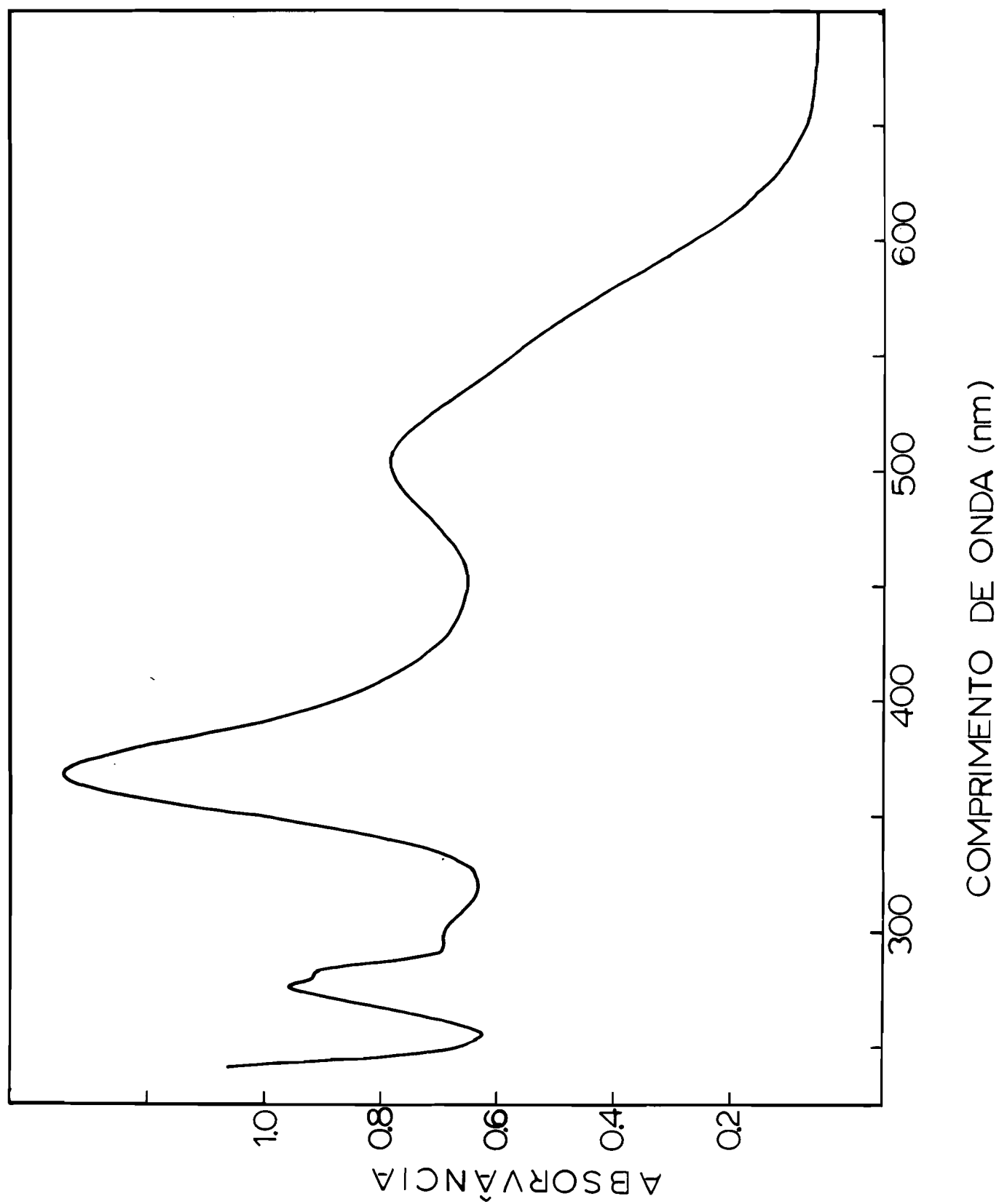


Figura III.8 - Espectro de ultravioleta e visível da desulforedoxina de D. gigas

ciais de oxidação-redução semelhantes, o que nos levou à determinação dos potenciais redox de várias rubredoxinas (21).

A desulforedoxina deve ter um potencial de oxidação-redução mais negativo do que a rubredoxina de D.gigas, o que foi provado pela determinação do potencial redox por espectroscopia de RPE (47).

III.3.6 - ANÁLISE DO FERRO DA DESULFOREDOXINA

Nas preparações de desulforedoxina em que a razão ultra-violeta/visível é de 1,23 a análise de ferro foi de $1,9 \pm 0,1$ átomos de ferro/8 000 Daltons.

No entanto, no decorrer do estudo desta proteína nem sempre se trabalhou com amostras com 1,23 de razão U.V./visível. As amostras no entanto estavam puras, como indicava a composição de ácidos aminados, o que leva a concluir a existência de apoproteína misturada com proteína nativa. Este facto parece indicar uma certa instabilidade desta proteína em comparação com a rubredoxina. A desulforedoxina é pouco estável a pH à volta de 4,5 podendo perder completamente a cor ao fim de alguns dias, o que não acontece com a rubredoxina que tem sido muitas vezes purificada a pH=4,5 com tampão de citrato (10). No entanto, se se aumenta o pH da solução grande parte da desulforedoxina é reconstituída.

Para que se possa determinar sempre a razão proteína/ferro existente, só pelo traçado do espectro ultra-violeta e visível sem ser necessário recorrer a uma análise

de ferro e a uma composição de ácidos aminados, fez-se o seguinte: calculou-se o coeficiente de extinção molar por ferro na zona do visível (fez-se uma análise de ferro e teve-se em conta a percentagem de ferro impureza visto por espectroscopia de Mössbauer). Deste modo é sempre possível numa amostra saber a quantidade de ferro envolvido num centro tipo desulforedoxina. Não se pode calcular directamente a concentração de proteína pela absorção a 280 nm uma vez que o cromóforo contribui nesta região espectral; além disso esta contribuição vai variar conforme a razão ultra-violeta/visível (ou seja, conforme o número de átomos de ferro/proteína).

Para estimar a contribuição do cromóforo debaixo da banda a 278nm traçou-se um espectro da apoproteína (preparada acidificando o meio com HCl) em que se contrabalançou no branco a absorção a 330 nm devida ao cloreto férrico formado. Fazendo a diferença entre o espectro da proteína nativa e este último, obtém-se a contribuição do cromóforo a 278nm. Na Figura III.9 apresenta-se este espectro. A concentração de proteína nesta amostra foi determinada por análise de ácidos aminados.

Descontando 86% da absorvância lida a 507 nm à absorvância a 278 nm obtém-se a absorvância devida à proteína, que dividida pela concentração da proteína determinada pela análise de ácidos aminados nos dá o valor do coeficiente de extinção molar.

Na Tabela III.4 apresenta-se o valor dos coeficientes de extinção molar da desulforedoxina. Na mesma Tabela apre-

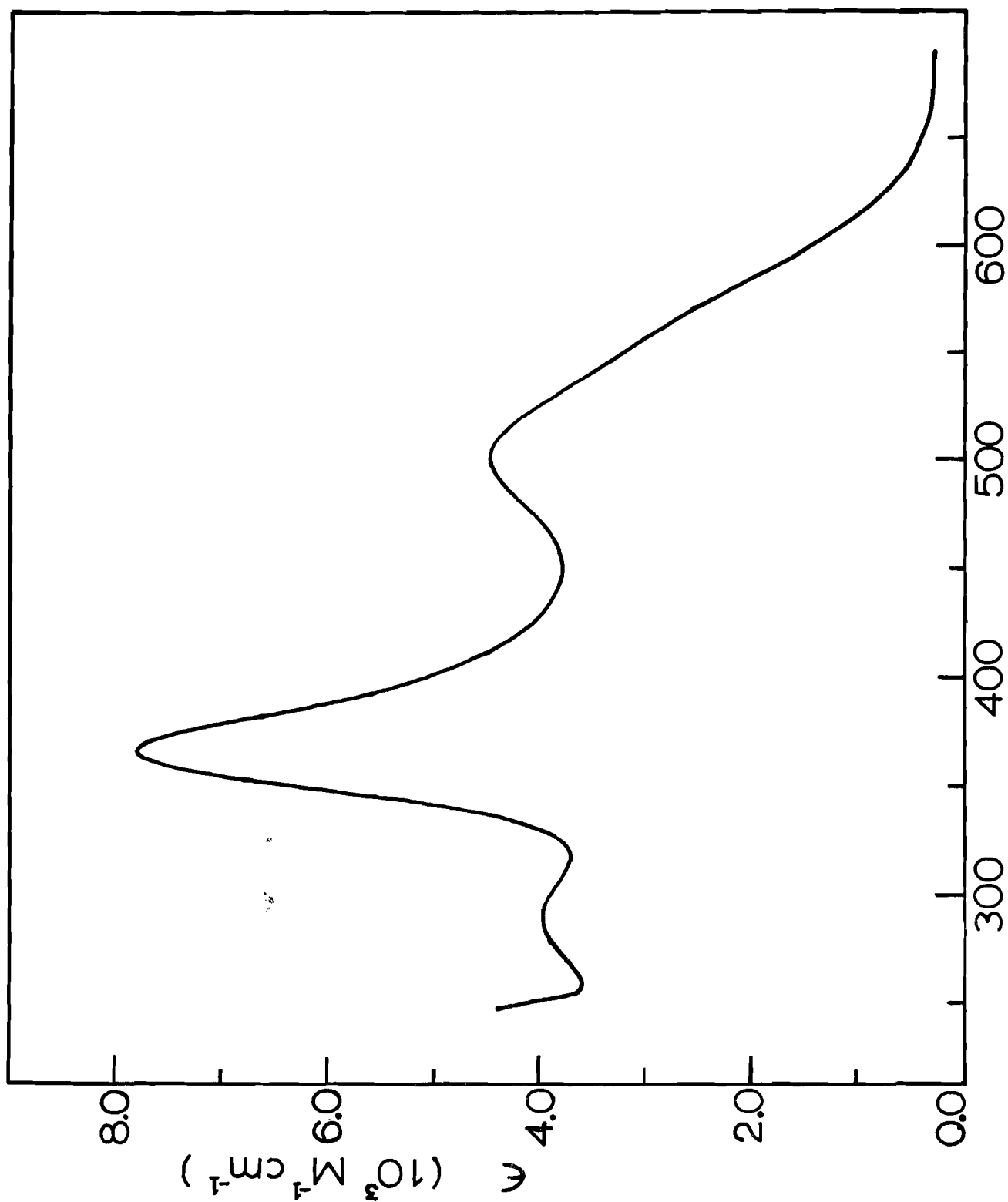


Figura III.9 - Espectro de ultravioleta e visível da Desulfiredoxina oxidada sem a contribuição da proteína.

sentam-se os coeficientes de extinção molar da rubredoxina.

Deste modo é rapidamente determinada a razão de ferro/
/mole da proteína, após o traçado do espectro óptico.

TABELA III.4

	λ (nm)	$(M^{-1}cm^{-1})$	
desulforedoxina (por monômero)	278	1940	(depois de descon- tar 80% da A_{507})
	370	7790	
	507	4580	
rubredoxina	278	17210	
	376	8450	
	493	6970	

III.3.7 - ANÁLISE DE ENXOFRE LÁBIL

Não se observou enxofre lábil pelo método de Fogo e Popowski. Tal como a rubredoxina esta proteína não contém enxofre lábil.

III.3.8 - RECONSTITUIÇÃO COM ^{57}Fe

O espectro óptico de uma amostra de desulforedoxina reconstituída com ^{57}Fe é perfeitamente idêntico ao da proteína nativa. Neste caso a proteína nativa tinha uma razão Ultra-Violeta/Visível = 1,23.

A razão U.V./visível da proteína reconstituída é semelhante e a reconstituição deu-se com um rendimento de cerca de 90%.

Realizaram-se experiências de reconstituição em que a quantidade de ^{57}Fe era inferior à quantidade estequiométrica (50% do necessário). Procedendo desta maneira, as fracções recolhidas à saída da coluna de Sephadex G-50 apresentam razões U.V./visível que variam de 1,4 a 1,9. Estes resultados sugerem-nos que as moléculas reconstituídas contêm dois ferros (processo designado por "all or nothing" (48)). Se fosse um processo por etapas, em que primeiro entrasse um ferro e só depois o segundo, a preparação devia ser homogênea e com razão igual a 1,6, que é a razão para a qual haveria um ferro por cada molécula de dímero. O facto de se obterem algumas fracções com razões muito inferiores indica que estamos em presença de uma mistura de moléculas de 2Fe com apoproteína que não são separadas na coluna de Sephadex G-50 utilizada.

III.3.9 - TITULAÇÃO DAS CISTEÍNAS PELO p-CLOROMERCURIOTENZOATO

A titulação dos grupos sulfidrilo foi seguida pelo método de Boyer (49). O p-cloromercuribenzoato reage na razão 2:1 com enxofre inorgânico e 1:1 com grupos sulfidrilo. Se houver cisteínas envolvidas em pontes dissulfureto, estas não reagem.

Na Figura III.10 apresenta-se a titulação da desulforedoxina com o PCMB. O número de cisteínas que reagiram por monómero é quatro.

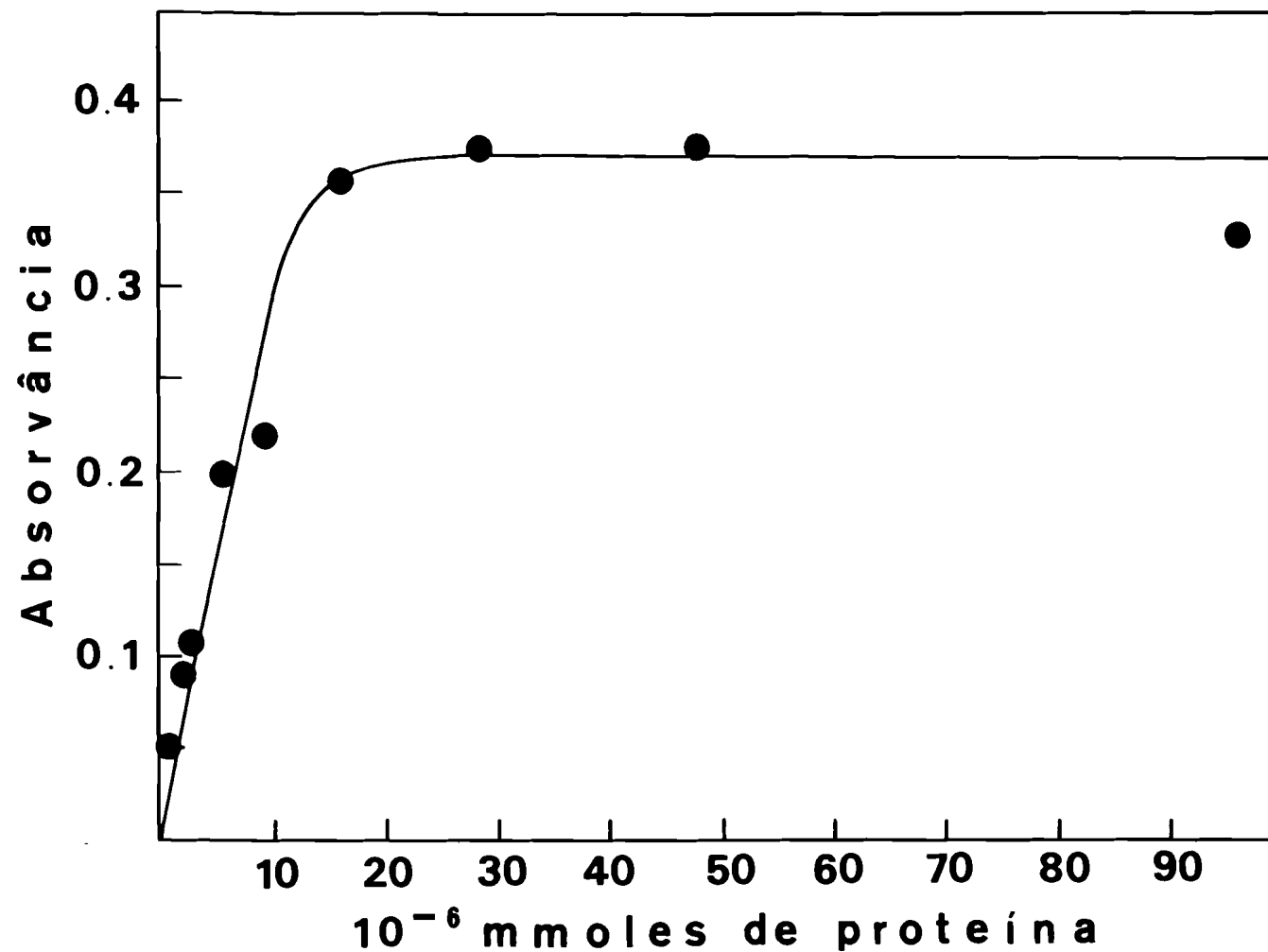


Figura III.10 - Aumento da absorvância a 255 nm devido à reacção do p-cloro-mercuribenzoato (PCMB) com a desulfo-redoxina.

Como reagiram quatro equivalentes de PCMB por mole de proteína (monômero) não há possibilidade de existência de uma ponte dissulfureto.

Esta experiência no entanto, não prova conclusivamente que todas as cisteínas estão ligadas ao ferro.

III.3.10 - ESTUDO DO ESTADO DAS CISTEÍNAS

Para testar se as quatro cisteínas por monômero estão todas ligadas ao ferro realizaram-se várias experiências que foram descritas nas secções II.5,6 e 7.

O cromóforo mantém-se intacto em ureia 7M como pode ser demonstrado pelo espectro óptico. Usando baixas concentrações de ácido ³H-iodoacético só se encontraram marcadas 0,03% das cisteínas. Usando concentrações mais elevadas de ácido iodoacético (25 mM) 15% do cromóforo é destruído (com base na diminuição da absorvância a 507 nm). Isto está de acordo com o valor de 10% encontrado para o número de cisteínas carboximetiladas (o que pressupõe quatro ligandos cisteína por ferro). Em conjunto, estas duas experiências sugerem a ausência de resíduos de cisteína livres.

Numa outra experiência (secção II.7) os resultados indicavam 30% de uma ponte dissulfureto por dímero. Contudo os resultados de sequência mostraram que a marcação radio-activa das cisteínas não era específica, o que indica a ausência de pontes dissulfureto na desulforedoxina.

As experiências realizadas sugerem que todas as cisteínas estão envolvidas na ligação ao ferro.

III.3.11 - SEQUÊNCIA

III.3.11.1 - Análise da Sequência N-terminal

Realizaram-se duas análises da sequência a partir do N-terminal. A desulforedoxina oxidada (cisteínas transformadas em ácido cisteico) foi sujeita a uma degradação de Edman sequencial num sequenciador automático Socosi. Em tampão DMBA identificaram-se 32 ácidos aminados.

Usando um sequenciador de fase sólida a desulforedoxina oxidada foi acoplada através dos resíduos de lisina ao diisotiocianato de fenileno (DIIC). Identificaram-se 30 ácidos aminados a partir de 94 nmoles de proteína. Os resultados são apresentados na Figura III.11

1		5		10		15								
Ala	Asn	Glu	Gli	Asp	Val	Tir	Lis	Cis	Glu	Leu	Cis	Gli	Gln	Val
→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
				20					25					30
-Val	Lis	Val	Leu	Glu	Glu	Gli	Gli	Gli	Thr	Leu	Val	()	()	Gli
→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
-Glu	Asp	...												
→	→													

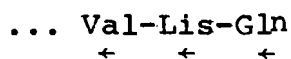
Figura III.11 - Sequência de ácidos aminados do N-terminal da desulforedoxina oxidada. Os parentesis indicam que os resíduos nessas posições não puderam ser identificados.

III.3.11.2 - Digestão da Proteína com Carboxipeptidase A

As condições experimentais para a acção da carboxipeptidase são descritas por Ambler (50). Para a reacção com a carboxipeptidase, a proteína (0,2 nmoles) foi dissolvida em 0,2 ml de N-etilmorfolina 0,2 M (pH=8.4). A mistura foi incubada depois de adição de 0,01 ml de uma solução de carboxipeptidase a 37°C. Retiraram-se amostras após três horas e posteriores tempos de incubação, que foram secas sobre vácuo.

Os ácidos aminados libertados foram identificados por electroforese em papel a pH=2,0 ou com o analisador de ácidos aminados; realizaram-se sempre digestões de brancos simultaneamente.

Os resultados obtidos são consistentes com a seguinte sequência C-terminal



III.3.11.3 - Peptídeos Obtidos pelo Brometo de Cianogéneo

A desulforedoxina contém só um resíduo de metionina por cadeia. Os peptídeos obtidos foram separados por filtração de gel em Sephadex G-25 e electroforese em papel, e oxidados pelo ácido performico.

Na Tabela III.5 mostram-se as composições de ácidos aminados dos dois fragmentos obtidos pelo CNBr e na Figura III.12 as sequências obtidas pela degradação de Edman.

TABELA III.5

Composição em ácidos aminados dos peptídeos obtidos por tratamento da desulforedoxina com o brometo de cianogênio

ácido aminado	CNBr FI	CNBr FII
Lisina	2	1
Histidina		
Arginina		
Triptofano		
Ácido aspartico	3	
Treonina	0,9	
Serina(homoserina)	1	
Ácido glutâmico	6	1
Prolina		
Glicina	6	
Alanina	1	
Cistina (Meia)	3,8	1
Valina	5	
Metionina		
Isoleucina		
Leucina	3	
Tirosina	0,8	
Fenilalanina		
Rendimento	45%	27%
Total de resíduos	33	3

O peptídeo CnBr FII foi identificado como sendo o peptídeo contendo o N-terminal, uma vez que a carboxipeptidase libertou Val-Lis-Gln

CnBr-FI

1				5					10					15
Ala	Asn	Glu	Gli	Asp	Val	Tir	Lis	Cis	Glu	Leu	Cis	Gli	Gln	Val
→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→

19

-Val	Lis	Val	Leu...
→	→	→	→

CnBr-FII

Val-Lis-Gln

→	→	→
---	---	---

Figura III.12 → Sequência de ácidos aminados dos peptídeos obtidos pelo brometo de cianogênio na desulforedoxina

III.3.11.4 - Peptídeos Obtidos por Hidrólise Triptica

Os peptídeos obtidos por digestão da desulfiredoxina com a tripsina foram purificados por electroforese de alta voltagem a pH=6,5 e posteriormente a pH=3,5 e 2,0. Fez-se a oxidação pelo ácido perfórmico no papel.

Na Tabela III.6 mostram-se análises dos ácidos aminados dos peptídeos obtidos. As sequências de alguns destes peptídeos foram obtidas pelo método da fase líquida em tampão de DMBA.

De acordo com a sequência de N-terminal, pode identificar-se o peptídeo T₁a₁ (resíduos 1-8) como o peptídeo correspondente ao N-terminal. O peptídeo T₁c corresponde ao resíduo C-terminal. O peptídeo T₁d pela composição de ácidos aminados corresponde praticamente ao restante da sequência não tendo sido portanto hidrolisada a ligação Lis-Val^{17 18}.

O único peptídeo sujeito a sequência de ácidos aminados foi o T₁d cujo resultado foi o seguinte:

Cis-Glu-Leu-Cis-Gli-Glu-Val-Val-Lis-Val-Leu-Glu-Glu-Gli...
→ → → → → → → → → → → → →

Figura III.13 - Sequência de ácidos aminados do peptídeo T₁d obtido por hidrólise triptica.

TABELA III.6

Composição em ácidos aminados dos peptídeos obtidos por hidrólise com a tripsina

Ácido aminado	T _{1a1}	T _{1c}	T _{1d}	T _{2d}
Lisina	1		2	1
Histidina				
Arginina				
Triptofano				
Ácido aspártico	2		1	1
Treonina			1	1
Serina				
Ácido Glutâmico	2	1	5-6	3
Prolina				
Glicina	1		4-5	3-4
Alanina	1			
Cistina(Meia)			4	2
Valina	1		4-5	2-3
Metionina			1	1
Isoleucina				
Leucina			3	2
Tirosina	1			
Fenilalanina				
Total	8	1	26-28	16-18
Rendimento	60%	21%	20%	7%
Purificação	pH6,5 pH3,5 e pH2,0	pH6,5 pH3,5 e pH2,0	pH6,5 e pH3,5	pH6,5 pH3,5 e pH2,0

III.3.11.5 - Peptídeos Obtidos por Hidrólise com a Protease
de Staphilococcus aureus

Os peptídeos obtidos por digestão da desulforedoxina com a protease de Staphilococcus aureus foram separados e analisados pela técnica de "finger print". Foram oxidados pelo ácido perfórmico no papel.

A mobilidade electroforética "m" foi medida a pH=6,5 relativa à lisina com um sinal positivo para os peptídeos básicos e relativa ao aspártico com um sinal negativo para os peptídeos acídicos.

Na Tabela III.7 mostram-se as análises em ácidos aminados destes peptídeos. As sequências foram obtidas pelo método da fase sólida, ou pelo método da fase líquida em tampão DMBA. Os estudos das sequências estão sumarizados na Tabela III.8.

Os peptídeos G-4a (resíduos 1-3) e G-4b (resíduos 4-10) fazem parte do N-terminal da proteína. A ordem dos peptídeos G-3, G-4d e G-4c foi inequivocamente estabelecida pelo facto de a sequência ser conhecida até ao resíduo 32, pela passagem directa da proteína no sequenciador automático.

Alguns resíduos que não foram identificados a partir da proteína inteira foram também caracterizados. Por exemplo a presença de cisteína nas posições 28 e 29 e a sequência da parte C-terminal da proteína (resíduos 32-36) foi estabelecida a partir dos peptídeos G-4c e G-4d.

TABELA III.7

Composição em ácidos aminados dos peptídeos obtidos por hidrólise com a protease de Staphilococcus aureus

ácido aminado	G-3	G-4a	G-ab	G-4c	G-4d
Lisina	1		1	1	
Histidina					
Arginina					
Triptofano					
Ácido aspártico		1	1	1	1
Treonina				1	1
Serina					
Ácido Glutâmico	2	1	1	2	3
Prolina					
Glicina	1		1	4	4
Alanina		1			
Cistina (Meia)	1		1	2	2
Valina	3		1	2	2
Metionina*				1	1
Isoleucina					
Leucina	2			1	1
Tirosina			1		
Fenilalanina					
Total	10	3	7	15	16
Rendimento	53%	52%	49%	17%	26%
Purificação**	pH6,5 pH3,5 pH2,0	pH6,5 e pH3,5	pH6,5 e pH3,5	pH6,5 e pH3,5	pH6,5 pH3,5 pH2,0

* Como ácido cisteico e metionina sulfona depois de oxidação pelo ácido perfórmico.

** Electroforese em papel a pH 6,5, 3,5 e 2,0.

TABELA III.8

Sequência em ácidos aminados dos peptídeos obtidos por hidrólise com a protease de staphylococcus aureus

Peptídeo	posição na cadeia	Sequência
G-3	11-20	Leu-Cis-Gli-Gln-Val-Val-Lis- → → → → → → val-Leu~Glu → → →
G-4a	1-3	Ala-Asn-Glu
G-4b	4-10	Gli-Asp-Val-Tir-Lis-Cis-Glu → → → → → →
G-4c	22-36	Gli-Gli-Gli-Thr-Leu-Val-Cis- → → → → → → Cis-Gli-Glu-Asp-Met-Val-Lis- → → → → → → (Gln) →
G-4d	21-36	Glu-Gli-Gli-Gli-Thr-Leu-Val- → → → → → → Cis-Cis-Gli-Glu-Asp-Met-Val- → → → → → → Lis-Gln → →

As meias setas indicam os resíduos que foram identificados usando o sequenciador de proteínas. Os parentesis indicam que os resíduos naquelas posições não puderam ser identificados.

A sequência total da desulforedoxina pode portanto ser estabelecida após a obtenção da sequência destes peptídeos, com a ajuda do N-terminal já determinado. O resultado é apresentado na Figura III.14.

1	5	10	15
Ala-Asn-Glu-Gli-Asp-Val-Tir-Lis-Cis-Glu-Leu-Cis-Gli-Gln-Val			
	20	25	30
-Val-Lis-Val-Leu-Glu-Glu-Gli-Gli-Gli-Tre-Leu-Val-Cis-Cis-Gli			
	35		
-Glu-Asp-Met-Val-Lis-Gln			

Figura III.14 - Sequência de ácidos aminados da desulforedoxina de D.gigas

III.3.12 - DISCUSSÃO

A composição em ácidos aminados da desulforedoxina é bastante invulgar (Tabela III.3). Tal como a rubredoxina não contém histidina e arginina. Outros resíduos ausentes são a prolina, a isoleucina, a fenilalanina, o triptofano e a serina. No total estão ausentes sete tipos de resíduos de ácidos aminados. Vale a pena frisar a ausência de prolina, cujo conteúdo tem sido relacionado com a estabilidade da estrutura terciária das proteínas (51).

A sequência total da desulforedoxina de D.gigas foi determinada pela degradação da proteína inteira no sequenciador de proteínas e pela determinação da sequência dos peptídeos obtidos pela digestão com a protease e S.aureus (Figura III.14). O peso molecular da desulforedoxina determinado por filtração em Sephadex G-50 é 7 900, o que corresponde a uma cadeia de 73 ácidos aminados. No entanto a composição em ácidos aminados mínima é de 36. A elucidação da sequência mostra que a desulforedoxina consiste de duas cadeias idênticas de um peptídeo contendo 36 ácidos aminados.

De facto, o corte pelo brometo de cianogénio, a hidrólise pela peptidase isolada de S.aureus, a hidrólise pela tripsina e a acção da carboxipeptidase mostraram que a desulforedoxina é composta de duas cadeias idênticas de 36 ácidos aminados.

O grau de homologia entre as sequências da desulforedoxina e as sequências conhecidas das rubredoxinas é

pequeno. Só no N-terminal é conservada a sequência Tir-x-Cis-x-x-Cis-Gli. Se fizermos alinhar as cisteínas da segunda metade a única coincidência é a sequência Cis-Gli da última cisteína. (Figura III.15).

A cadeia polipeptídica da desulforedoxina tem as quatro cisteínas nas posições 9, 12, 28 e 29. As várias rubredoxinas cujas sequências são conhecidas (14, 15, 52) têm as cisteínas nas posições 6, 9, 39 e 42 e sabe-se que elas são ligandos do único átomo de ferro. As experiências realizadas com o ácido iodoacético (secção II.7 e 8) e a titulação com PCMB sugere que as quatro cisteínas na desulforedoxina estão ligadas ao ferro.

Olhando para a sequência invulgar dos resíduos de cisteína na desulforedoxina podemos pensar que é este facto que confere propriedades distintas ao cromóforo.

Existem duas possibilidades em relação à formação desta proteína. Uma das possibilidades é a de cada átomo de ferro estar ligado às quatro cisteínas da mesma cadeia polipeptídica e neste caso a modificação do cromóforo é devida à posição adjacente das cisteínas 28 e 29.

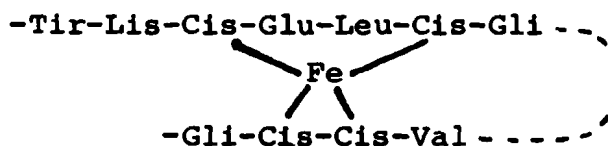


Figura III.16

	1	5	10
Dx	Ala-Asn-Glu-Gli-Asp-Val-	Tir-Lis-	Cis-Glu-Leu-
<u>D.g.</u> rb	Met-Asp-Ile-	Tir-Val-	Cis-Tri-Val-
<u>D.v.</u> rb	Met-Lis-Lis-	Tir-Val-	Cis-Thr-Val-
<u>C.p</u> rb	Met-Lis-Lis-	Tir-Val-	Cis-Thr-Val-
	15	20	
	Cis-Gli-Gln-Val-Val-Lis-Val-Leu-Glu-Glu-Gli-		
	Cis-Gli-Tir-Glu-Tir-Asp-Pro-Ala-Lis-Gli-Asp-		
	Cis-Gli-Tir-Glu-Tir-Asp-Pro-Ala-Lis-Gli-Asp-		
	Cis-Gli-Tir-Ile-Tir-Asp-Pro-Glu-Asp-Gli-Asp-		
	25	30	
	Gli-Gli-Thr-Leu-Val-Cis-	Cis-Gli-Glu-Asp	
..... 16 a.a.	Asp-Asp-Trp-Ala-Cis-Pro-Val-	Cis-Gli-Ala-Ser-	
.....	Asp-Asp-Trp-Ala-Cis-Pro-Val-	Cis-Gli-Glu-Ser-	
.....	Ala-Asp-Trp-Ala-Cis-Pro-Val-	Cis-Gli-Glu-Ser-	
	35		
	Met-Val-Lis-Gln		
	Lis-Asp-Ala-Fen-Glu-Lis-Gli-Asp-		
	Lis-Asp-Glu-Fen-Glu-Glu-Gli-Glu-Glu		
	Lis-Asp-Glu-Fen-Glu-Ala-Gli		

Figura III.15

Comparação das sequências de ácidos aminados da
desulfiredoxina de D.gigas e das rubredoxinas de
D.gigas, D.vulgaris e C.pasteurianum.

A outra possibilidade é a de três cisteínas de uma cadeia como por exemplo as cisteínas 9, 12 e 28 actuarem como ligandos de um dos átomos de ferro e as cisteínas 9', 12' e 28' da segunda cadeia actuarem como ligandos do segundo átomo de ferro deixando a cisteína 29 para a quarta ligação do segundo átomo de ferro e a cisteína 29' como ligando da quarta posição do primeiro átomo de ferro.

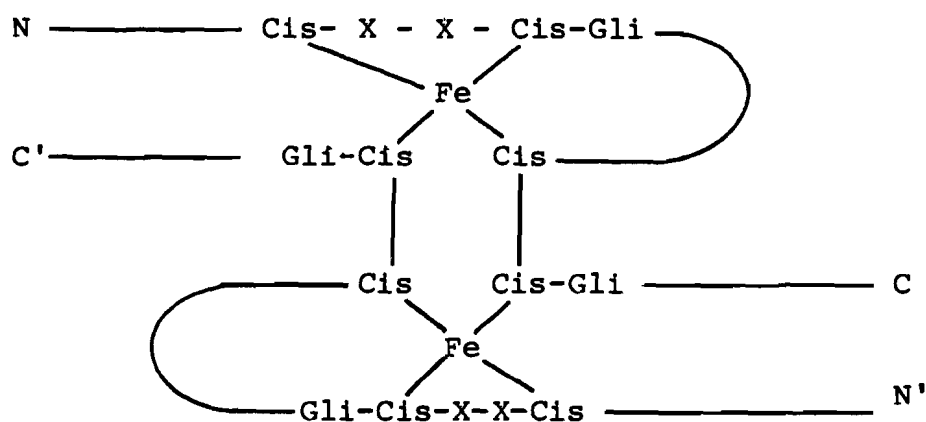


Figura III.17

A elucidação de qual destas estruturas será a verdadeira só pode ser conseguida pelo conhecimento da estrutura de Raios-X. A desulforedoxina já foi cristalizada por Sieker (53) e os estudos de Raios-X estão em progresso.

III.4 - ANÁLISE DO ESPECTRO DE VISÍVEL E DOS ESPECTROS DE
DICROÍSMO CIRCULAR MAGNÉTICO DA DESULFOREDOXINA -
- COMPARAÇÃO COM A RUBREDOXINA

III.4.1 - TEORIA

A análise do espectro óptico da rubredoxina, feita por Eaton e Lovenberg com a ajuda de espectros polarizados de um cristal único e do espectro de dicroísmo circular magnético (DCM) à temperatura ambiente permite tirar as seguintes conclusões (31): duas transições de transferência de carga do enxofre para o ião férrico dominam o espectro entre 15 000 e 30 000 cm^{-1} . As duas transições são ambas permitidas, sendo de ${}^6A_1 \rightarrow {}^6T_1$ e de parentesco tetraédrico. Ambos os estados excitados estão sujeitos a distorções axiais. Os picos a 26 200 e 20 200 cm^{-1} foram atribuídos à transição ${}^6A_1 \rightarrow {}^6E$ e os picos a 28 800 e 17 700 cm^{-1} à transição ${}^6A_1 \rightarrow {}^6A_2$. O desdobramento rômico do estado excitado é menor do que metade da distorção axial. Pelo uso dos dados de polarização do cristal único foi possível relacionar o eixo da distorção axial com a geometria do estado fundamental. O único eixo de distorção tem de ser ao longo do eixo S_4 do tetraedro $\text{Fe}(\text{S-R})_4$ sugerindo uma geometria do estado excitado do tipo D_{2d} .

Um estado excitado 6T_2 de parentesco tetraédrico pode ser desdobrado por distorções estáticas na vizinhança ou por acoplamento spin-órbita. Para ilustrar o efeito destas duas perturbações actuando conjuntamente Rivoal et al. (54) calcularam as matrizes da distorção uniaxial estática ao longo do eixo S_4 , gerando uma simetria D_{2d} , e a do acoplamento spin-órbita.

Na Figura III.18 indicam-se as energias resultantes, em função da razão entre os dois parâmetros, o parâmetro de distorção axial V , e o parâmetro de acoplamento spin-órbita Δ , ambos definidos nesta figura. No limite de distorção axial nulo os três estados de spin-órbita provenientes de 6T_2 estão separados em energia por $5\Delta/12$ ($J=7/2$), $-2\Delta/12$ ($J=5/2$) e $-7\Delta/12$ ($J=3/2$). Por outro lado, no limite de não-acoplamento spin-órbita temos só dois estados 6E e 6B_2 . Um diagrama semelhante foi também construído para uma distorção estática de sinal oposto ao apresentado (54).

Estudando a variação de temperatura do espectro de DCM pode medir-se a contribuição do acoplamento spin-órbita na distorção do estado 6T_2 . No limite de acoplamento spin-órbita nulo o espectro de DCM correspondente às transições ${}^6A_1 \rightarrow {}^6E$ e 6B_2 seria independente da temperatura e consistiria de um termo a_1 e de um termo b_0 respectivamente. No outro extremo, de distorção axial zero e um acoplamento de spin-órbita de 1.^a ordem, o espectro consistirá essencialmente de três termos c_0 dependentes da temperatura, dois positivos e um negativo, correspondendo a transições do estado fundamental das componentes de 6T_2 , nomeadamente $U'_{3/2}$, $E'_{5/2} + U'_{5/2}$ e $E'_{7/2} + E''_{7/2} + U''_{7/2}$.

Além disso, uma análise do momento da banda completa permite estimar o valor do sinal da constante de acoplamento spin-órbita do estado excitado (55). O sinal deste parâmetro pode dar uma indicação do tipo de orbital envolvido na transição de carga.

As experiências realizadas a baixa temperatura por Rivoal et al. (54) evidenciam a presença de duas transições de transferência de carga na região entre 15 000 e 28 000 cm^{-1} . O primeiro

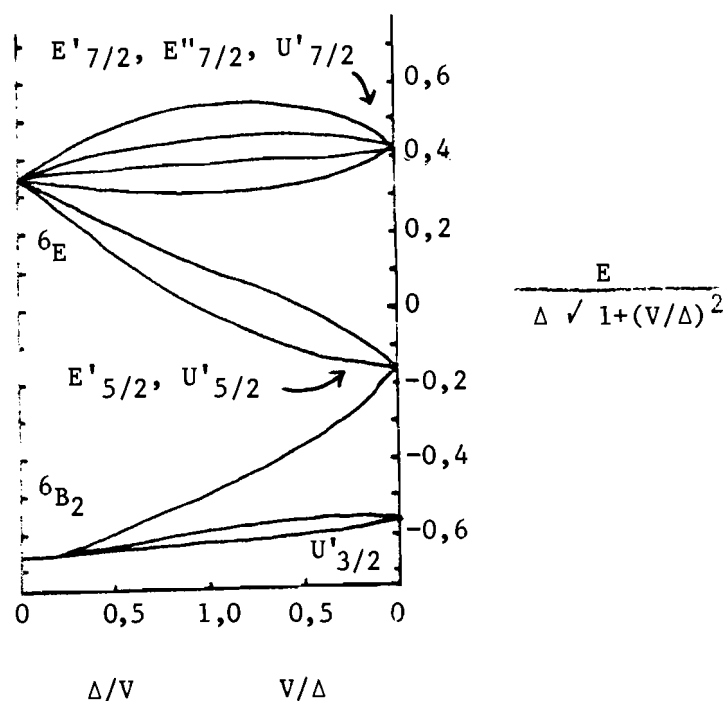


Figura III.18 - Diagrama dos níveis de energia, mostrando o efeito da aplicação da perturbação spin-orbita e distorção axial (D_{2d}) a um estado 6T_2 . No caso da rubredoxina oxidada a transferência de carga do enxofre para o ferro permitida é 6T_2 no grupo T_d . As escalas de energia estão normalizadas e os parâmetros V , distorção axial e Δ , parâmetro do acoplamento spin-orbita são definidos do seguinte modo: $V = -3/2 \langle {}^6T_2^0 | V_{D2d} | {}^6T_2^0 \rangle$
 $\Delta = -2/\sqrt{35} \langle {}^6T_2 || \Sigma \underline{s} \cdot \underline{u} || {}^6T_2 \rangle$

momento da banda de menor energia é consistente com uma transição orbital $t_1 \rightarrow 2e$. O valor de $\Delta \approx 85 \text{ cm}^{-1}$ determinado experimentalmente pode ser usado para se determinar a importância relativa do parâmetro de distorção axial V , necessário para obter a separação de energia entre os picos a $17\,800$ e a $20\,500 \text{ cm}^{-1}$. Examinando a Figura III.18 vê-se que o espectro só é compatível com um valor de Δ/V muito menor do que $0,1$. Uma vez que Δ é muito pequeno, V deve ser o responsável pela grande separação dos dois picos no espectro de absorção. Portanto, V pode ser considerado igual a $2\,500 \text{ cm}^{-1}$ e $\Delta/V < 0,01$. Isto confirma o ponto de vista de Eaton e Lovenberg, que consideram que a distorção axial é responsável pelo desdobramento da banda. O acoplamento spin-órbita é importante para explicar a dependência da temperatura do espectro de DCM.

Esta análise só permite tirar conclusões acerca da geometria do estado excitado de transferência de carga de menor energia. Isto não está directamente relacionado com a simetria do estado fundamental, como é observado por RPE, Raios-X ou EXAFS.

III.4.2 - ESPECTRO ÓPTICO DA DESULFOREDOXINA DE D.gigas

Na Figura III.19 apresenta-se o espectro de Ultra-Violeta e Visível da desulforedoxina comparado com o da rubredoxina de D.gigas.

O espectro da rubredoxina de D.gigas é semelhante aos espectros obtidos para outras rubredoxinas (11,46,56,57,58,13,59).

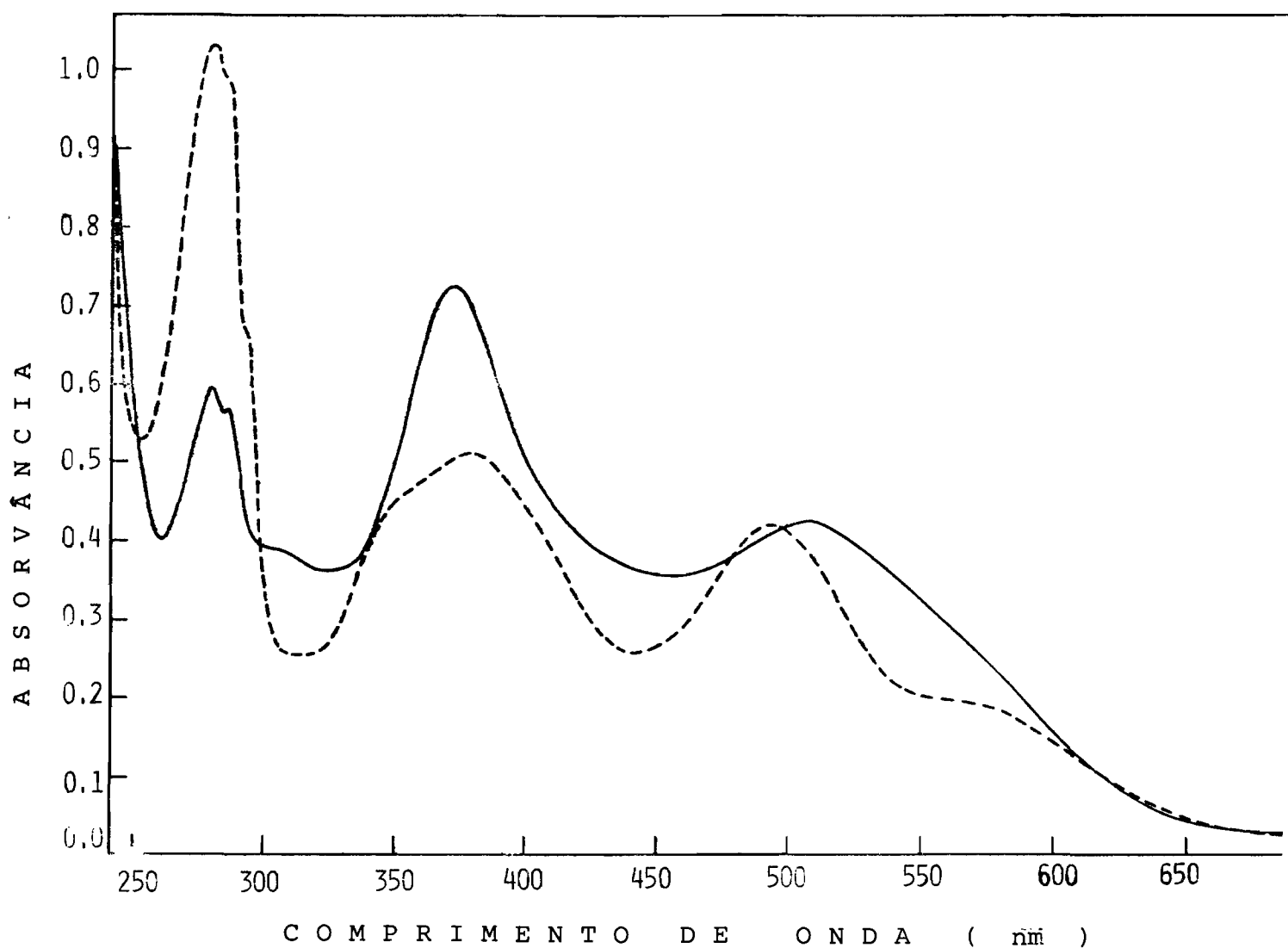


Figura III.19. Espectro de u.v.-visível da desulforedoxina de D.gigas (—) e rubredoxina de *D.gigas* (-----) na forma oxidada. As concentrações são $9,6 \cdot 10^{-5}$ M e $6,0 \cdot 10^{-5}$ M respectivamente (em ferro) .

A análise do espectro pode ser feita de maneira semelhante ao realizado por Eaton e Lovenberg (31) e Rivoal et al. (54). As bandas a 515 e 493 nm são portanto resultado de um desdobramento do primeiro estado excitado devido a um abaixamento de simetria.

Se compararmos os espectros da desulforedoxina e da rubredoxina nos seus traços gerais, eles são bastante semelhantes. No entanto, no espectro de Visível da desulforedoxina não é discernível o desdobramento das bandas, distintamente observado no espectro da rubredoxina. Em primeira análise, estas observações levam-nos a concluir que o primeiro estado excitado de transferência de carga não está desdobrado, o que indicaria uma maior simetria para o caso da desulforedoxina.

III.4.3 - ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR MAGNÉTICO

Para aprofundar melhor as diferenças entre a desulforedoxina e a rubredoxina traçaram-se os seus espectros de dicroísmo circular magnético (DCM) a baixa temperatura, para as formas oxidadas e reduzidas. Nas Figuras III.21 e 22, apresenta-se uma comparação dos espectros das duas proteínas. Os espectros da rubredoxina de D.gigas são semelhantes aos observados por Eaton e Lovenberg (31) e Rivoal et al. (54) para outras rubredoxinas.

Como se pode ver no espectro de DCM a baixa temperatura, a banda correspondente à do espectro de visível a 507 nm apresenta-se desdobrada. No entanto não é tão nítido o desdobramento, em comparação com o da rubredoxina e a diferença entre os dois máximos é muito menor. Isto está de acordo com as conclusões

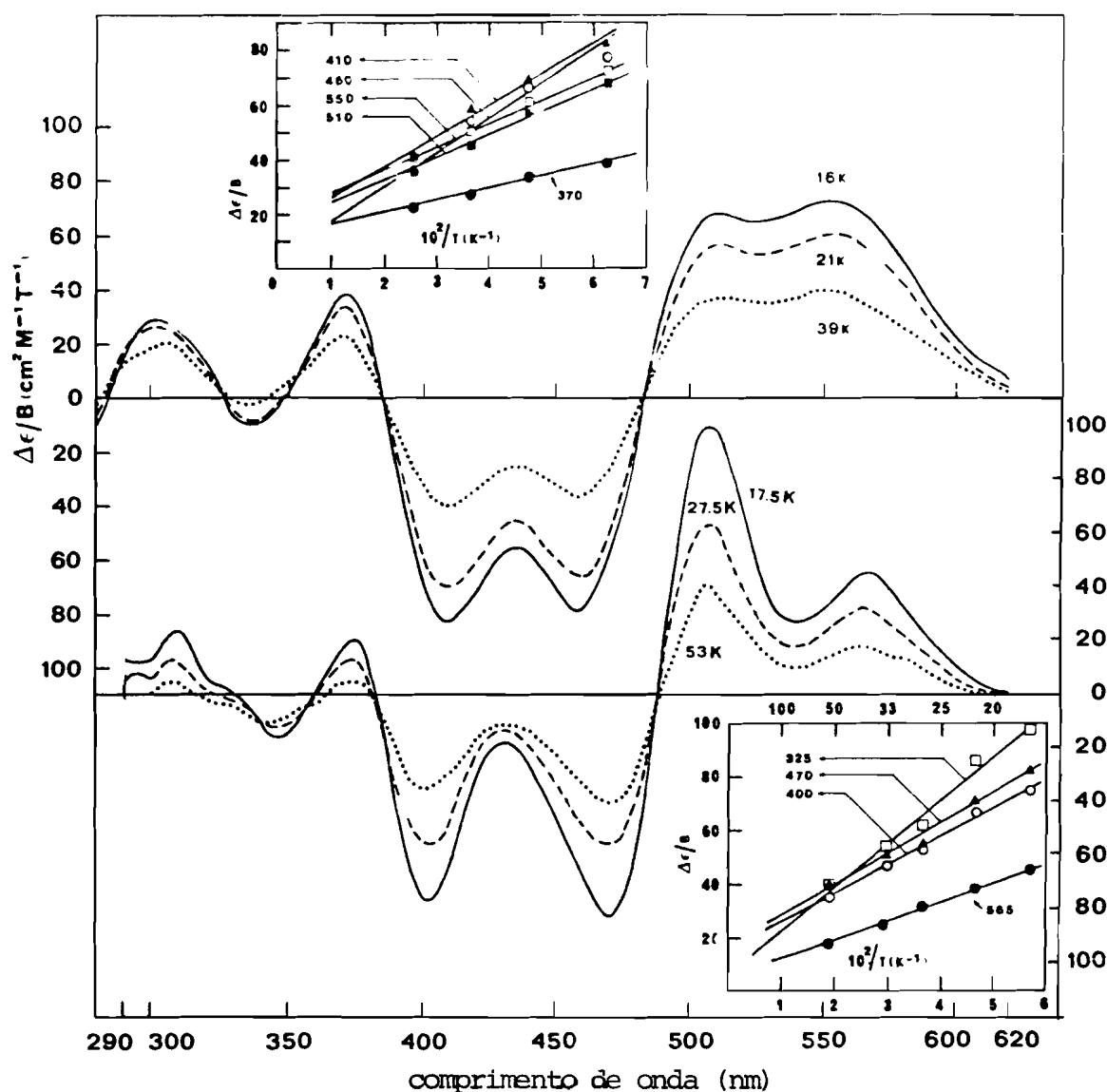


Figura III.20. Espectros de dicroísmo circular magnético das formas oxidadas da desulforedoxina (A) e rubredoxina (B) de D.gigas às temperaturas indicadas. Inseridas na figura são indicadas a dependência da temperatura de algumas das bandas de absorção.

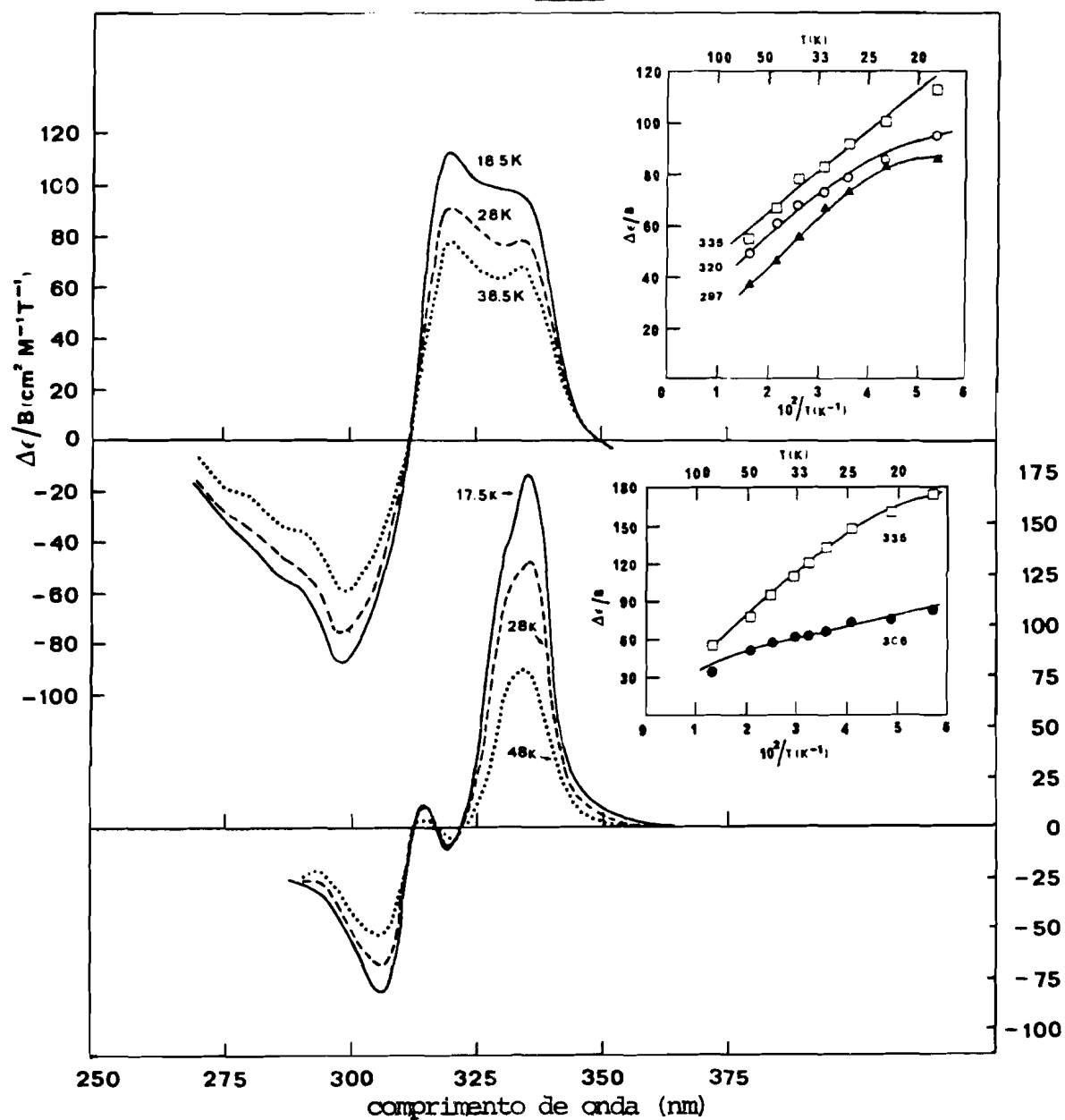


Figura III.21. Espectros de dicroísmo circular magnético das formas reduzidas da desulfiredoxina (A) e rubredoxina (B) de D.gigas às temperaturas indicadas. Inseridas na figura são indicadas a dependência da temperatura de algumas bandas de absorção.

que se tinham tirado quando da observação do espectro de visível. O desdobramento do 1º estado excitado de transferência de carga é menor no caso da desulforedoxina.

III.5 - ESTUDOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA DESULFO- REDOXINA DE *D.gigas* - COMPARAÇÃO COM A RUBREDOXINA

III.5.1 - INTRODUÇÃO

A ressonância magnética nuclear tem sido pouco aplicada a rubredoxinas, sendo a rubredoxina de *C.pasteurianum* a única à qual foi aplicada esta técnica (42). A razão principal do pouco sucesso obtido por aplicação desta técnica deve-se ao elevado momento magnético do ferro de spin elevado das duas formas redox e à elevada relaxação dipolar com ele associada.

As susceptibilidades magnéticas desta proteína nos dois estados de oxidação foram determinadas pelo método de RMN descrito na Secção II.10.1 e obedecem à lei de Curie. Philips et al. (42) determinaram um valor de $5,85 \pm 0,2 \mu\text{B}$ para a forma oxidada e $5,05 \pm 0,2 \mu\text{B}$ para a forma reduzida (48). Estes resultados são compatíveis com ferro(III) the spin alto na forma oxidada e ferro (II) de spin alto na forma reduzida.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de proteínas sem estrutura terciária podem ser reproduzidos relativamente bem por uma sobreposição dos espectros dos ácidos aminados componentes entrando com a proporção relativa destes (60). No entanto, o espectro de RMN de uma proteína diamagnética é geralmente diferente do espectro obtido para a forma desnaturada, devido a perturbações locais resultantes do enrolamento da cadeia polipeptídica. Além disso, na rubredoxina as ressonâncias devem ser afetadas por desvios de contacto e efeitos de relaxação devido ao paramagnetismo de ambas as formas redox da proteína.

A identificação de ressonâncias sujeitas a desvios de contacto é relativamente fácil pois a sua dependência da temperatura é semelhante à da susceptibilidade magnética. As ressonâncias não afectadas por desvios de contacto são independentes da temperatura a não ser que a proteína sofra mudanças conformacionais com a temperatura.

As ressonâncias dos prótons não permutáveis de uma proteína nativa (os prótons CH da cadeia lateral e os prótons -CH da cadeia principal) encontram-se na região de -2 a 9 ppm.

As ressonâncias que ocorrem fora desta região podem ser devidas a prótons sujeitos a campos produzidos por correntes de anel devidas a anéis aromáticos, ou a prótons sofrendo interacções de contacto do centro paramagnético.

Na Figura III.22 apresentam-se os espectros de RMN da forma oxidada e reduzida da rubredoxina de C.pasteurianum (42). Os espectros das duas formas são diferentes. Na rubredoxina existe a possibilidade de em ambos os estados redox haver ressonâncias desviadas por interacção de contacto e alargadas por relaxação dipolar. Nas zonas de +9 a +40 ppm e de -1,5 a -27 ppm foram pesquisadas ressonâncias sujeitas a desvios de contacto. As únicas ressonâncias dependentes da temperatura foram as ressonâncias designadas por ϵ , ϕ e η na forma reduzida (Figura III.23).

Devido às larguras destas linhas, posição e dependência da temperatura, os prótons que originaram estas ressonâncias devem estar sujeitos a desvios do tipo pseudo-contacto. A ausência de outros desvios de contacto nos espectros de ambos os estados redox da rubredoxina só pode ser atribuído ao elevado momento magnético do ferro de spin-alto em ambos os estados de oxidação e à elevada relaxação dipolar. Neste caso os prótons afectados estariam tão desviados e alargados que seria impossível detectá-los.

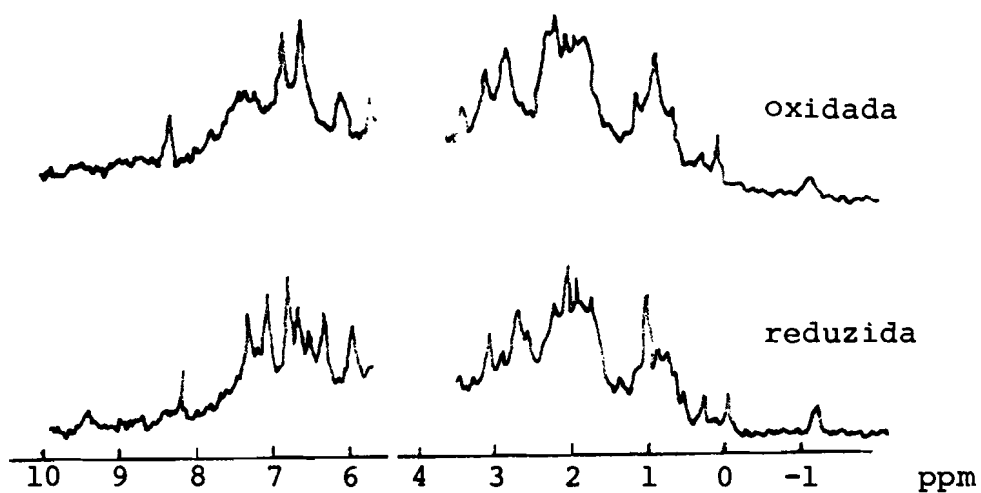


Figura III.22 - Espectro de RMN da rubredoxina de C.pasteurianum a 220 MHz, T = 318 K (42).

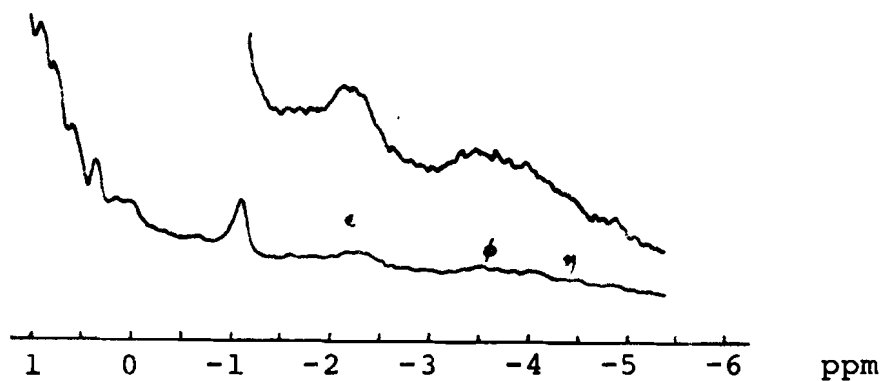


Figura III.23 - Espectro de RMN da região a campo alto da rubredoxina reduzida de C.pasteurianum a 220 MHz, T = 300 K (42).

Possivelmente a única razão para o facto de observarem três ressonância na forma reduzida é o momento magnético do ferro (II) ser muito menor.

III.5.2 - RESULTADOS

III.5.2.1 - Susceptibilidade Magnética

Determinaram-se as susceptibilidades magnéticas da rubredoxina e desulforedoxina de D.gigas na forma oxidada e reduzida pelo método descrito na Secção II.10.1. Ambas as formas oxidada e reduzida das duas proteínas são paramagnéticas e as suas susceptibilidades magnéticas seguem a lei de Curie.

Na Tablea III.9 apresentam-se os valores dos momentos magnéticos efectivos de ambas as proteínas nos dois estados de oxidação, assim como uma comparação com o valor obtido para a rubredoxina de C.pasteurianum.

TABELA III.9

	forma oxidada		forma reduzida		T(°C)
	$10^3 \cdot \chi_M^P$	μ_{eff}	$10^3 \cdot \chi_M^P$	μ_{eff}	
Desulforedoxina	18,1	5,70	13,10	4,90	25
Rubredoxina	13,62	5,73	10,13	4,96	28
Rubredoxina de <u>C.pasteurianum</u> (48)		5,85		5,05	4-60

Os valores dos momentos magnéticos da rubredoxina e desulforedoxina de D.gigas mostram que o ferro está na forma de Fe(III) com spin alto na forma oxidada e na forma Fe(II) com spin alto na forma reduzida. Os valores são semelhantes aos da rubredoxina de C.pasteurianum (42). Em relação às propriedades magnéticas parece não haver diferença entre o centro de ferro da rubredoxina e o da desulforedoxina.

III.5.2.2 - Espectros de R.M.N.

Na Figura III.24 apresenta-se o espectro de RMN da forma oxidada e reduzida da rubredoxina de D.gigas. Os espectros não diferem grandemente dos obtidos com a rubredoxina de C.pasteurianum. Não se observam outras ressonâncias nas regiões de -5 a -27,5 ppm e de +10,0 a +40,0 ppm. A rubredoxina oxidada contudo origina espectros com pior resolução do que a rubredoxina reduzida, especialmente na região de campo baixo. Não se observaram picos deslocados da região normal de um espectro de uma proteína e portanto não há picos que possam ser identificados imediatamente como estando sujeitos a desvios de contacto.

Na Figura III.25 apresentam-se os espectros de RMN da forma oxidada e reduzida da desulforedoxina de D.gigas. São espectros de baixa resolução devido sobretudo ao paramagnetismo dos dois estados redox. Como acontece na rubredoxina, não se observam ressonâncias na região de -27,5 a -1,5 ppm e de +10 a +40 ppm. Portanto, não há ressonâncias que possam ser identificadas imediatamente como sujeitas a desvios de contacto. Na região aromática só deveria ser observada a ressonância do único resíduo aromático que é uma tirosina. No entanto, observa-se um conjunto de resso-

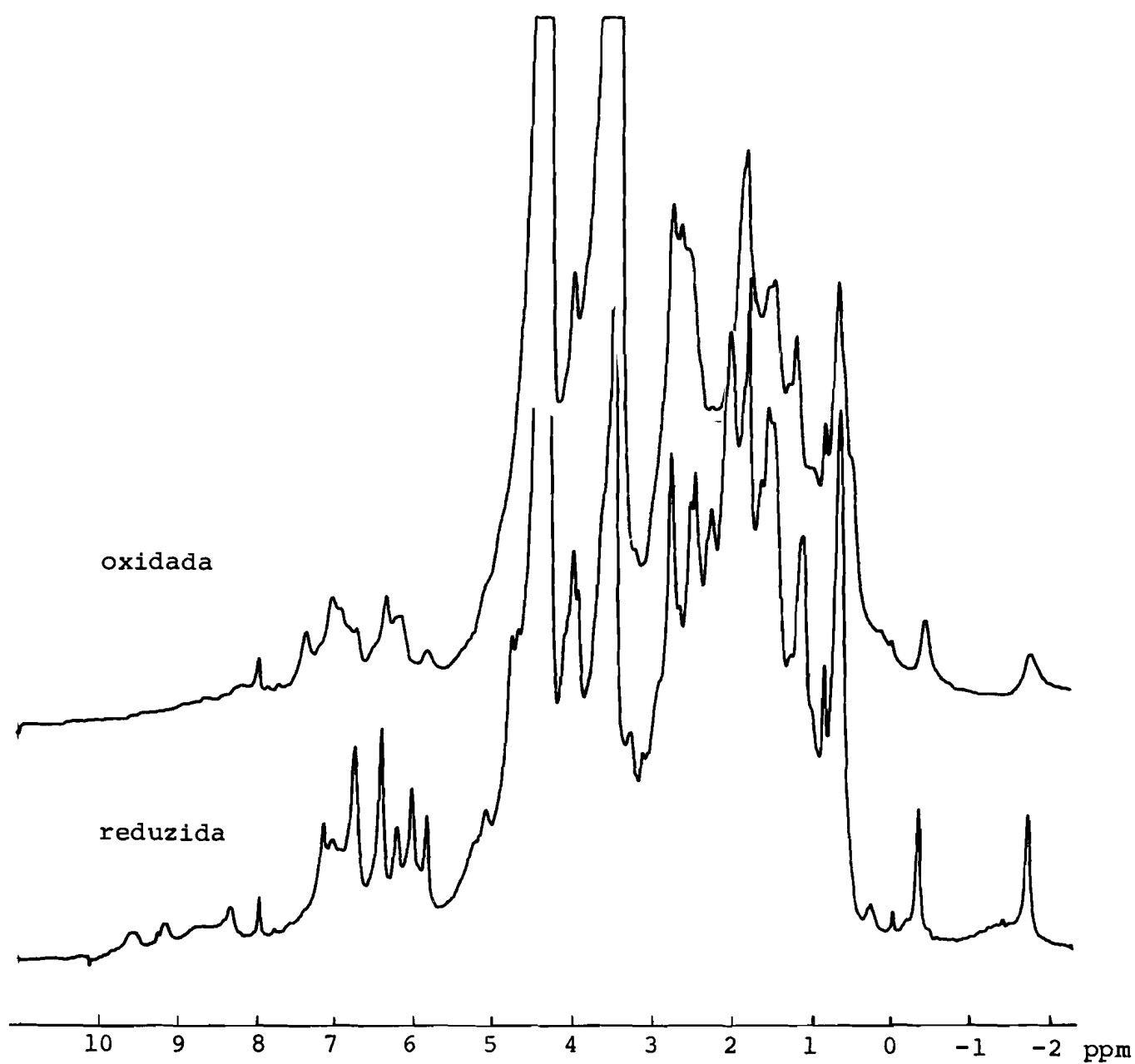


Figura III.24 - Espectro de RMN da rubredoxina de D.gigas a
270 MHz, T = 310 K

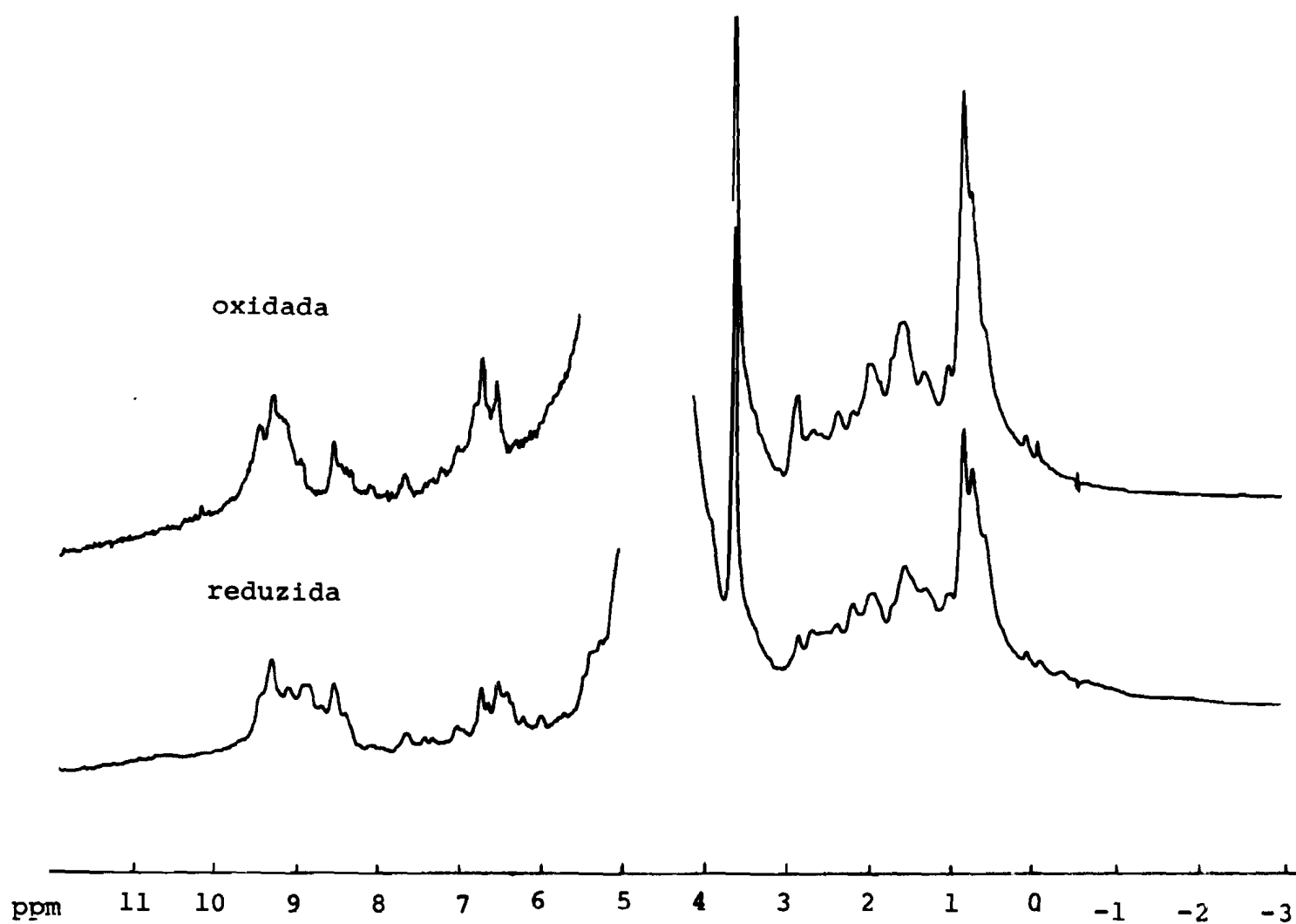


Figura III.25 - Espectro de RMN da desulfiredoxina de D.gigas a 270 MHz, T=303 K.

nâncias entre +10 e +5 ppm. Estas ressonâncias não são dependentes da temperatura, como se pode observar na Figura III.26.

Quando se desnatura uma amostra de desulforedoxina (por aquecimento prolongado a 100°C) e se realiza o espectro de RMN, só se observa na região aromática a ressonância da única tirosina desaparecendo todas as outras ressonâncias que se observam na região aromática da proteína nativa (Figura III.26). No entanto, se traçarmos espectros até temperaturas de 60°C, as ressonâncias da região entre 10 e 5 ppm não desaparecem.

A técnica de RMN não é a mais indicada para o estudo deste tipo de proteínas, como sugerimos anteriormente. Devido ao elevado momento magnético do ferro tanto na forma oxidada como na forma reduzida, os espectros resultantes são de baixa resolução e pouco informativos. Não se observam ressonâncias sujeitas a desvios de contacto ou de pseudo-contacto, pois a sua posição e largura devem torná-las muito difíceis de detectar.

Contudo, existe uma diferença entre o espectro da desulforedoxina e o da rubredoxina. São as ressonâncias que se observam na região aromática da desulforedoxina, independentes da temperatura. Uma possível explicação para a presença de ressonâncias na região aromática (sem pertencerem a resíduos aromáticos, uma vez que existe só uma tirosina) será a existência de uma região que, devido à estrutura da proteína, não é acessível à permuta com o solvente. Possíveis candidatos seriam os grupos NH da cadeia polipeptídica situados numa região em que a permuta não se pode dar.

Estudos de Raio-X em progresso poderão confirmar esta hipótese, que ficamos a aguardar com interesse.

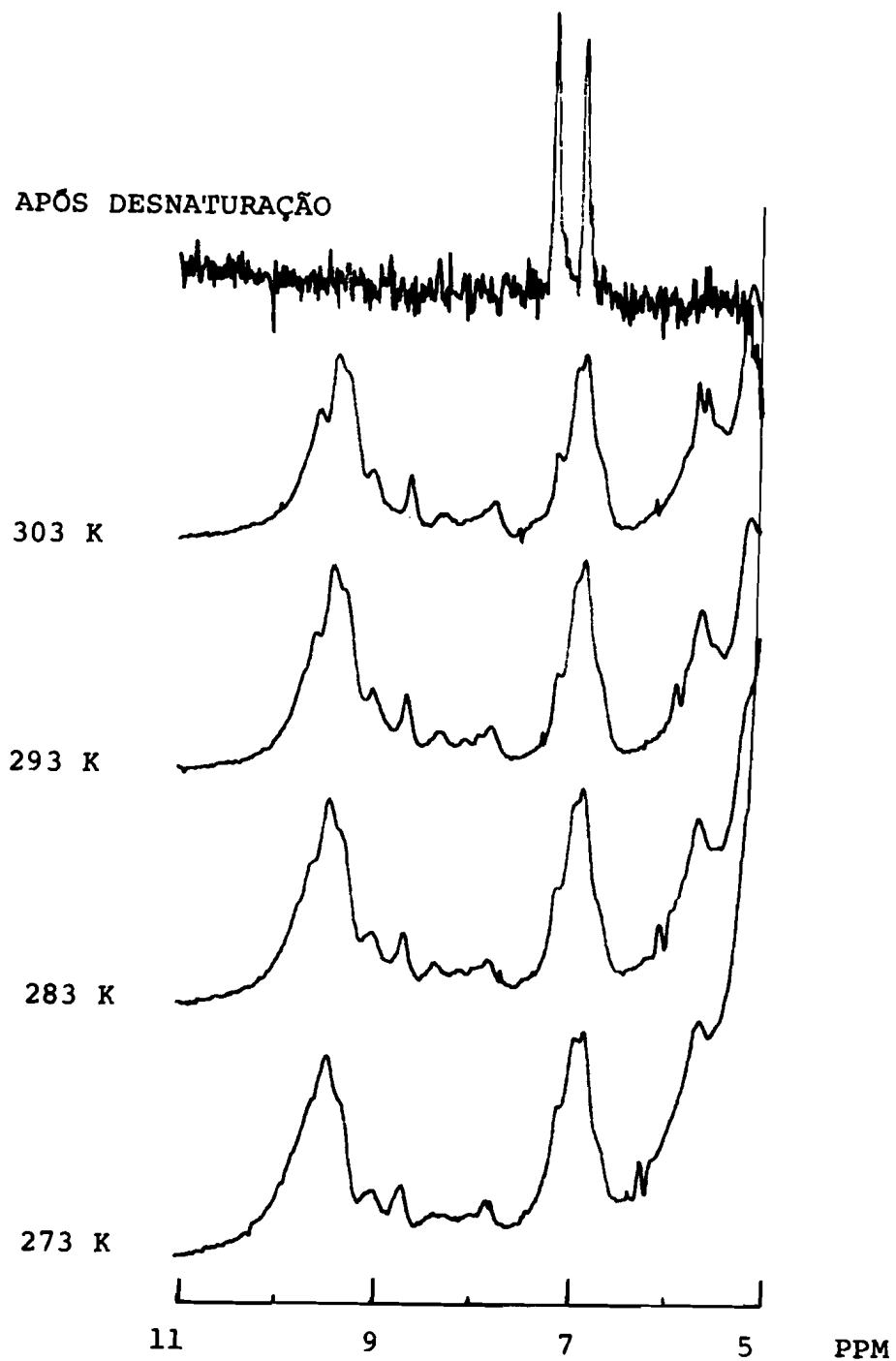


Figura III.26 - Dependência da temperatura da região aromática da desulforedoxina oxidada. O espectro superior representa a região aromática de uma amostra de desulforedoxina desnaturada.

III.6 - ESTUDOS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA
E DE MÖSSBAUER NA DESULFOREDOXINA - COMPARAÇÃO
COM A RUBREDOXINA

III.6.1 - INTRODUÇÃO À TEORIA DA ESPECTROSCOPIA DE MÖSSBAUER
E R.P.E.

Na espectroscopia de visível e U.V. o que se observa são transições entre o nível electrónico fundamental e o nível excitado. Na espectroscopia de Mössbauer, ou seja na ressonância nuclear por radiação γ as transições observadas dão-se entre o estado fundamental do núcleo e o seu primeiro estado excitado. Para o núcleo do ^{57}Fe a energia do quantum absorvido é uma radiação de energia $E_\gamma = 14,4 \text{ KeV}$ com uma largura a meia altura de $\Gamma = 4,7 \times 10^{-9} \text{ eV}$ (esta largura é dada pelo tempo de vida do estado excitado). A radiação monocromática ($\Gamma/E_\gamma = 3.10^{-13}$) emitida por uma fonte (^{57}Co embebido numa matriz apropriada tal como cobre ou rádio) penetra a amostra (a proteína em estudo) e a radiação transmitida é detectada por um contador proporcional.

Uma das maiores diferenças em relação aos outros tipos de espectroscopia é o facto de as absorções observadas corresponderem a transições altamente energéticas comparadas com as transições observadas entre os spins nucleares em RMN ou transições electrónicas observadas na espectroscopia de U.V. e visível. A fonte de radiação tem de ser um núcleo radioactivo do mesmo isótopo no qual a absorção ocorre. A fonte decai de um estado excitado para um estado fundamental, emite radiações e

excita um núcleo idêntico, pertencente à amostra absorvedora, ao mesmo estado excitado.

Uma das vantagens deste tipo de espectroscopia deve-se à relação fonte e absorvedor, o que torna inequívoca a origem química das linhas de absorção. Se a fonte é um isótopo excitado de ferro só os núcleos de ferro poderão absorver na amostra.

A variação da frequência num espectro de Mössbauer é feita por movimento da fonte. O facto da fonte ser um estado excitado de tempo de vida bastante grande faz com que a radiação seja altamente monocromática. Movendo a fonte em relação à amostra utiliza-se o efeito de Doppler electromagnético que modifica a energia da fonte de radiação γ conforme a fonte se afasta ou se aproxima da amostra. O desvio de Doppler na energia da fonte é $E_{\gamma}' = (v/c)E$ onde v é a velocidade da fonte e c é a velocidade da luz. A radiação transmitida através da amostra é registada em função da velocidade (para ^{57}Fe , $1\text{mm/s} = 48 \times 10^{-8} \text{ eV} = 11,6 \text{ MHz}$). Esta resolução é adequada para conseguir resolver as interacções hiperfinas (tipicamente da ordem de $5 \times 10^{-7} \text{ eV}$) do núcleo do ^{57}Fe com a vizinhança electrónica. Os desdobramentos hiperfinos dos níveis nucleares reflectem as interacções electrostáticas e magnéticas dos momentos nucleares com os electrões d. Por sua vez a distribuição dos electrões d depende da vizinhança química e estrutural do átomo de ferro.

Há dois factos que fazem com que a espectroscopia de Mössbauer seja uma técnica importante. Primeiro observa-se sempre um espectro de Mössbauer qualquer que seja a carga ou estado de spin do ferro (não há ferro silencioso em Mössbauer). Segundo, o espectro de Mössbauer é caracteris

tico do estado de oxidação e do valor de spin do ferro.

As proteínas de ferro enxofre que têm sido isoladas têm o átomo de ferro coordenado a quatro átomos de enxofre dispostos num tetraedro distorcido. Pela teoria do campo cristalino, a coordenação tetraédrica produz sempre um campo fraco e o ferro por consequência está no estado de alto-spin. Portanto, ferro férrico Fe^{3+} , $(3d)^5$ tem um spin $S=5/2$ e ferro ferroso Fe^{2+} $(3d)^6$ tem um spin $S=2$.

Os ferros III e II de alto spin mostram características específicas nos espectros de Mössbauer e é possível, em geral, caracterizar a carga e o estado de spin do ferro. Ferro(II) de alto spin tem geralmente um desvio isomérico mais positivo do que o ferro (III) de alto spin. Além disso o desvio isomérico é menor para coordenação tetraédrica do que para octaédrica e menor para ligandos sulfurados do que para os oxigenados (ver Tabela III.10).

TABELA III.10

	δ (mm/s)	$[\Delta E_Q]$ (mm/s)	$-A$ (MHz)
$\text{Fe}^{3+}-O(6)$	0,35-0,60	$\leq 0,9$	26-29
(4)	0,3-0,4	$\leq 0,9$	22-28
$\text{Fe}^{3+}-S(6)$	0,2-0,45	$\leq 0,8$	18-26
(4)	0,15-0,25	$\leq 0,5$	12-27
$\text{Fe}^{2+}-O(6)$	0,9-1,3	≤ 4	17-38
(4)	0,8-0,95	$\leq 2,5$	—
$\text{Fe}^{2+}-S(6)$	0,8-1,0	—	22
(4)	0,5-0,7	$\leq 3,2$	10-26

III.6.1.1 - O Hamiltoniano Nuclear

Os desdobramentos em energia dos níveis nucleares são descritos pelo hamiltoneano nuclear

$$\hat{H}_n = -g_n \beta_n \vec{H}_{\text{eff}} \cdot \vec{I} + \frac{eQ V_{zz}}{12} \left[3I_z^2 - \frac{15}{4} + \eta (I_x^2 - I_y^2) \right] \quad (1)$$

onde $g_n \beta_n \vec{I}$ é o momento magnético nuclear ($g_n = g_p = 0,180$ para o estado fundamental e $g_n = g_n = 0,103$ para o estado excitado). $\vec{H}_{\text{eff}}$ é um campo magnético efectivo que actua no núcleo. Este termo representa a interacção de Zeeman do momento nuclear $\mu_n = \beta_n g_n \vec{I}$ com um campo externo $\vec{H}$ (Figura III.27)

O segundo termo representa a interacção do momento de quadrupolo Q do estado excitado com um tensor do gradiente do campo eléctrico (V_{xx} , V_{yy} e V_{zz} são as componentes do tensor segundo os eixos principais; $\eta = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}}$ é o parâmetro de assimetria). Para o estado nuclear fundamental, $Q = 0$. Na ausência de interacções magnéticas $\vec{H}_{\text{eff}} = 0$ e só o estado excitado é desdobrado de um valor $\Delta E_Q = 1/2 e Q V_{zz} \sqrt{1 + 1/3 \eta^2}$. ΔE_Q é o desdobramento do quadrupolo e é dado em unidades de velocidade (Figura III.28).

Além das interacções de quadrupolo e magnéticas o espectro de Mössbauer dá-nos uma outra grandeza, o desvio isomérico, δ . Este último resulta da diferença da distribuição da carga nuclear nos estados fundamental e excitado. O desvio isomérico é proporcional à densidade electrónica, s , no núcleo e origina um desvio total do espectro, relativo à velocidade zero (ver Figura III.29).

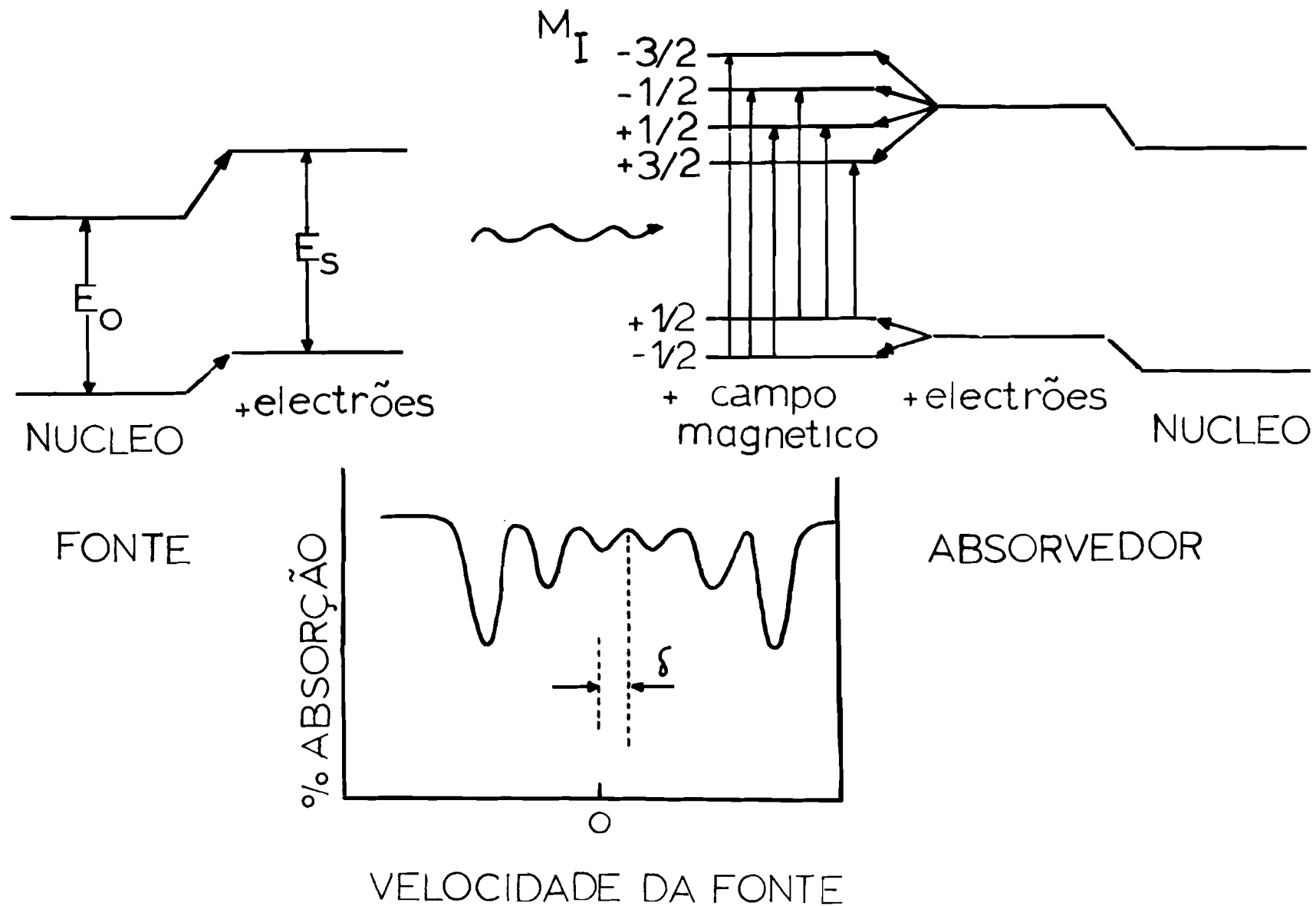


Figura III. 27 . Aspectos essenciais do desdobramento magnético hiperfino dos níveis nucleares do ^{57}Fe e espectro de Mossbauer resultante.

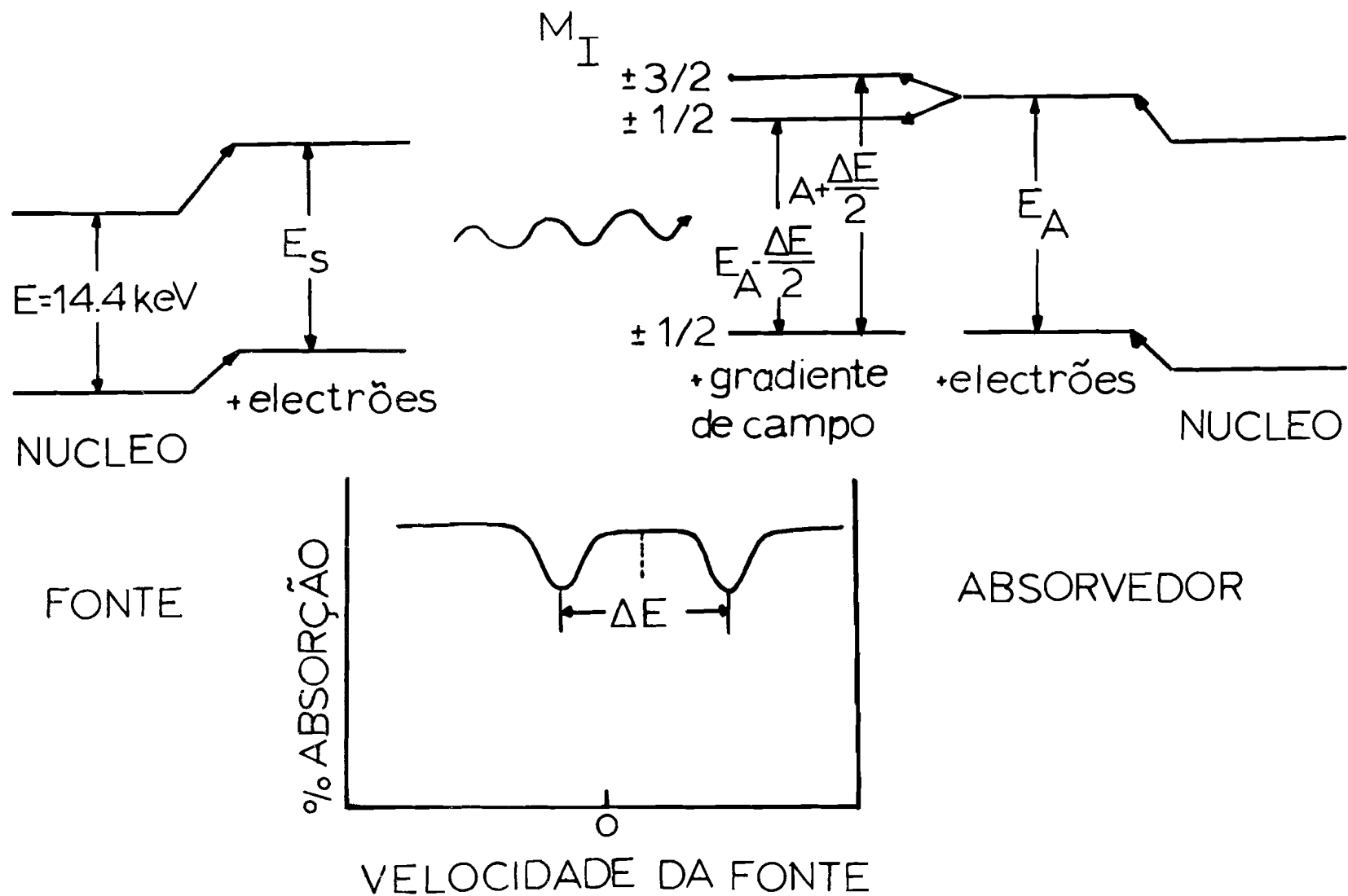


Figura III. 28 . Aspectos essenciais do desdobramento de quadrupolo do núcleo de ^{57}Fe e espectro de Mossbauer resultante.

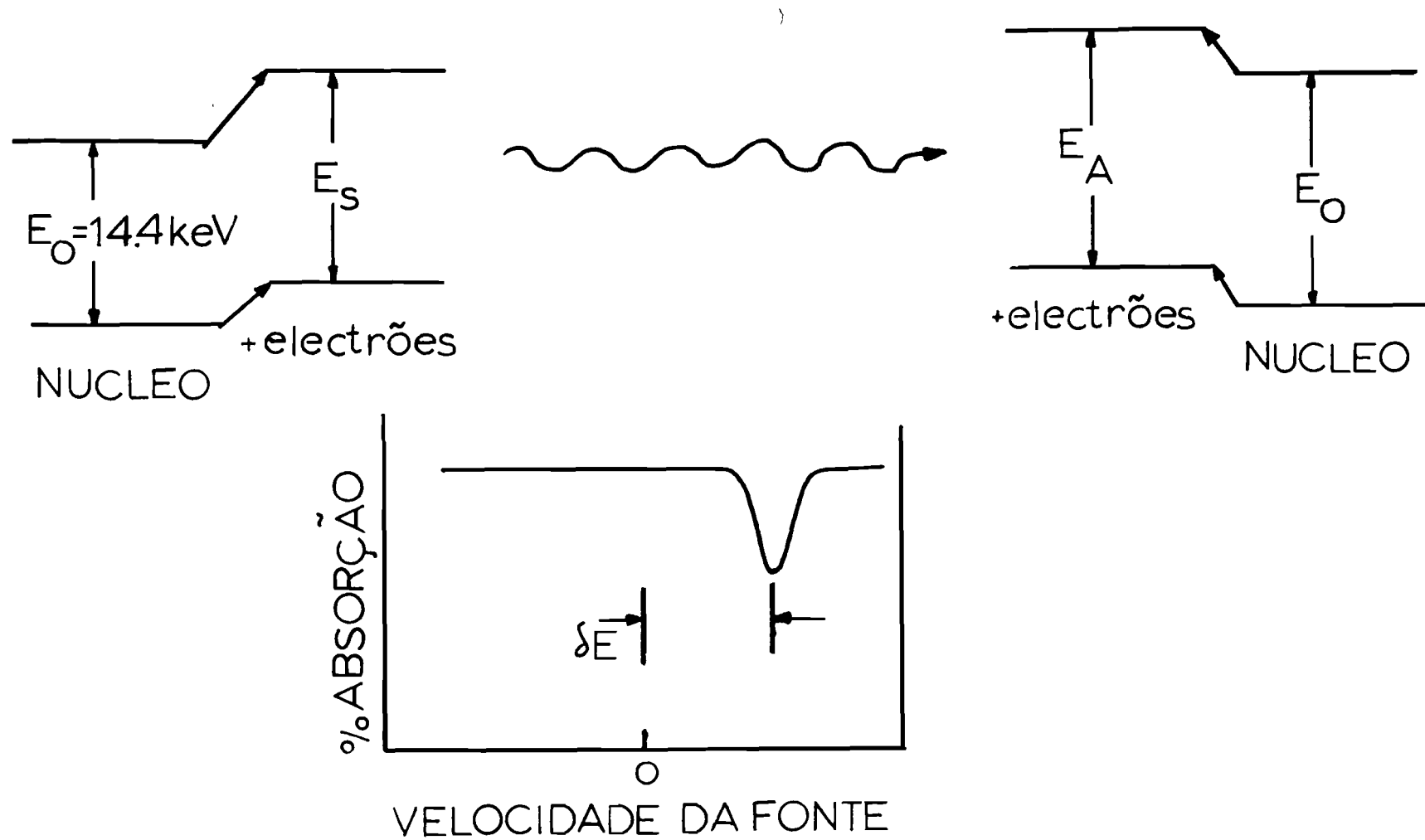


Figura III. 29 . Aspectos essenciais do desvio isomérico do núcleo de ^{57}Fe e espectro de Mossbauer resultante.

Em geral estes termos estão presentes simultaneamente e as "pattern" hiperfinas resultantes são complexas e têm que ser analisadas por computador. Esta complexidade provém em geral, da anisotropia espacial $\vec{H}_{eff}$, da sua orientação relativa ao tensor, do gradiente do campo, da temperatura e do campo magnético aplicado.

III.6.1.2 - O Hamiltoniano do Spin

Descrição das interações

O espectro de Mössbauer depende directamente das propriedades dos estados electrónicos devido às interações hiperfinas. Portanto, estudando os desdobramento hiperfinos dos níveis nucleares pode inferir-se da natureza do estado electrónico de mais baixa energia. As características destes estados, por sua vez, dão origem a informações estruturais e químicas. Em geral é útil conhecer o desdobramento do "zero-field" e a estrutura hiperfina do estado electrónico de menor energia dada por um certo número de parâmetros. Isto é conseguido pelo hamiltoniano de spin.

Um hamiltoniano adequado para descrever os nossos resultados será dado por:

$$\hat{H} = \hat{H}_e + \hat{H}_{hf} \quad (2)$$

$$\text{sendo: } \hat{H}_e = D \left[S_z^2 - \frac{1}{2} S(S+1) + E/D (S_x^2 - S_y^2) \right] + \beta_e \vec{S} \cdot \vec{g} \cdot \vec{H} \quad (3)$$

$$\text{e } \hat{H}_{hf} = \vec{S} \cdot \vec{A} \cdot \vec{I} + \vec{I} \cdot \vec{P} \cdot \vec{I} - g_n \beta_n \vec{H} \cdot \vec{I} \quad (4)$$

$\hat{H}_e$ depende só de variáveis electrónicas. Os três primeiros termos da equação (3) representam o desdobramento do "zero field" e S_x , S_y e S_z são as componentes do operador do spin electrónico num sistema de coordenadas adequadas, fixado para a molécula. O último termo da equação (3) é a interacção electrónica de Zeeman que tem de ser especificada por um tensor $\tilde{g}$. Em RPE estamos só interessados em $\hat{H}_e$.

Os termos da equação (4) descrevem as interacções hiperfinas. $\vec{S} \cdot \vec{A} \cdot \vec{I}$ representa a interacção magnética da núvem electrónica com o núcleo; $\vec{I} \cdot \vec{P} \cdot \vec{I}$ é a interacção de quadrupolo, que quando expressa no sistema de eixos do tensor do gradiente do campo eléctrico, toma a forma especificada na equação (1). Finalmente o último termo é o termo de Zeeman nuclear que descreve a interacção do momento nuclear $g_n \beta_n \vec{I}$ com um campo aplicado $\vec{H}$.

Nas equações (3) e (4) as grandezas dos termos correspondentes às várias interacções estão dispostas por ordem decrescente. Os parâmetros do desdobramento do "zero field" são da ordem de grandeza de alguns números de onda ($D \approx 5-10 \text{ cm}^{-1}$ para proteínas hémicas, $D = 1,5 \text{ cm}^{-1}$ e 8 cm^{-1} para a rubredoxina oxidada e reduzida, respectivamente; $D > 1 \text{ cm}^{-1}$ para siderocromos). Para campos exteriores pouco intensos, de cerca de 10 gauss, a interacção electrónica de Zeeman é comparável com os termos do desdobramento do "zero field"; para campos aplicados maiores que 100 gauss os termos electrónicos dominam a interacção hiperfina. Nestas condições é possível separar as coordenadas nucleares e electrónicas e a equação (4) pode

ser transformada em:

$$\hat{H}_{hf} = \langle \vec{S} \rangle \cdot \tilde{A} \cdot \vec{I} - g_n \vec{H} \cdot \vec{I} + \vec{I} \cdot \tilde{P} \cdot \vec{I} \quad (5)$$

Na equação (5) $\langle \vec{S} \rangle$ representa um valor expectável do spin electrónico, calculado de modo apropriado. A estrutura fina (desdobramento de "zero field") e os termos de Zeeman electrónico, são elevados comparados com as interações hiperfinas e o eixo de quantificação do spin electrónico é inteiramente comandado pelo sistema electrónico e o efeito do núcleo na orientação do spin é desprezável. Isto permite-nos substituir o operador $\vec{S}$ pelo seu valor expectável, que é determinado por $\hat{H}_e$.

A equação (5) pode, em consequência, ser escrita do seguinte modo:

$$\begin{aligned} \hat{H}_{hf} &= - \frac{\langle \vec{S} \rangle \cdot \tilde{A}}{g_n \beta_n} g_n \beta_n \cdot \vec{I} - g_n \beta_n \vec{H} \cdot \vec{I} + \vec{I} \cdot \tilde{P} \cdot \vec{I} \\ &= -g_n \beta_n (\vec{H}_{int} + \vec{H}) \cdot \vec{I} + \vec{I} \cdot \tilde{P} \cdot \vec{I} \end{aligned} \quad (6)$$

A $\vec{H}_{int} = -\langle \vec{S} \rangle \cdot \tilde{A} / g_n \beta_n$ dá-se o nome de campo magnético interno do núcleo. Sobre o núcleo actua um campo

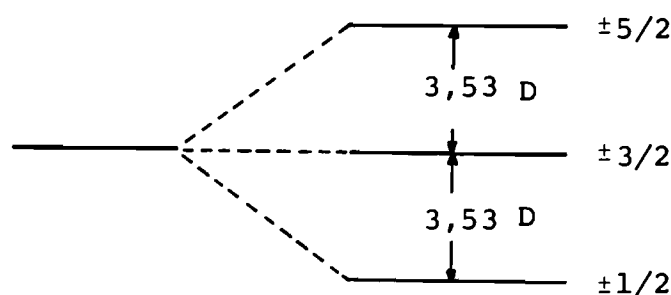
magnético efectivo, correspondente à soma vectorial

$\vec{H}_{eff} = \vec{H}_{int} + \vec{H}$. As equações (5) e (6) estabelecem a relação entre o hamiltoniano de spin (equação 2) e o hamiltoniano nuclear (equação 1). Uma vez que $\langle \vec{S} \rangle$ depende através de $\hat{H}_e$, de D , E e $\tilde{g}$, estes parâmetros electrónicos podem ser determinados pelo espectro de Mössbauer. Além disso, $\langle \vec{S} \rangle$ depende da temperatura T e da intensidade e orientação do campo magnético

tico aplicado $\vec{H}$. Portanto, a forma do espectro de Mössbauer pode ser modificada por variação das condições experimentais, ou seja, T e $\vec{H}$.

III.6.1.3 - Aplicação do Formalismo do Hamiltoniano a um Sistema de Kramer

Os sistemas de Kramer têm uma característica comum: Na ausência de um campo aplicado os níveis electrónicos são pelo menos duas vezes degenerados; a maior parte são doubletes (doubletes de Kramer). Em geral, qualquer sistema com um número ímpar de electrões, isto é, com um spin electrónico igual a metade de um número inteiro, origina doubletes de Kramer com propriedades magnéticas observáveis. Os desdobramentos hiper-finos magnéticos detectados em espectroscopia de Mössbauer ($H_{int} \neq 0$, $\langle \vec{S} \rangle \neq 0$) e as transições magnéticas detectadas em espectroscopia de RPE são algumas das características destes sistemas de Kramer. Em sistemas com $S \geq 3/2$ o termo do desdobramento "zero-field" remove a degenerescência de $2S+1$ vezes e obtém-se $(2S+1)/2$ doubletes de Kramer (ver Figura III.30).



"zero-field" splitting $E/D=0,33$

Figura III.30 - Exemplo $S = 5/2$

Para campos aplicados fracos, tais como $\beta_e H \ll |D|$ os doubletes estão bem separados e o campo aplicado não mistura os doubletes. Cada doublete pode ser tratado com um spin fictício $S' = 1/2$; os dados de RPE e Mössbauer são muitas vezes analisados desta maneira. Para tempos de relaxação de spin electrónico longos ($T_e > 10^{-6}$ s) cada doublete dá origem a um espectro de Mössbauer separado.

III.6.1.3.1 - Sistema com $S = 5/2$

Vamos considerar agora ferro (III) de spin-alto ($S = 5/2$). Muitas proteínas contêm este tipo de ferro em diferentes vizinhanças (hemos, siderocromos, dioxigenases e rubredoxina). Como estamos interessados em sistemas parecidos com o da rubredoxina vamos utilizá-la como exemplo.

Para o ferro (III), de spin-alto a equação (2) simplifica-se, uma vez que tanto a interacção electrónica de Zeeman como a interacção magnética hiperfina são em geral isotrópicas ($g_e \beta_e \vec{H} \cdot \vec{S}$ e $A_0 \vec{S} \cdot \vec{I}$). O termo do desdobramento do "zero field" na equação (3) remove parcialmente a degenerescência do sexteto e obtêm-se três doubletos de Kramer. Usando então o spin fictício para cada doubleto $S' = 1/2$, as propriedades de Mössbauer e RPE para cada doubleto podem ser descritas por:

$$\hat{H} = g_e \vec{S}' \cdot \vec{g}_i \cdot \vec{H} + \vec{S}' \cdot \vec{A}_i \cdot \vec{I} + \vec{I} \cdot \vec{P} \cdot \vec{I} \quad (7)$$

As equações (7) e (2) são equivalentes se escolhermos apropriadamente os tensores $\tilde{g}_i$ e $\tilde{A}_i$ para cada um dos três doubletos com $i = 1,2,3$. Para ferro (III) de spin elevado, $g_e = 2,00023$; assim o tensor g depende só de E/D . Neste formalismo as componentes do tensor $\tilde{A}_i$ são proporcionais às do tensor $\tilde{g}_i$. Especificamente teremos:

$$\frac{A_x}{g_x} = \frac{A_y}{g_y} = \frac{A_z}{g_z} = \frac{A_o}{g_e} \quad (8)$$

para cada um dos três doubletos.

Peisach et al. (61) e Blumberg e Peisach (62) estudaram por ressonância paramagnética electrónica a rubredoxina de Pseudomonas oleovorans. Como já tinha sido observado para várias rubredoxinas, (57,63) aquela apresenta um sinal complexo a $g = 4,3$ e a temperaturas muito baixas detecta-se um sinal a $g \approx 9$. Para temperaturas inferiores a 9K e à medida que diminui a temperatura, o sinal a $g=4,3$ diminui de intensidade e o sinal a $g=9,4$ aumenta de intensidade. Isto pode explicar-se pelo facto de o sinal a $g=4,3$ provir de um doubleto de Kramer (doubleto do meio) que se torna despovoado à medida que a temperatura diminui, enquanto que a ressonância a $g=9,4$ provém do doubleto fundamental que se torna mais populado à medida que a temperatura diminui.

Na Figura III.31, apresenta-se um gráfico dos valores de $g_{x,y,z}$ de cada um dos doubletos de Kramer em função do valor de $\lambda=E/D$. Como se pode ver pelo gráfico o valor de λ para a rubredoxina aproxima-se muito do limite $\lambda=1/3$.

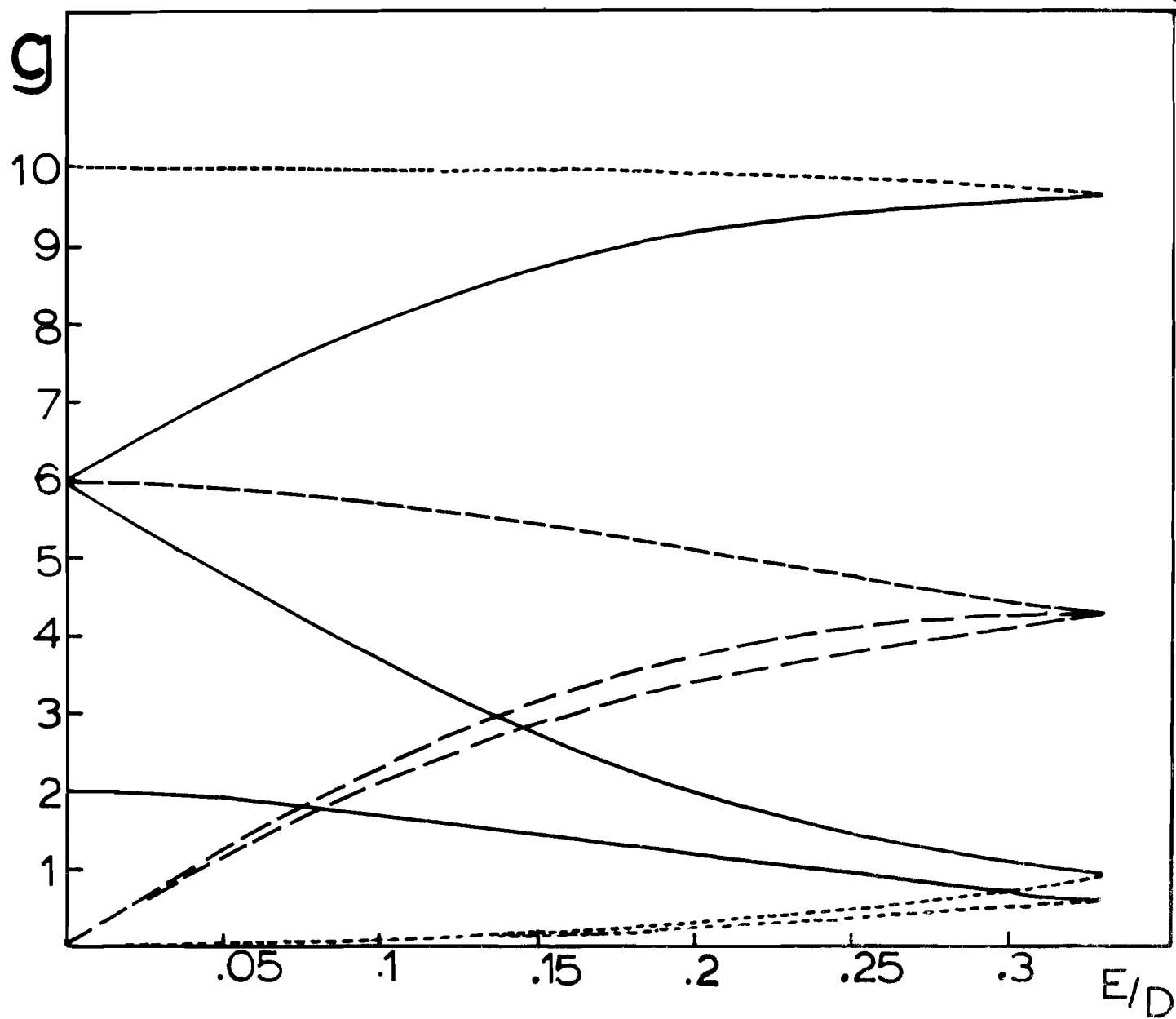


Figura III.31 . Valores de $g_{x,y,z}$ de cada um dos doubletes de Kramer em função de $\lambda = E/D$.

doublete fundamental (———)

doublete do meio (-----)

doublete superior (.....)

Recentemente, Debruner et al. (64,65) estudaram detalhadamente a rubredoxina de Clostridium pasteurianum. Na Figura III.32 apresentam-se os espectros de Mössbauer a baixa temperatura. A forma destes espectros é facilmente percebida com a informação obtida por espectroscopia de RPE.

A temperatura baixa, 1,5 K, só o dobleto de Kramer fundamental está populado. O espectro de Mössbauer associado a este dobleto é um espectro simples de seis linhas (Figura III.32). A direcção dum campo magnético aplicado não afecta muito as intensidades; isto implica que o dobleto fundamental tenha um eixo fácil de magnetização. Esta direcção tem de ser a da componente com $g = 9,4$, isto é, a direcção do eixo dos yy do termo de desdobramento do "zero field" (o spin electrónico e portanto H_{int} tende a alinhar-se ao longo do eixo dos yy, qualquer que seja a orientação da molécula relativa ao campo aplicado). Portanto, os desdobramentos dos níveis nucleares são independentes da orientação, obtendo-se seis linhas bastante aguçadas).

Do desdobramento magnético total obtém-se $H_{int,y} = -A_{1,y} \langle S'_y \rangle / (g_n \beta_n) = -365 \text{ KG}$. O desdobramento de quadrupolo, que é pequeno comparado com o desdobramento magnético, desvia as quatro linhas interiores (para a esquerda) relativamente às duas linhas exteriores (que se desviam para a direita) de uma quantidade proporcional a eQV_{yy} , que é a componente do tensor de quadrupolo ao longo do campo interno prevalecente ($eQV_{yy} \approx 0,56 \text{ mm/s}$).

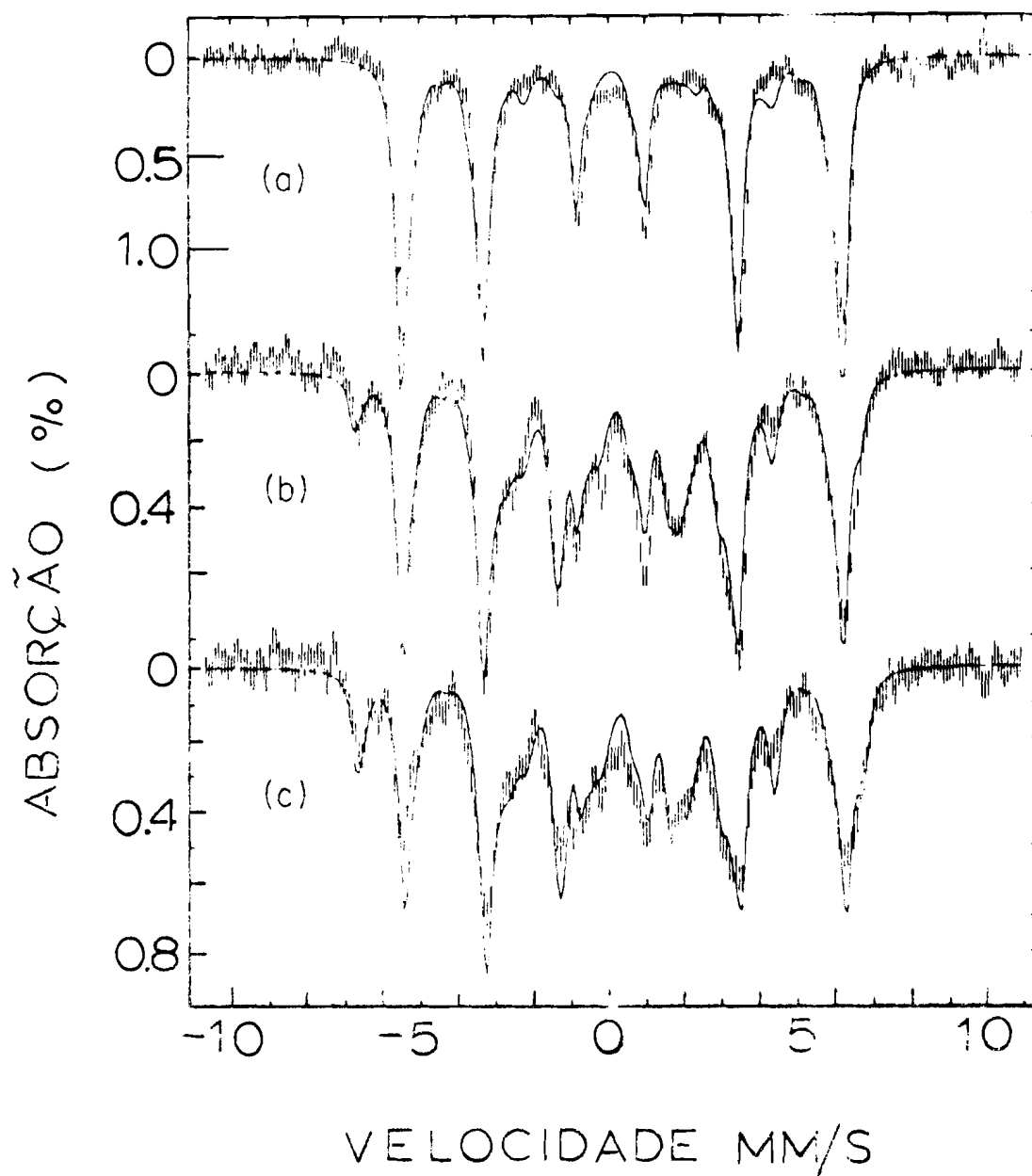


Figura III.32 . Espectros de Mössbauer duma solução de rubredoxina de C.pasteurianum num campo magnético de 1,3 KG aplicado perpendicularmente à radiação γ de observação : (a) a 1,5 K , (b) a 10 K , e (c) a 20 K .As linhas a cheio representam as simulações teóricas. Os parâmetros usados foram: $D=2,5 \pm 0,5$ K , $E=0,43 \pm 0,03$ K , $\mu=0,3 \pm 0,1$, $\Delta E_Q = -0,5 \pm 0,1$ mm/s , $\eta = 0,2 \pm 0,1$, $A_x = -22,7 \pm 1,5$ MHz , $A_y = -21,5 \pm 0,4$ MHz , $A_z = -23,5 \pm 0,4$ MHz , $\tau = 0,3$ mm/s (largura a meia altura).

A 4,2 K tanto o dobleto de Kramer do meio como o superior começam a estar populados, sendo as populações dadas pela distribuição de Boltzmann. A teoria (equação 8) prediz que o desdobramento magnético do dobleto do meio no espectro de Mössbauer seja metade do dobleto fundamental. O aumento de absorção na Figura III.32 entre a gama de -3 mm/s e +3 mm/s é essencialmente devido ao dobleto do meio. Além disso o espectro da figura III.32 mostra outros picos a -6,5 mm/s e +5,5 mm/s e um ombro a +6,5 mm/s; estas linhas provêm do dobleto superior. Para este dobleto o hamiltoniano de spin para $E/D = 0,28$ prediz um tensor $\tilde{g}_3 = (0,65, 0,41 \text{ e } 9,77)$. Estes valores de g predictos para o dobleto superior originam um espectro de Mössbauer semelhante ao do dobleto fundamental com uma diferença: agora o valor dominante de g é $g_z = 9,7$, isto é, o campo interno tem um eixo fácil de magnetização ao longo do eixo dos zz e o espectro mede V_{zz} ($eQV_{zz} = -1,0$ mm/s). O desdobramento magnético para o dobleto superior é 13% maior do que o dobleto fundamental. Isto contradiz a suposição imposta pela equação (8) de que a interacção magnética é isotrópica.

A figura III.33 mostra espectros simulados para cada um dos dobletos de Kramer. Para ter em conta os resultados experimentais da Figura III.32 estes espectros têm que ser adicionados de acordo com a população de cada dobleto. Isto dá um resultado interessante. O hamiltoniano de spin com $E/D = 0,28$ prediz uma razão de energia $E_3/E_2 = 2,12$ do dobleto superior e do meio relativo ao dobleto fundamental; os dados de Mössbauer necessitam de uma razão $E_3/E_2 = 3,3 \pm 0,5$.

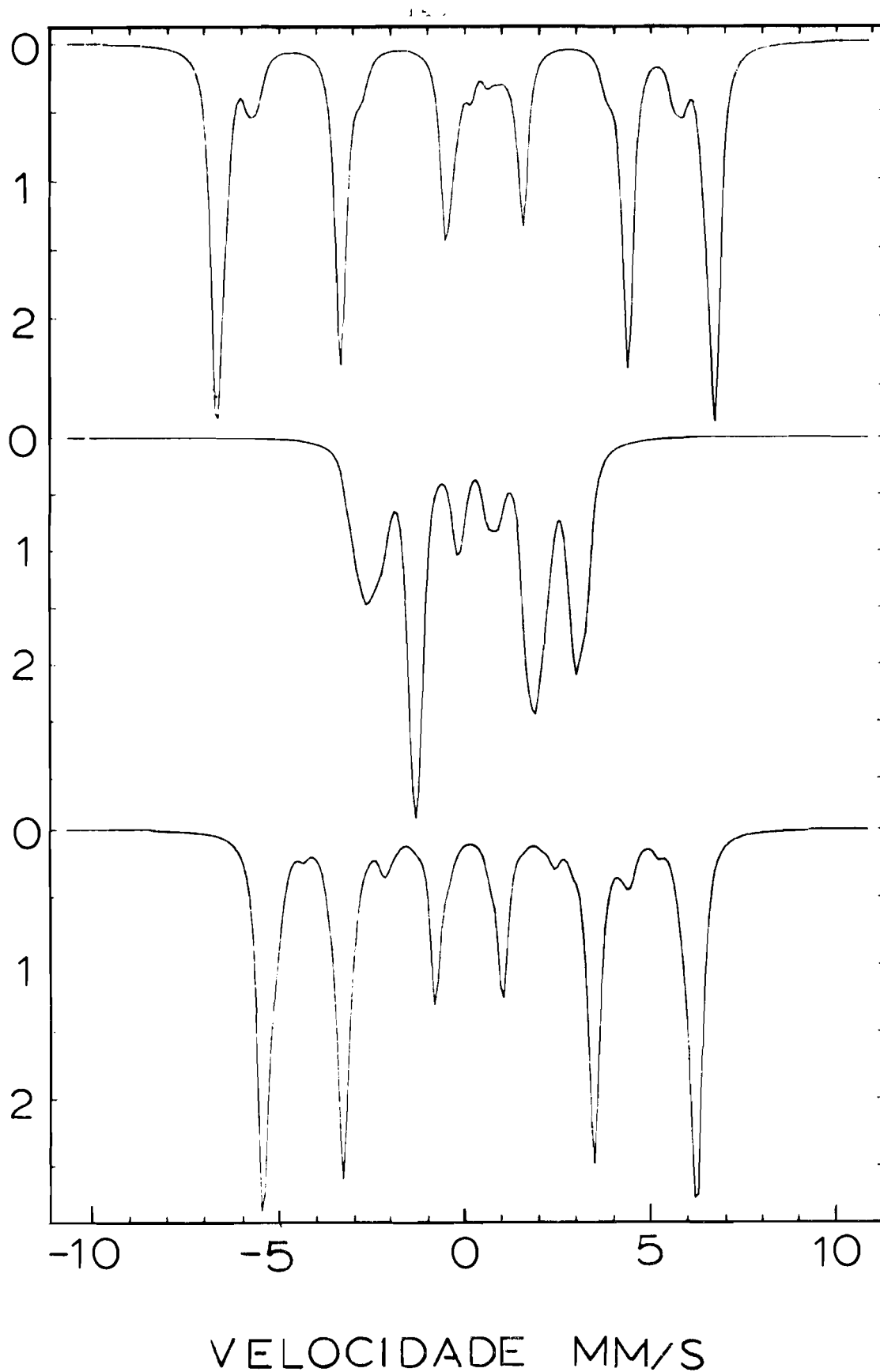


Figura III. 33 . Espectros componentes dos três doublets de Kramer da rubredoxina oxidada.Os parâmetros usados são os indicados na Figura III.32 .

Spartalian e Oosterhuis (66) acharam que era necessário, para interpretar os resultados de Mössbauer e RPE de alguns siderocromos, aumentar o hamiltoneano de spin da equação (9) com um termo de quarta ordem

$$H_S = \frac{D \mu}{6} (S_x^4 + S_y^4 + S_z^4 - \frac{707}{16})$$

A introdução deste termo permite variar a razão E_3/E_2 enquanto se mantêm os valores de g à volta de $g = 9$ e $4,3$. Escolhendo $E/D = 0,17$, $\mu = 0,3$ e $D = 1,76 \text{ cm}^{-1}$ Debruner (65) foi capaz de conciliar os dados de RPE e Mössbauer. As curvas teóricas na Figura III.33 foram simulados utilizando o conjunto de parâmetros apresentados na Figura III.32.

A parte isotrópica da interacção magnética hiperfina $A_{av} = A_O = -22,6 \text{ MHz}$ é consideravelmente inferior a -30 MHz , valor observado para compostos altamente iónicos. O valor de A_O é semelhante ao encontrado para o sítio ferro (III) das ferredoxinas de $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ reduzidas e parece ser indicativo de coordenação tetraédrica a enxofre. O valor baixo de A_O indica que os electrões d estão altamente deslocalizados na rubredoxina.

Em conclusão, ferro de spin-alto dá origem a três dobletos de Kramer, cada um com espectro de Mössbauer diferente (isto só é verdade se a velocidade de relaxação do spin electrônico for lenta, comparada com a frequência de precessão nuclear). A temperaturas tais que KT é comparável com o desdobramento de "zero-field" obtem-se um espectro composto. Os espectros com ponentes contribuem de acordo com a população do dobleto de

Kramer a que estão associados. Decompondo apropriadamente os espectros traçados a temperaturas diferentes pode-se obter D, o parâmetro do desdobramento de "zero field". É de notar que os três espectros medem componentes diferentes do tensor de quadrupolo. Para velocidade de relaxação do spin electrónico rápida (o spin saltando rapidamente entre os estados do sexteto de spin termicamente acessíveis) não se observa desdobramento hiperfino magnético. Contudo, a aplicação de campos magnéticos intensos induz um campo magnético interno que é proporcional ao A_0 e ao valor expectável de $\langle \vec{S} \rangle$ obtido por média térmica. Este último depende dos parâmetros do "zero-field" e da temperatura. Portanto quer a velocidade de relaxação seja lenta ou rápida é sempre possível determinar a interacção hiperfina magnética e os parâmetros de estrutura fina.

III.6.1.4 - Sistemas não-Kramer

Todos os sistemas não-Kramer têm uma característica comum: $\langle \vec{S} \rangle$ e por consequência $\vec{H}_{int}$ são iguais a zero a não ser que a amostra seja estudada num campo aplicado elevado. Consequentemente, para "zero-field" só interessa considerar a interacção de quadrupolo e o espectro consiste de duas linhas de absorção, um duplete de quadrupolo. Experimentalmente obtém-se o desvio isomérico δ e o valor mas não o sinal do desdobramento de quadrupolo. Se um dos estados electrónicos orbitais de mais baixa energia se torna populado então ΔE_Q é dependente da temperatura.

Vamos agora falar de sistemas com $S \neq 0$ que é o caso das rubredoxina e desulforedoxina reduzidas.

Sistemas com $S \neq 0$

Os espectros de Mössbauer de iões não-Kramer são muito ricos em informação, uma vez que o campo magnético interno pode ser induzido por aplicação de um campo magnético elevado. Isto permite a determinação do desdobramento do "zero-field" e de parâmetros hiperfinos. O efeito de Mössbauer é particularmente útil uma vez que os iões não Kramer não são observáveis em RPE, visto que o estado fundamental é um singuleto não magnético.

Como exemplo vamos só discutir algumas características do ferro (II) de alto-spin ($S=2$) caso da rubredoxina e desulforedoxina reduzidas. Para simetrias mais baixas que trigonal e tetragonal a degenerescência de grau cinco do quinteto de spin é completamente removida pelo termo do desdobramento de "zero-field" ($D, E \neq 0$ eq). No entanto este desdobramento é maior do que a energia de ressonância usada em RPE e não se observa sinal devido a transições entre estes níveis. Na ausência de um campo magnético aplicado, um estado singuleto não tem momento magnético ($\langle \vec{S} \rangle = 0$) e o espectro de Mössbauer consiste só de um duplete de quadrupolo. No entanto, um campo magnético aplicado mistura os estados electrónicos e produz uma polarização. O valor expectável de spin $\langle \vec{S} \rangle \neq 0$ deixa de ser zero. A baixas temperaturas só o singuleto de mais baixa energia é populado e o valor $\langle \vec{S} \rangle$ que aparece na

equação (6) diz s^o respeito a este estado. A alta temperatura outros estados de spin estão populados. Se a velocidade de relaxação do spin electrónico é rápida (isto é o spin salta rapidamente entre os níveis termicamente populados) o valor expectável $\langle \vec{S} \rangle$ é uma média térmica tomada sob todos os estados de spin e o espectro resultante é único. Se a velocidade de relaxação electrónica é lenta cada nível de spin populado dá origem a um espectro de Mössbauer cuja intensidade é dada pelo factor de Boltzmann do respectivo estado.

A espectroscopia de Mössbauer de iões paramagnéticos não-Kramer usando campos aplicados elevados (até 60 KG) tem sido aplicada s^o recentemente (64,67,68,69).

As informações obtidas com esta técnica não podem ser obtidas com outras técnicas espectroscópicas.

Como veremos na desulforedoxina reduzida a aplicação de campos magnéticos elevados permitiu-nos conhecer um certo número de parâmetros da estrutura electrónica não observáveis por outras técnicas.

III.6.2 - ESTUDOS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA NA DESULFOREDOXINA

III.6.2.1 - Espectro de RPE da desulforedoxina

Na Figura III.34 apresenta-se um espectro de RPE da desulforedoxina na forma férrica a 4,8K. Observam-se sinais a $g = 7,7, 5,7, 4,1$, e $1,8$. Os valores de g observados podem

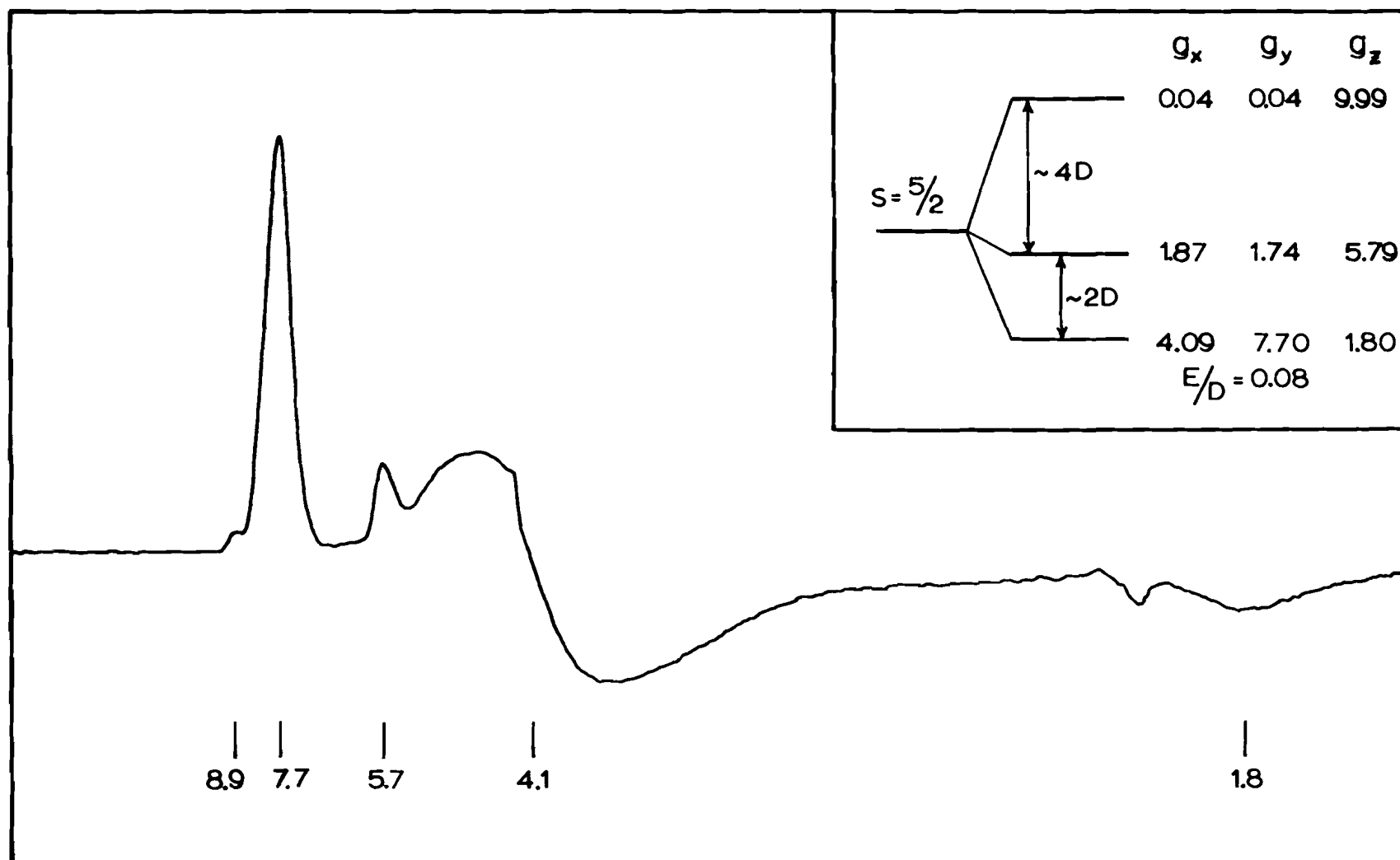


Figura III. 34 . Espectros de R.P.E. da desulforedoxina de D.gigas a 4,8 K ,potência de micro-onda 0,2 mW ,frequência 9,24 GHz ,amplitude de modulação 10 G ,ganho 8 000 e concentração de proteína 1,1 mM.No canto superior da figura apresenta-se o diagrama dos níveis de energia e os valores teóricos de g para $g_0 = 2,0$ e $E/D = 0,08$.

ser reproduzidos por um hamiltoneano de spin válido para ferro na forma de alto-spin ($S=5/2$)

$$H_e = D [S_z^2 - 1/3 S(S+1) + E/D (S_x^2 - S_y^2)] + g_0 \beta \vec{S} \cdot \vec{H}$$

onde D e E são os parâmetros de desdobramento do "zero-field". O termo de desdobramento do "zero-field" remove a degenerescência de grau seis do sexteto de spin para dar origem a três doubletos de Kramer. Na Figura III.34 mostram-se estes doubletos para $D > 0$ e $E/D = 0,08$; mostram-se também os valores de g teóricos para cada doubleto. Como se vê este hamiltoneano simples reproduz bastante bem as ressonâncias observadas a $g_y = 7,7$, $g_x = 4,1$ e $g_z = 1,8$ (para o doubleto $m_s = 1/2$) e $g_z = 5,7$ (para os níveis com $m_s = 3/2$).

Estudaram-se várias amostras provenientes de "batches" diferentes e todas elas contêm uma impureza que dá origem a uma ressonância à volta de $g=8,9$ (ver Figura III.34).

Este tipo de ferro foi encontrado nas amostras em quantidades variáveis. Estava praticamente ausente em amostras reconstituídas em que se usou uma quantidade de ferro menor do que a quantidade estequiométrica. O sinal a $g=8,9$ não existe só no material reconstituído mas também na desulforedoxina tal como é isolada.

Não se observou espectro de RPE na proteína reduzida.

III.6.2.2 - Calculo do valor de D

Para determinar o valor de D, parâmetro do desdobramento do "zero-field", que está relacionado como sabemos com a energia de separação entre os doubletos, traçamos um espectro de RPE a 4,8 K. Usou-se o método de Aasa e Vänngård (70) para quantificar as concentrações de spin do doubleto fundamental e do meio.

Como se sabe

$$I_{gx} = \frac{(g_y)^2 + (g_z)^2}{\left\{ \left[1 - \left(\frac{g_y}{g_z} \right)^2 \right] \left[1 - \left(\frac{g_z}{g_x} \right)^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

e semelhantemente para I_{gy} e I_{gz} .

Utilizando os valores teóricos de g apresentados na Figura III.34 calculou-se a intensidade do sinal a $g=7,70$ (doubleto fundamental) e a $g=5,79$ (doubleto do meio) que são respectivamente $I_{7,7}=25,06$ e $I_{5,79}=7,22$.

Como sabemos a população de cada um dos níveis está relacionada com a diferença de energia entre estes

$$\frac{N \text{ (1º estado excitado)}}{N \text{ (estado fundamental)}} = e^{-\frac{\Delta}{kT}}$$

$$\Delta \approx 2D \text{ para } \lambda = 0,08$$

As áreas dos picos foram determinadas por pesagem.

$$e^{-\frac{\Delta}{kT}} = \frac{71,5}{794,0} \frac{(\text{área de } g=5,7)}{(\text{área de } g=7,7)} \times \frac{24,06}{7,22}$$

$$-\frac{\Delta}{kT} = \ln 0,300 = -1,2037$$

$$\frac{\Delta}{k} = 5,78 \text{ K} \quad D = 2,0 \text{ cm}^{-1}$$

Na nossa opinião, o dewar da Oxford Instruments não funciona de maneira a nos dar a temperatura da amostra com maior precisão que 0,5 K numa gama grande de temperaturas. Por isso não se calculou o valor a partir de estudos de variação de temperatura.

Na Figura III.35 mostra-se um conjunto de espectros observados a várias temperaturas. Como era de esperar os sinais pertencentes ao dobleto fundamental diminuem de intensidade com um aumento de temperatura, enquanto que os correspondentes ao dobleto do meio aumentam de intensidade com um aumento de temperatura.

III.6.2.3 - Efeito da força iônica num espectro de RPE

Quando se traça um conjunto de espectros de RPE da desulforedoxina em diferentes concentrações de nitrato de sódio, a intensidade do sinal aumenta com o aumento da concentração de sal até atingir um máximo.

Quantificando o sinal de RPE em relação ao citocromo P₄₅₀ complexado com imidazol verifica-se que ao máximo de intensidade do sinal se obtém 0,93 spin/Fe.

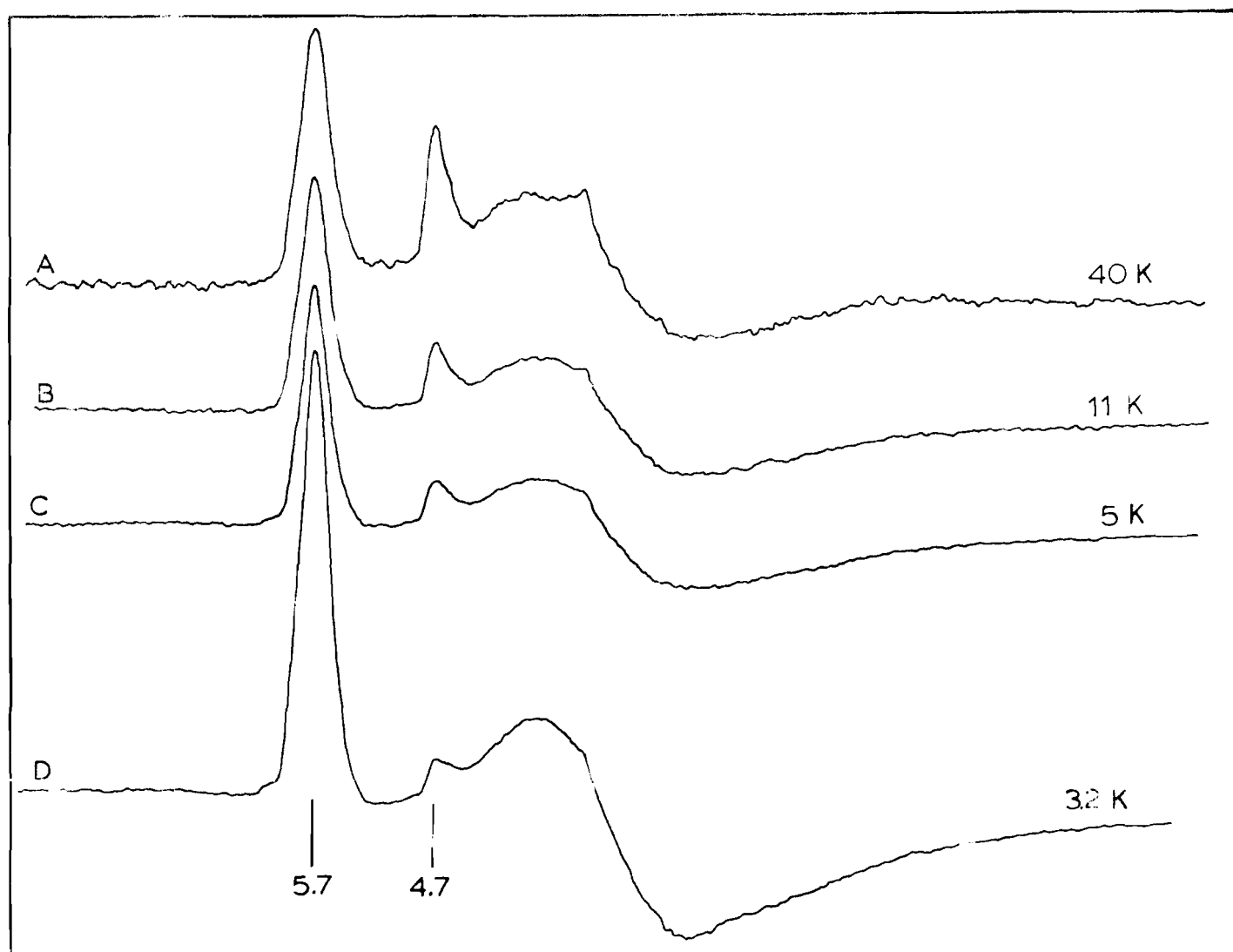


Figura III. 35 . Espectros de R.P.E. da desulforedoxina de D.gigas em função da temperatura.Outras condições : potência de micro-onda $20 \mu\text{W}$ (B,C e D) e $200 \mu\text{W}$ (A) ; frequência $9,23 \text{ GHz}$; amplitude de modulação 10 G ; ganho $2 \cdot 10^4$ (A) , 10^4 (B) e $6,3 \cdot 10^3$ (C e D) .

Na Figura III. 36 representa-se a intensidade do sinal a $g=7,8$ em função da concentração de nitrato de sódio.

III.6.2.4 - Exemplificação de uma quantificação de spin

O citocromo P_{450} complexado com imidazol apresenta ressonâncias a valores de g (2,53, 2,25 e 1,85). Pela fórmula de Aasa e Vänngard (70) a intensidade relativa a $g=2,53$ é igual a

$$I_{2,53} = \frac{(2,25)^2 + (1,85)^2}{\sqrt{\left[1 - \left(\frac{2,25}{2,53}\right)^2\right] \left[1 - \left(\frac{1,85}{2,53}\right)^2\right]}}$$

Pesou-se o pico do P_{450}^+ imidazole a $g=2,53$ assim como o pico a $g=7,8$ da desulforedoxina.

As concentrações em Ferro eram $P_{450}=450 \mu M$ e $D_x=557 \mu M$.

	area	ganho	potência (W)	area corrigida*
P_{450}	405 ($g=2,53$)	4×10^4	2	$2,63 \times 10^4$
D_x	892 ($g=7,8$)	$1,25 \times 10^4$	200	$2,13 \times 10^4$

* tendo em conta o factor de Aasa e Vanngard, potência e ganho

A concentração de spins da amostra de desulforedoxina será $\frac{2,13 \times 10^4}{2,63 \times 10^4} \times 0,450 (1 + e^{-2D/kT})$.

Tomando $D = 2,0 \text{ cm}^{-1}$ e $T = 10 \text{ K}$ a concentração de spins é $0,561 \text{ mM}$ ou seja $1,01 \text{ spin/ferro}$.

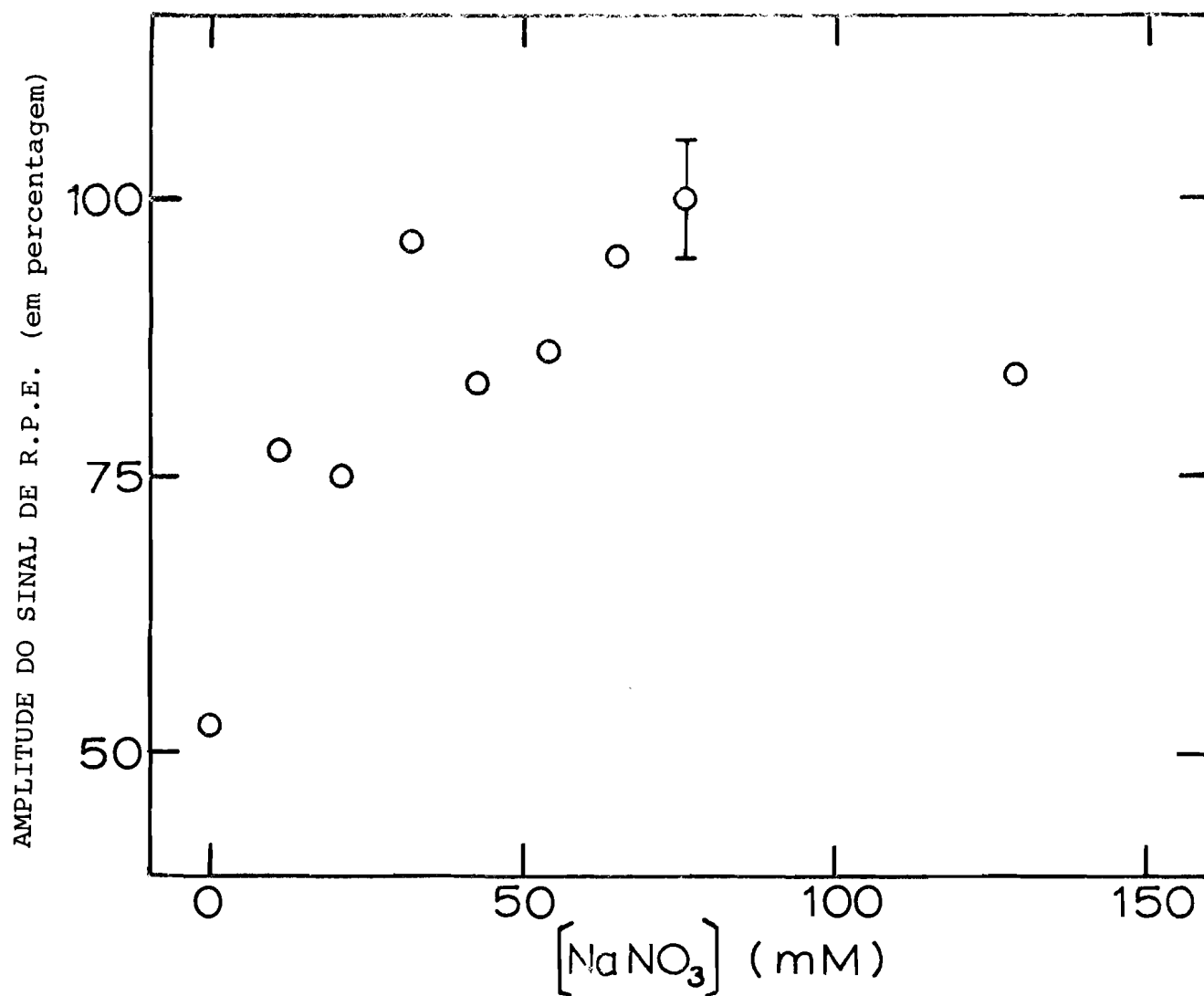


Figura III.36 . Efeito da concentração de nitrato de sódio na amplitude do sinal de R.P.E. a $g=7,8$.

III.6.2.5 - Titulação redox

O potencial de oxidação-redução foi estimado a partir de medidas dos sinais a $g=7,72$ e $5,73$.

As intensidades destes dois sinais, em função do potencial redox medido estão representadas na Figura III.37.

A curva que melhor se adapta aos valores experimentais foi calculada para a redução de um electrão com o potencial de meia onda de -35 ± 15 mV.

III.6.2.6 - Velocidade de relaxação

O sinal de RPE da desulforedoxina na forma oxidada pode ser observado à temperatura de azoto líquido. A velocidade de relaxação do spin electrónico parece ser bastante lenta mesmo a estas temperaturas o que permite observar o sinal.

III.6.2.7 - Espectro de RPE da Rubredoxina de D.gigas

A forma oxidada da rubredoxina de D.gigas apresenta um espectro com sinais à volta de $4,02$, $4,27$, $4,61$ e $9,4$ (Figura III.38). O espectro é muito semelhante ao observado noutras rubredoxinas (61,62,63). O espectro foi interpretado por Blumberg (62) como sendo devido aos doublets de Kramer do meio e fundamental do sistema Fe^{3+} de alto-spin com um grande grau de distorção rômica. À medida que a temperatura é diminuida o sinal a $g=4,27$ diminui em intensidade uma vez que o

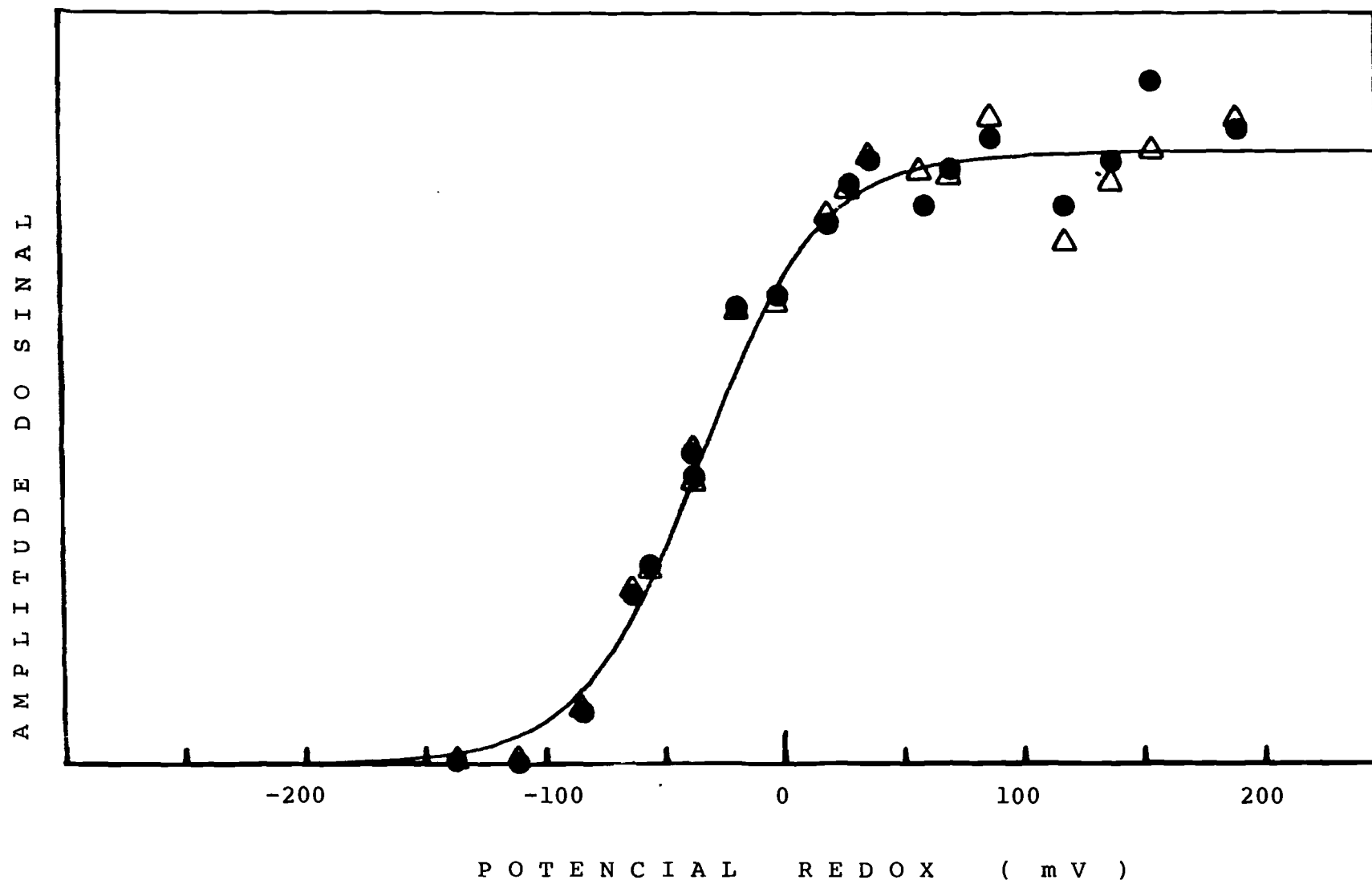


Figura III.37 . Curva de titulação redox da desulfiredoxina de D. gigas .As intensidades dos sinais de R.P.E. a $g=7,8$ (●) e $g=5,4$ (Δ) foram medidas em função do potencial redox, em Tris-HCl 0,1 M e pH=8,0 . As intensidades foram ajustadas de modo a darem a mesma intensidade máxima. A curva teórica apresentada na figura foi calculada a partir da equação de Nernst.

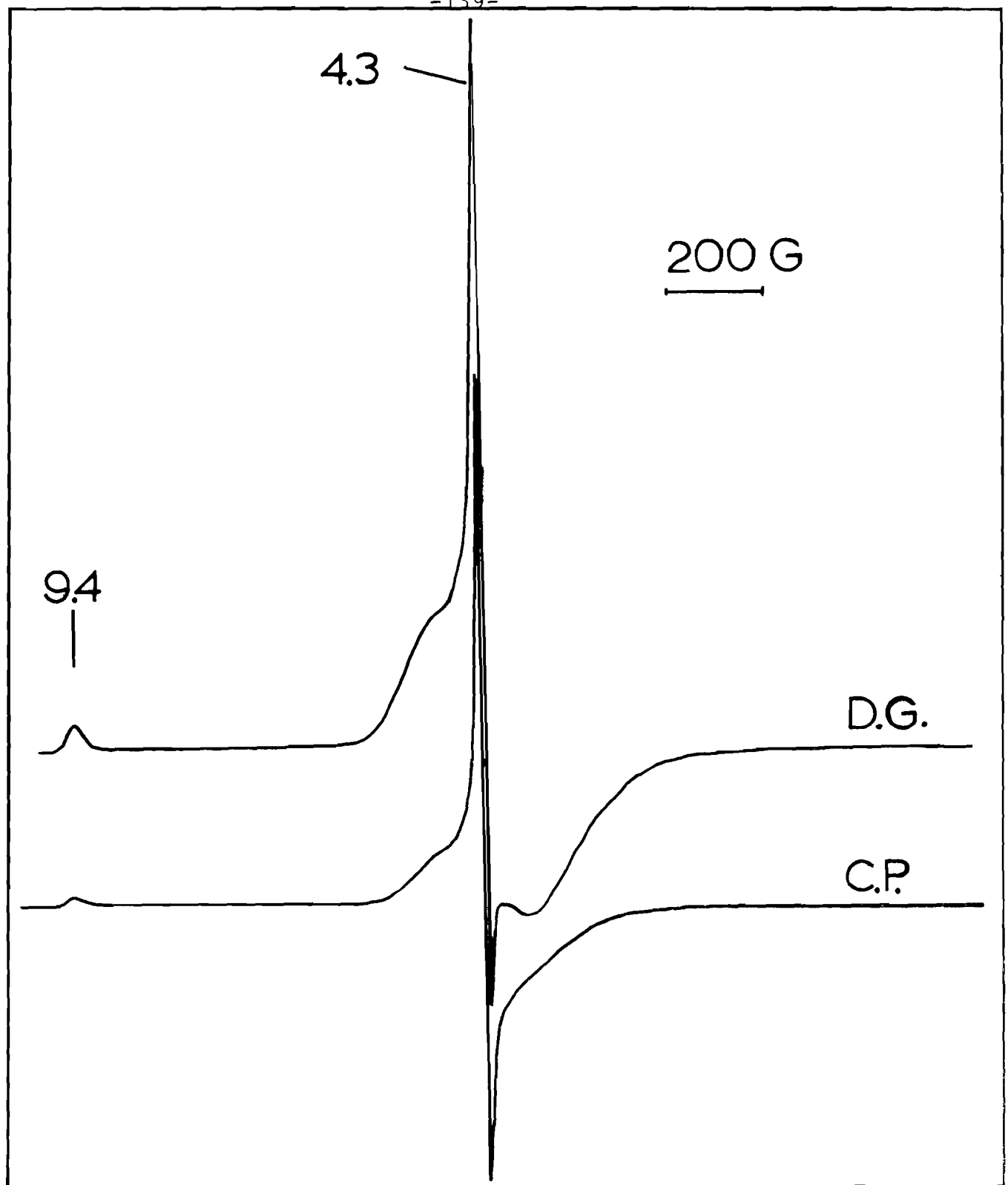


Figura III.38 . Comparação dos espectros de R.P.E. das rubredoxinas de C.pasteurianum e de D.gigas.

doblete de Kramer do meio se despolula e o sinal a $g=9,4$ proveniente do estado fundamental aumenta.

O hamiltoneano de spin (10) reproduz estes valores de g para $E/D = 0,25$ (ver Figura III.31).

Na figura III.38 compara-se o espectro da rubredoxina de D.gigas com o da rubredoxina de C.pasteurianum. A única diferença consiste no sinal a $g=4,02$ que é melhor resolvido na rubredoxina de D.gigas possivelmente devido a uma menor largura de linha.

III.6.2.8 - Determinação de potenciais redox de várias rubredoxinas

Nesta secção vamos descrever os resultados obtidos pela determinação dos potenciais redox de três rubredoxinas isoladas de Desulfovibrio gigas (14), Desulfovibrio salexigens (18) e Desulfuromonas acetoxidans (17).

As titulações potenciométricas na presença de mediadores de oxidação-redução foram seguidas por medidas de RPE de modo

a determinar os potenciais de oxidação-redução dos centros activos como descrito na Secção II.11.1.

Os potenciais de oxidação-redução foram estimado a partir de medidas do sinal de RPE a $g=4,3$ observado a 77K que é típico das rubredoxinas (61,62,63).

A intensidade do sinal foi representada em função do potencial medido e as curvas são apresentadas na Figura III.39

Os potenciais determinados foram: -46 mV para a rubredoxina de Drm.acetoxidans, -31 mV para a rubredoxina de D.salexigens e +6 mV para a rubredoxina de D.gigas.

Um valor de -57 mV foi publicado para a rubredoxina de C.pasteurianum por medidas ópticas a pH=7,0 (43).

A comparação das composições de várias rubredoxinas é apresentada na Tabela III.10a. A distribuição dos ácidos aminados é bastante semelhante. No entanto, podem-se observar algumas diferenças em relação a resíduos carregados. As estruturas primárias das rubredoxinas de D.gigas, D.vulgaris e C.pasteurianum são conhecidas (14,15,52) e na Figura III.2 apresenta-se um comparação. 31 resíduos são conservados quando se comparam a três sequências, tendo sido mantidas todas as posições das cisteínas, prolínas e resíduos aromáticos. A cadeia polipeptídica próxima do centro de ferro é homóloga.

As estruturas de Raios-X até agora conhecidas (3,5,23) mostram que os parâmetros estruturais do centro activo não são significativamente modificados. Este facto é apoiado por outras técnicas espectrostópicas: espectroscopia de ultra-

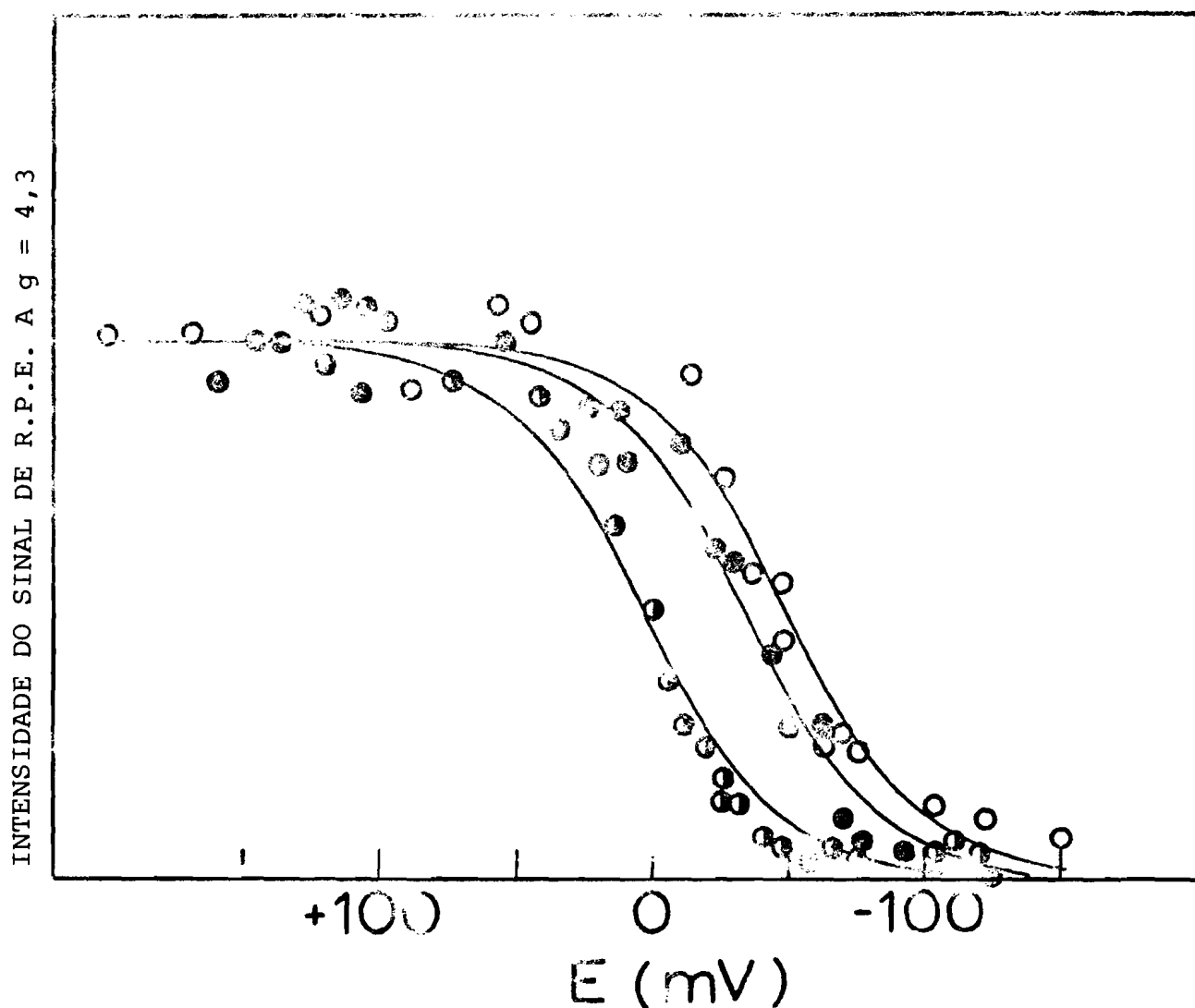


Figura III.39 . Curvas de titulação redox. As intensidades do sinal de R.P.E. a $g=4,3$ são representadas em função do potencial redox. Rubredoxinas isoladas de *D.gigas* (●) , *D.salexigens* (●) , *Drm.acetoxidans* (○) em Tris-HCl 0,1 M a pH=8,4. As intensidades dos sinais de R.P.E. foram normalizadas de modo a darem a mesma intensidade máxima. As curvas teóricas apresentadas na figura foram calculadas a partir da equação de Nernst.

TABELA III.10a

Comparação da composição em ácidos aminados de
várias rubredoxinas

	<u>C.pasteurianum</u> (85)	<u>D.gigas</u> (14)	<u>D.salexigens</u> (18)	<u>D.desulfuricans</u> (Berre S)	<u>Drm.acetoxidans</u> (17)	<u>D.vulgaris</u> (14)	<u>D.Norway</u> (16)
Lis	4	6	3	4	2	4	5
His	0	0	0	0	0	0	0
Arg	0	0	0	0	0	0	0
Tri	2	1		1		1	
Asp	11	8	8	7	8	7	13
Tre	3	2	2	2	2	3	4
Ser	0	2	1	2	2	2	0
Glu	6	4	7	8	4	3	5
Pro	5	5	5	6-7	5	6	5
Gli	6	5	6	6	6	6	7
Ala	0	4	3	6	4	4	5
Cis	4	4	4	4	4	4	4
Val	5	3	2	5	4	5	6
Met	1	1	1	1	2-3	1	1
Ile	2	2	0	2	2	0	0
Leu	1	1	2-3	0	1	1	1
Tir	3	3	2	3	3	3	4
Fen	2	2	2	3		2	2
Total	55	52	48-49	60-61	51-52	52	62

-violeta e visível - C.pasteurianum Rd (31), D.gigas Rd (10)
D.Norway Rd (16), D.vulgaris Rd (14), D.salexigens Rd (18)
D.africanus Rd (19), e Drm.acetoxidans Rd (17);
RPE - C.pasteurianum Rd (71), D.gigas Rd
MCD - C.pasteurianum Rd (54) e D.gigas Rd

As diferenças observadas nos valores dos potenciais de oxidação-redução nas rubredoxinas estudadas pode resultar de diferenças estruturais no centro activo. Para uma molécula pequena como a rubredoxina as diferenças nos grupos carregados atrás indicados pode ser determinante no constrangimento imposto pela cadeia polipeptídica no centro de ferro assim como na especificidade das interacções proteína-proteína. A importância das diferenças nos resíduos carregados foi usada (72) para explicar a elevada especificidade da NADH-H^+ rubredoxina oxido-reductase de D.gigas para a rubredoxina do mesmo organismo quando comparada com rubredoxinas de outras espécies (D.vulgaris e C.pasteurianum).

A possibilidade de o mesmo tipo de centro variar o seu potencial de oxidação-redução é bem conhecida para outras proteínas como as ferredoxinas de $[4\text{Fe}, 4\text{S}]$ (73) e proteínas hémicas (74).

É interessante notar que ao estudar a interacção do citocromo c_3 com a rubredoxina de D.gigas por RPE o valor obtido para o potencial de oxidação-redução da rubredoxina é ~ 35 mV mais positivo.

III.6.3 - ESTUDOS DE MÖSSBAUER

III.6.3.1 - Desulforedoxina Oxidada

III.6.3.1.1 - Estudos a Campo Baixo

Na Figura III.40 mostra-se um espectro de Mössbauer da desulforedoxina férrica a 4,2 K num campo magnético de 600 Gauss aplicado paralelamente à radiação de observação de Mössbauer. A amostra utilizada foi a mesma do espectro de RPE apresentado na Figura III.34. Para se poder compreender o espectro da figura tem que se acrescentar o hamiltoneano da equação (10) com termos que descrevem as interacções hiperfinas com o núcleo do ^{57}Fe .

$$\hat{H}_{hf} = A_0 \vec{S} \cdot \vec{I} - g_n \beta_n \vec{H} \cdot \vec{I} + \frac{eQV_{zz}}{12} \left[3 I_z^2 - \frac{15}{4} + \eta (I_x^2 - I_y^2) \right] \quad (11)$$

$$\text{com } \eta = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}} \quad \text{e} \quad V_{zz} + V_{yy} + V_{xx} = 0$$

O primeiro termo descreve a interacção magnética da nuvem electrónica com o núcleo; o segundo termo é o termo de Zeeman nuclear que descreve a interacção do momento nuclear magnético $g_n \beta_n \vec{I}$ com o campo aplicado $\vec{H}$ e o terceiro termo representa a interacção de quadrupolo.

V_{ii} , $i = x, y, z$ são as componentes do tensor de quadrupolo ou seja o negativo do gradiente do campo eléctrico. O sistema de eixos principais x, y, z não necessita de coincidir com o eixo

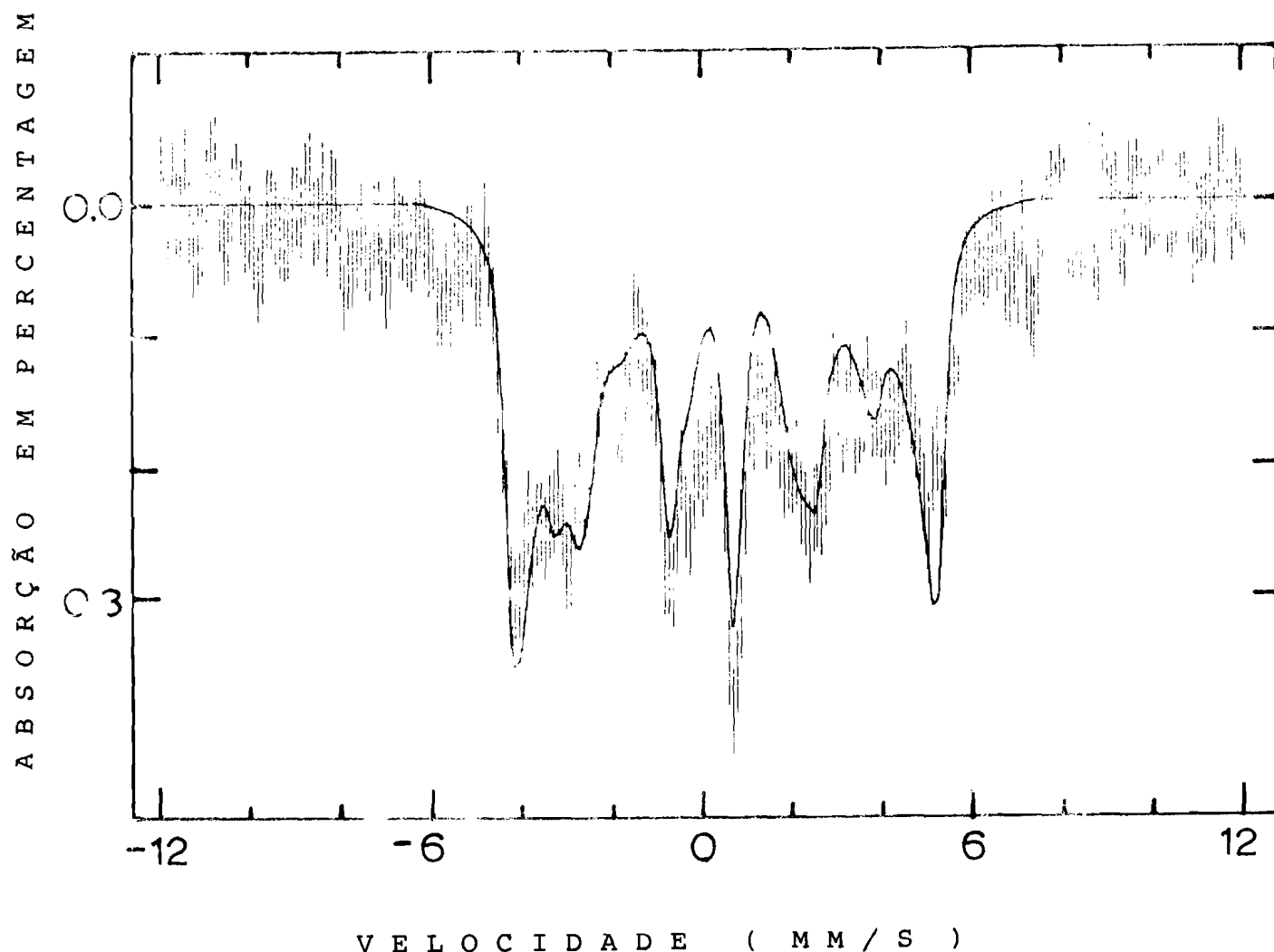


Figura III. 40 . Espectro de Mossbauer da desulforedoxina (estado férrico) a 4,2 K num campo magnético de 500 G aplicado paralelamente à radiação de observação. A amostra tinha as seguintes características: 1,1 mM em proteína e 110 mM em nitrato de sódio. Foram determinados 2,0 átomos de ferro por dímero. 10% do ferro observado corresponde à impureza responsável pelo sinal a $g=8,9$. A linha desenhada a cheio é a curva teórica simulada com os parâmetros apresentados na Tabela III.11.

x,y,z do desdobramento do "zero field". Usando a convenção $|V_{xx}| < |V_{yy}| < |V_{zz}|$ o parâmetro de assimetria η é limitado aos valores $0 < \eta < 1$.

Na ausência de interações magnéticas observa-se um desdobramento de quadrupolo $\Delta E_Q = 1/2 eQV_{zz}(1+1/3\eta^2)^{1/2}$

O espectro da figura III.40 provém essencialmente do dobleto fundamental $m_s = 1/2$ que a 4,2 K tem uma população de 80%. A linha sólida na figura é resultante de uma simulação espectral usando o hamiltoneano $\hat{H} = \hat{H}_e + \hat{H}_{hf}$ e os parâmetros da Tabela III.11.

Na Figura III.41 apresentam-se os espectros simulados de cada um dos dobletos de Kramer usando os parâmetros da Tabela III.11. A 4,2 K só está praticamente populado o dobleto fundamental e o espectro resultante tem as características deste.

Estudaram-se amostras provenientes pelo menos de quatro purificações distintas. Como já referimos nos estudos de RPE quase todas as amostras contêm uma impureza que dá origem a uma ressonância muito pouco intensa a $g=8,9$ (ver Figura III.34). Depois de a amostra ser reduzida com ditionito a impureza aparece como um dobleto de quadrupolo no espectro de Mössbauer (ver Figura III.42). Nas amostras reconstituídas com menos ferro do que a quantidade estequiométrica necessária estava praticamente ausente.

Como já observamos o sinal a $g=8,9$ não existe só nas amostras reconstituídas mas está também presente nas amostras

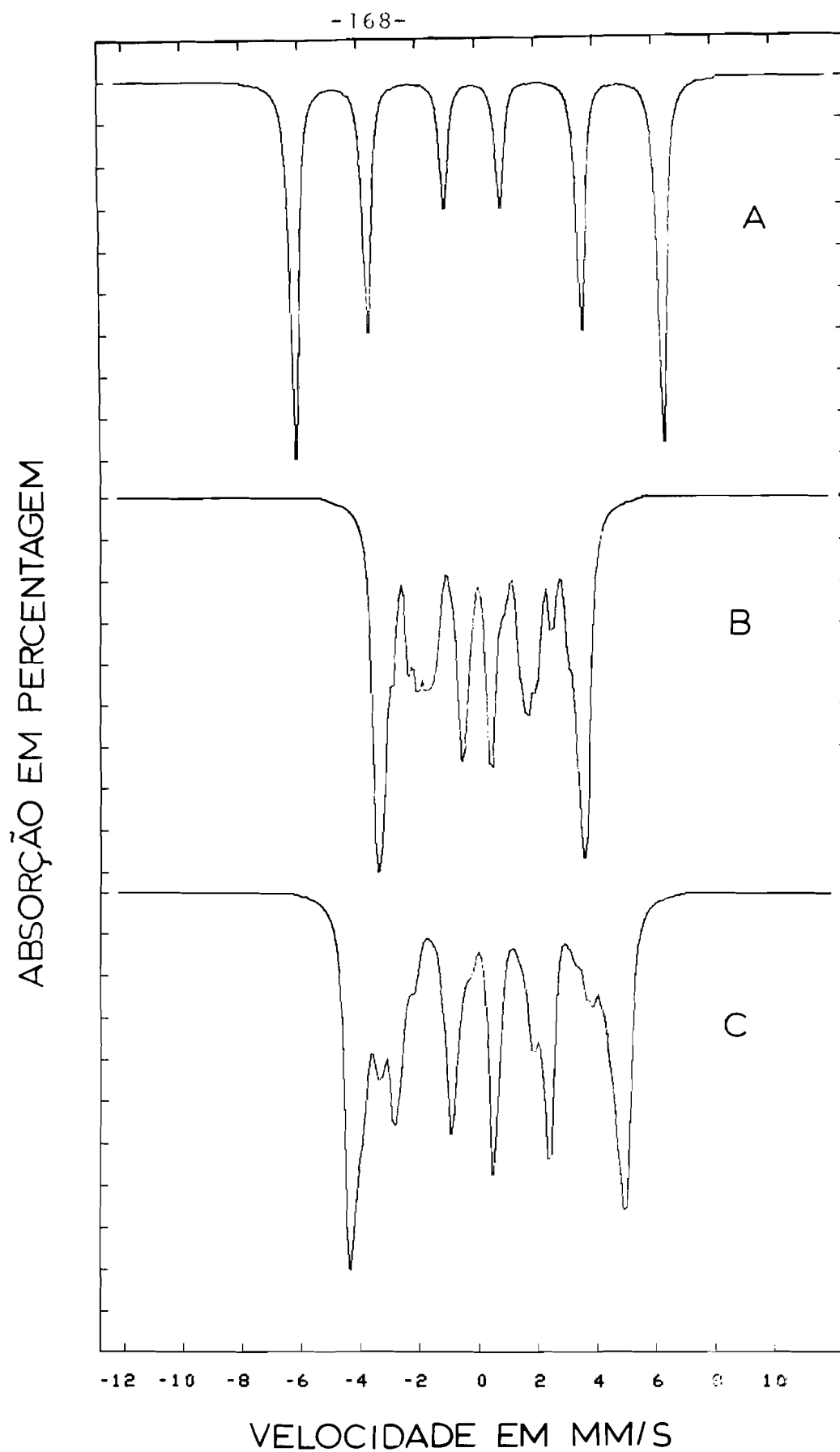


Figura III.41 . Espectros componentes dos três doubletes de Kramer da desulfiredoxina oxidada: (A) nível superior, (B) nível do meio e (C) nível fundamental.

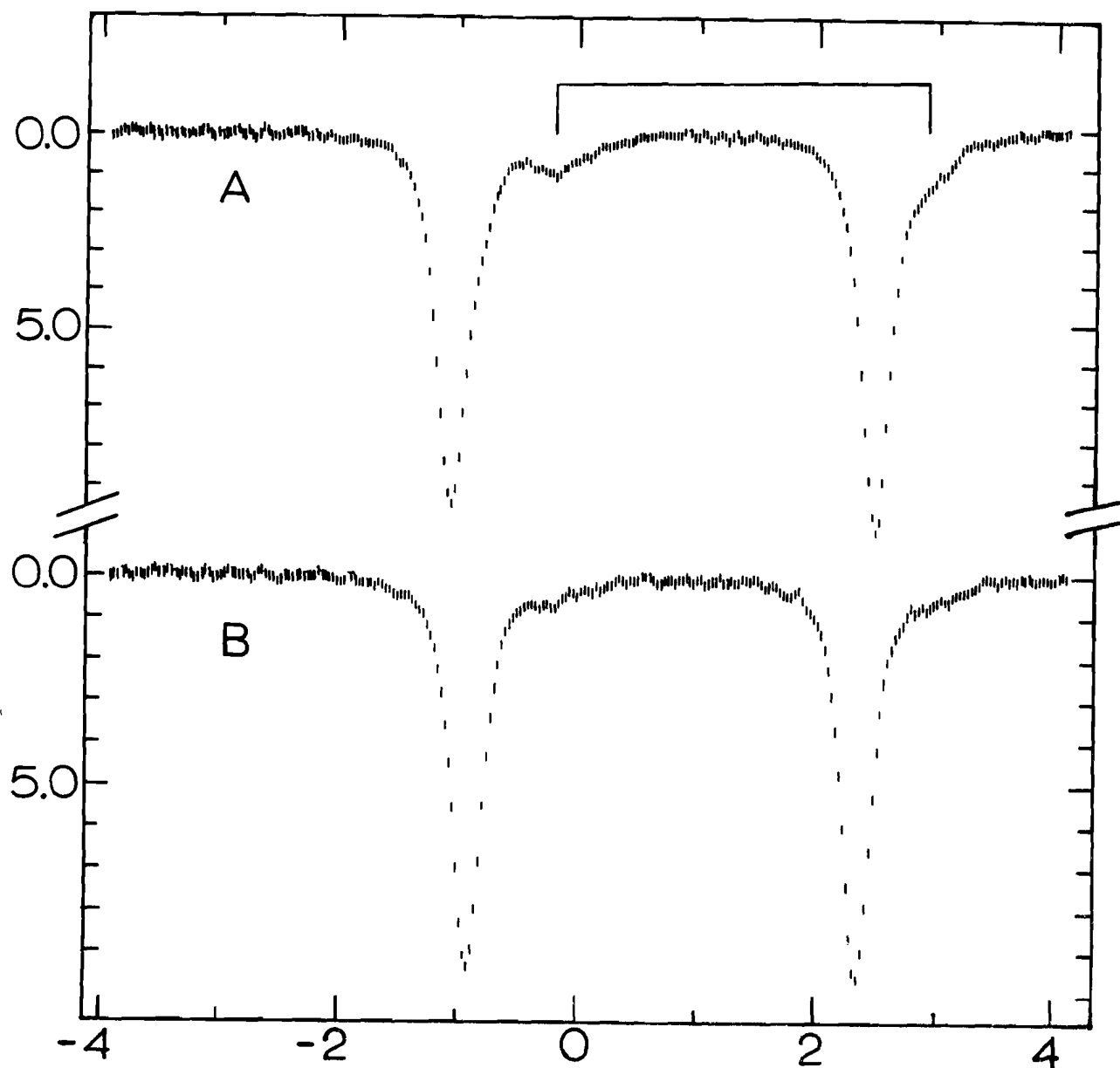


Figura III.42 . Espectro de Mossbauer da desulforedoxina (A) e rubredoxina (B) de D.gigas na forma reduzida (redução com ditionito) a 4,2 K na ausência de campo magnético aplicado. A espécie ferrosa presente em pequena percentagem (menor que 10%) assinalada na figura em (A) representa o mesmo material que origina o sinal de R.P.E. a $g=8,9$ na forma férrica. Uma impureza semelhante está também presente na amostra de rubredoxina.

de desulforedoxina nativa.

As amostras reconstituídas estudadas por Mössbauer contêm muito pouco (menos do que 10% do ferro total) desta espécie.

Além do espectro magnético observado na Figura III.40 nas amostras com baixa concentração de sal observou-se sempre a baixa temperatura um duplete de quadrupolo com $\Delta E_Q = 0,75$ mm/s (ver Figura III.43) que nalguns casos podia representar mais do que 50% do ferro total. O desvio isomérico $\delta = 0,25$ mm/s é o mesmo da componente magnética sugerindo-nos que tanto o espectro magnético como o duplete provém do cromóforo tipo desulforedoxina. Esta afirmação é comprovada por três observações: 1) amostras com diferentes concentrações das duas componentes apresentam o mesmo tipo de espectro óptico e a mesma relação concentração em ferro/intensidade do espectro; 2) a campos magnéticos elevados ($H > 10$ kG) as duas componentes originam o mesmo espectro de Mössbauer; 3) o espectro de Mössbauer na forma reduzida (ver Figura III.42) só apresenta um duplete de quadrupolo para além do correspondente à espécie com $g = 8,9$, que é sempre inferior a 10%.

Estas observações sugerem que o duplete representa ferro com velocidade de relaxação de spin electrónico elevada, possivelmente devida à agregação da proteína. A concentração de duplete diminui à medida que a concentração de sal aumenta. O espectro de Mössbauer da Figura III.40 realizado na presença de sal não tem praticamente nenhum duplete. Como já tínhamos visto por RPE, o ferro que contribuiu para o duplete não é observado, pois tem uma velocidade de relaxação rápida. Só a concentrações mais elevadas de sal é que é possível quantificar o sinal de RPE de modo a obter-se $1\text{spin}/\text{Fe}$.

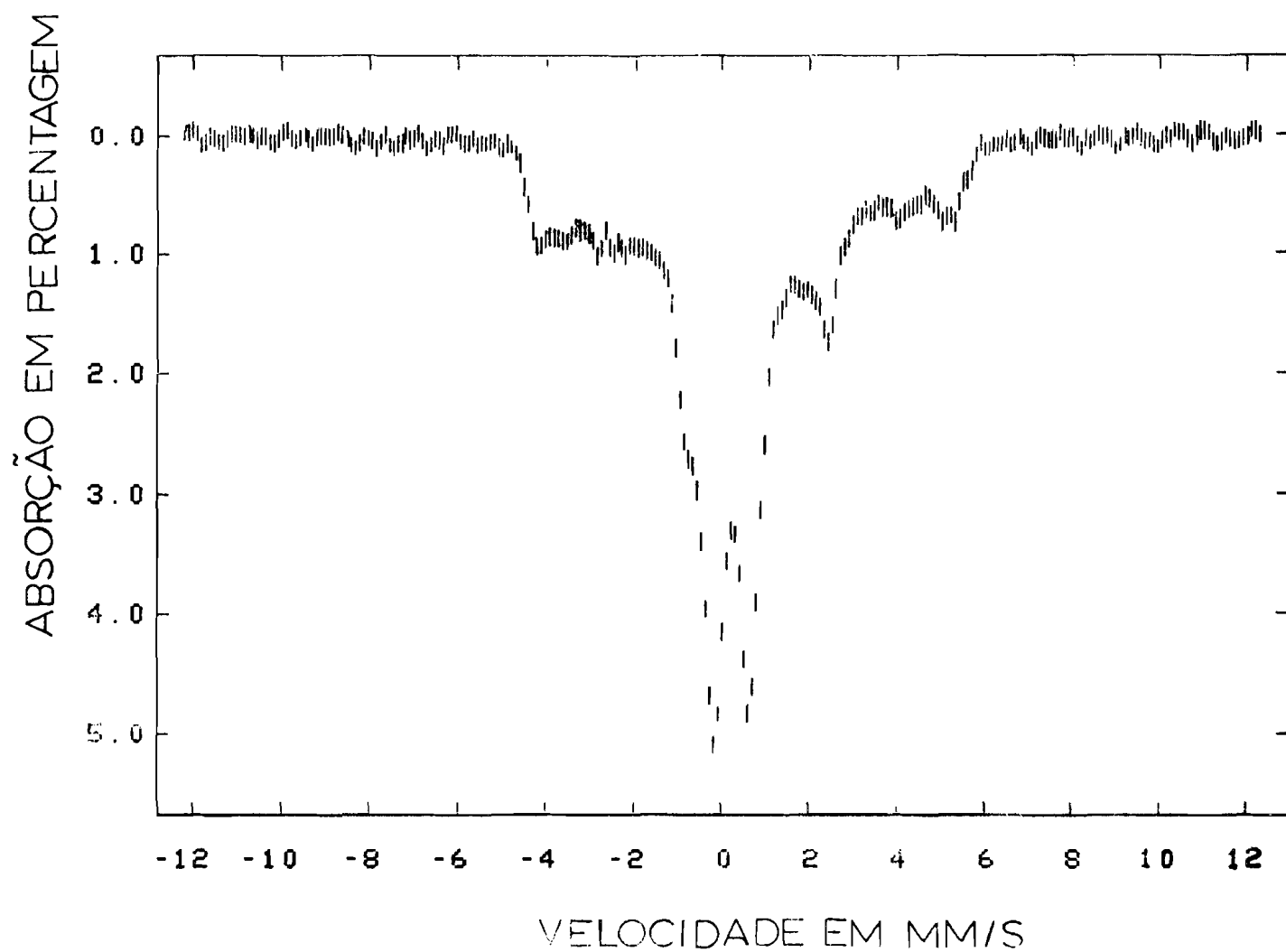


Figura III.43 . Espectro de Mössbauer da desulforedoxina férrica a 4,2 K num campo magnético de 500 G aplicado paralelamente à radiação γ de observação. O espectro foi obtido na ausência de sal.

Sugerimos anteriormente que o dobleto representa possivelmente a proteína agregada. No entanto, sendo a desulforedoxina um dímero que contém dois átomos de ferro não podemos por de parte a possibilidade de interacção entre os spins dos dois ferros. O efeito do sal poderia ser o de desacoplar esta interacção por perturbação da estrutura da proteína. Cammack (75) observou que na ferredoxina de C.pasteurianum a interacção entre os dois centros $[4Fe,4S]$ era destruída na presença de cloreto de sódio. O espectro de RPE na presença de sal consistia na superimposição de dois centros enquanto que na ausência de sal o espectro é mais complexo, talvez devido à interacção entre os dois centros.

Na desulforedoxina, no entanto, o espectro de RPE não se modifica na forma ao longo da titulação com nitrato. Além disso, um dobleto com propriedades de Mössbauer praticamente idênticas foi observado na rubredoxina de C.pasteurianum (P.G.Debruner, comunicação pessoal); esta rubredoxina contudo só tem um átomo de ferro por molécula. No entanto, na rubredoxina de D.gigas nunca observámos este dobleto.

A velocidade de relaxação electrónica de spin da amostra da Figura III.40 é lenta quando comparada com as frequências de precessão nuclear, mesmo a 200 K. Portanto não se

observa um dobleto de quadrupolo a esta temperatura. Para analisar os resultados obteve-se o valor de ΔE_Q do dobleto do material agregado. A_0 é determinado directamente a partir do desdobramento magnético do espectro da Figura III.40. Para Fe metálico. o $H_{int}=330$ kG correspondente a um desdobramento de 10,6 mm/s. Portanto, obtem-se directamente do espectro um desdobramento de 9,5 mm/s a que corresponde $(H_{int})_y=296$ kG. (uma vez que o maior valor de g é na direcção dos yy , as moléculas orientam-se ao longo deste eixo).

Como $(H_{int})_y = \langle \vec{S}_y \rangle \frac{A_0}{g_n n} = \frac{-g_y A_0}{4 g_n \beta_n}$ obtém-se para A_0 um valor de 154 kG. O campo de saturação $H_{sat} = 5/2 A$ será 385 KG.

Sabendo D e E/D a partir dos resultados de RPE o único parâmetro desconhecido é o parâmetro de assimetria $\eta = (V_{xx} - V_{yy}) / V_{zz}$ da interacção de quadrupolo. O valor deste parâmetro é facilmente estimado a partir do valor de V_{yy} e de ΔE_Q já conhecidos. O valor de V_{yy} pode ser estimado pela posição das linhas exteriores do espectro apresentado na Figura III. 40 em relação ao centro do espectro. Obtém-se assim uma primeira aproximação para o valor de η , que foi depois optimizada por simulações sucessivas, obtendo-se o valor $\eta=0,6$ (Tabela III.11).

III.6.3.1.2 - Estudos a Campo Elevado

Não é possível fazer uma estimativa do valor de D a baixo campo por variação de temperatura dos espectros de Mössbauer como foi feito para a rubredoxina de C.pasteurianum porque o

TABELA III. 11

Parâmetros de hamiltoneano de spin da desulforedoxina oxidada e reduzida de D.gigas

	Desulforedoxin oxidada	Desulforedoxina reduzida
$D(\text{cm}^{-1})$	+2,2 (3)	-6 (1)
E/D	0,080 (5)	0,19 (5)
g_x	2,0	2,08 ^a
g_y	2,0	2,02
g_z	2,0	2,20
$A_x/g_n \beta_n$ (kG)	-154 (10)	-200 (30)
$A_y/g_n \beta_n$ (kG)	-154 (5)	-200 (30)
$A_z/g_n \beta_n$ (kG)	-154 (10)	-67 (3)
ΔE_Q (mm/s) ^b	-0,75 (5)	+3,55 (2)
η	0,6 (3)	0,35 (5)
δ (mm/s)	+0,25 (6)	+0,70 (2)
β (graus) ^c	90	10

^a O valor de g_z foi escolhido de modo a reproduzir os valores D , E/D , $\tilde{A}$, ΔE_Q e η ; os valores de g_x e g_y foram determinados a partir de D e E/D a partir das relações $g_x = g_z - 2(D-E)/\lambda$ e $g_y = g_z - 2(D+E)/\lambda$, onde λ , constante de acoplamento spin-orbita, é igual a -80 cm^{-1} .

^b Valores a 4,2 K.

^c β é o ângulo polar entre os eixos dos z dos sistemas de eixos principais dos tensores g e gradiente do campo eléctrico.

espectro magnético da impureza com $g=8,9$ tem componentes de-
baixo do espectro do centro tipo desulforedoxina. Não é pos-
sível, portanto, fazer uma estimativa da contribuição para in-
tensidades de cada um dos dobletos ao longo da temperatura,
uma vez que não sabemos exactamente a contribuição da impureza
nestes.

De qualquer modo, foi possível, a partir dos espectros
traçados a campo magnético elevado, confirmar o valor de D ob-
tido por RPE. Para isso traçaram-se espectros da desulforedo-
xina em campos magnéticos aplicados de 10, 20 e 45 KG (ver
Figura III.44). É de notar que os espectros a campo elevado
têm sinais mais aguçados do que a 500 Gauss (Figura III.40).
O facto de o espectro a 500 Gauss ser alargado deve-se à exis-
tência de uma grande anisotropia nos valores expectáveis de
spin do estado fundamental, $\langle S_x \rangle = -\frac{gx}{4} = -1,03$, $\langle S_y \rangle = -\frac{gy}{4} =$
 $= -1,93$ e $\langle S_z \rangle = -\frac{gz}{4} = -0,45$. A 45 KG há mistura dos níveis,
o que produz um sistema quase axial. Na Figura III.45 apre-
senta-se o diagrama de energia dos níveis electrónicos em fun-
ção do campo aplicado e do valor expectável de spin para as
três direcções. Os valores expectáveis de S_x , S_y e S_z são
respectivamente -2,34, -2,42 e -0,52. As curvas foram calcu-
ladas usando os parâmetros da Tabela III.11 .

A posição das linhas no espectro a campo elevado é mui-
to sensível ao valor de D . Um campo magnético elevado produz
no doubleto electrónico fundamental um grande desdobra-
mento (ver Figura III.46); para os estudos apresentados
aqui só nos interessa considerar o nível com $M_s = -1/2$, uma vez

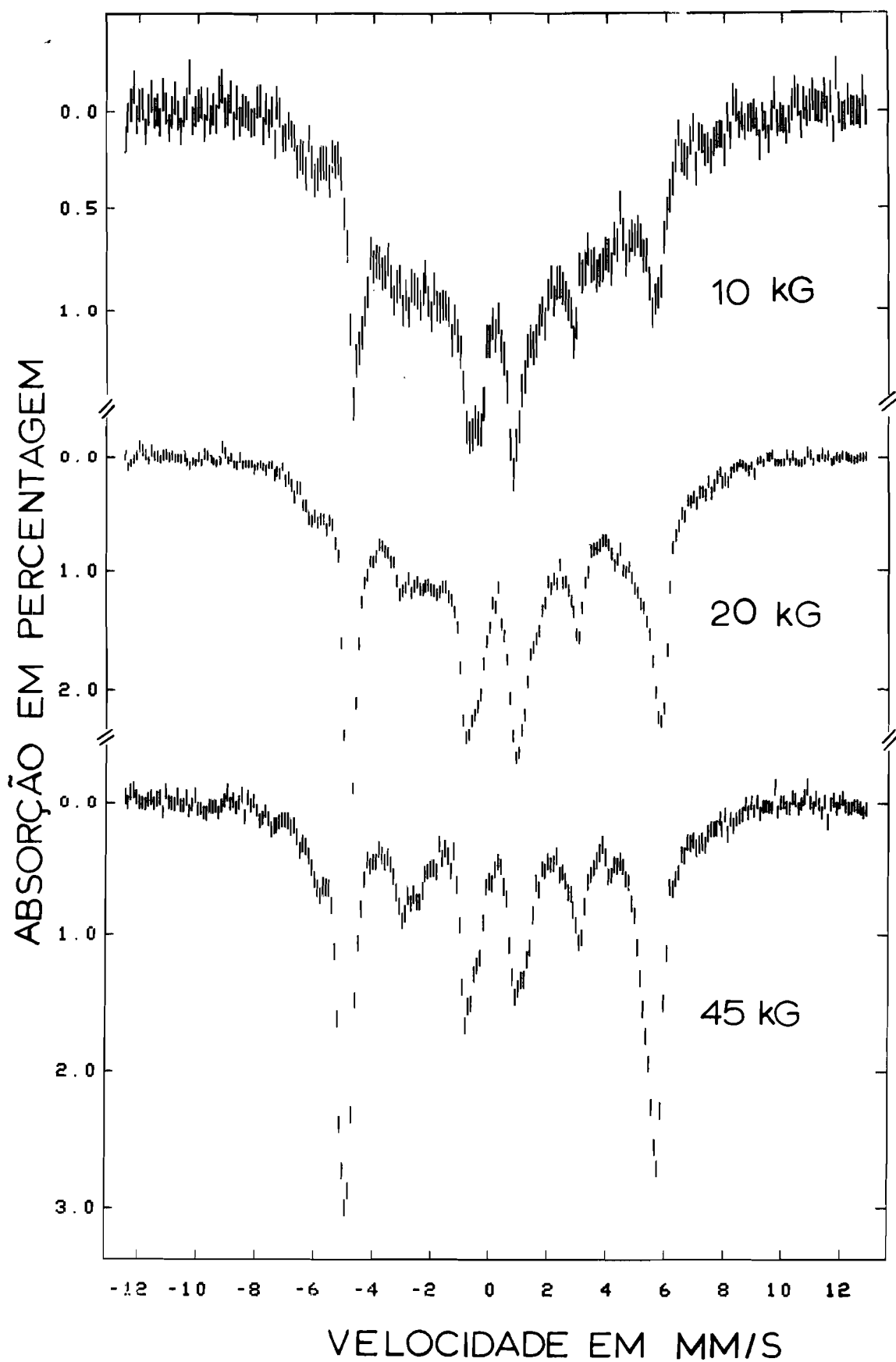


Figura III. 44 . Espectros de Mössbauer da desulforedoxina oxidada a 4,2 K em campos magnéticos paralelos à radiação γ de observação.

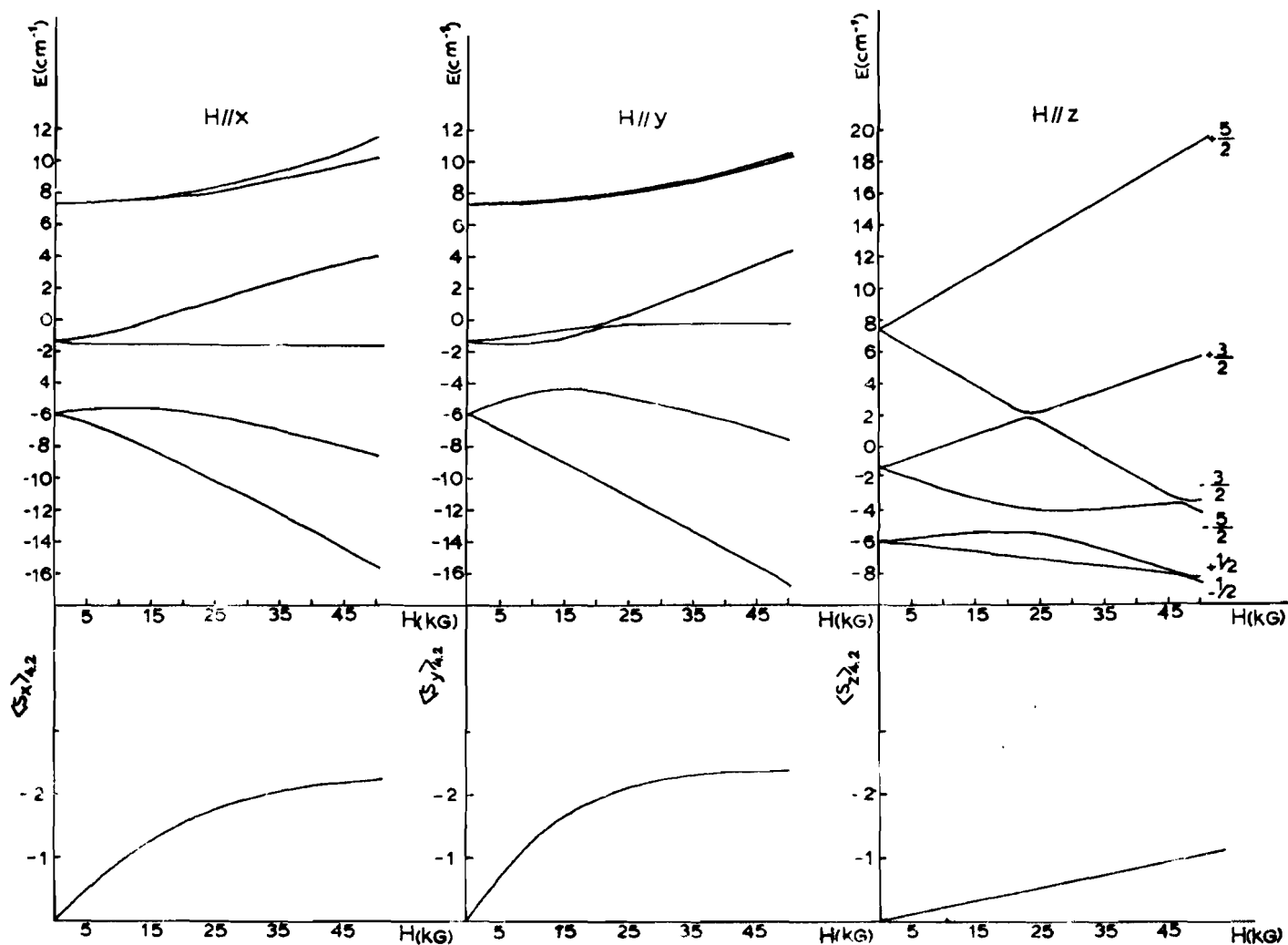


Figura III.45 . Diagrama de variação da energia dos vários subníveis do Fe^{3+} ($S=5/2$) (desulfiredoxina oxidada) em função do campo magnético aplicado. Em baixo, na figura, está representada a variação do valor expectável do spin electrónico a 4,2 K em função do campo magnético.

Os cálculos foram realizados a partir do conjunto de parâmetros indicados na Tabela III.11

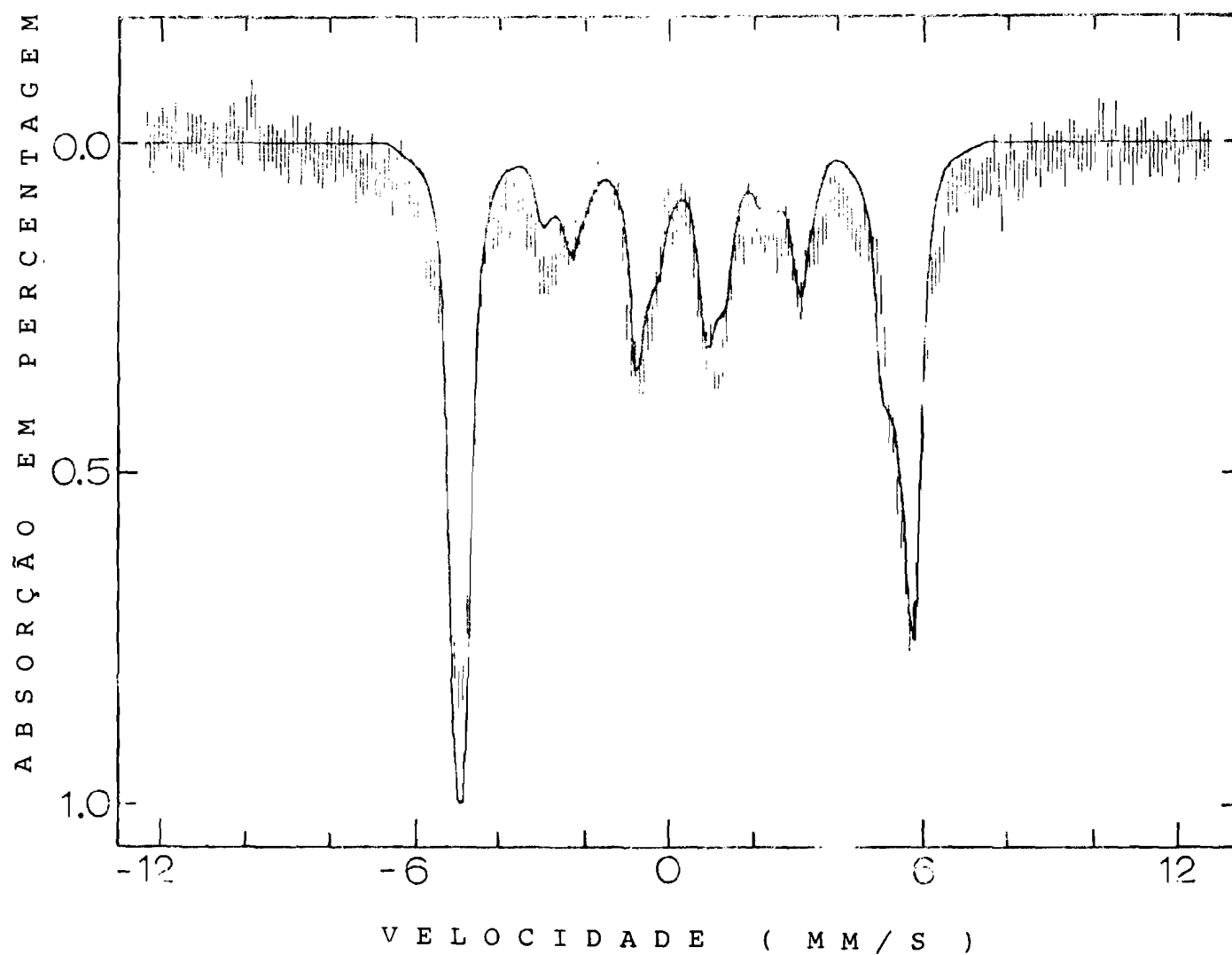


Figura III. 46 .Espectro de Mossbauer da desulforedoxina fêrrica a 4,2 K num campo magnético de 45 KG aplicado paralelamente à radiação γ de observação.

que a 4,2 K só este nível está populado. O núcleo sente um campo magnético efectivo $\vec{H}_{eff} = \vec{H}_{int} + \vec{H}$. Como já vimos as componentes do campo interno são dadas por:

$$H_{int}^{(i)} = \frac{g_i A_0}{4g_n \beta_n} \quad i = x, y, z$$

onde g_i são os valores observados experimentalmente. O campo aplicado mistura o nível com $M_S = -3/2$ com o de $M_S = -1/2$, fazendo aparecer um termo dependente de D no valor de $\vec{H}_{eff}$. Para o caso do campo aplicado na direcção do eixo dos xx obtem-se

$$H_{eff} = \frac{g_x A_0}{4g_n \beta_n} + \left(\frac{2g_o \beta}{g_n \beta_n D} + 1 \right) H_x$$

O primeiro termo dentro de parentesis resulta da mistura do nível $M_S = -3/2$ com o de $M_S = -1/2$.

Como se vê o $\vec{H}_{eff}$ depende do valor de D. Variando D obtêm-se posições diferentes das linhas para um determinado campo aplicado. O valor foi estimado usando os espectros traçados a diferentes valores de campo de modo a haver o melhor ajuste às posições das linhas.

Portanto, sem necessidade de quantificar a intensidade do sinal, o que induziria em erro, uma vez que não sabemos subtrair o espectro da impureza, foi possível estimar para D um valor de $2,2 \pm 0,3 \text{ cm}^{-1}$. Este valor está de acordo com o valor calculado por RPE.

III.6.3.2 - Desulforedoxina reduzida

Na Figura III.42 comparam-se os espectros de Mössbauer da desulforedoxina (A) e rubredoxina (B) reduzidas pelo ditio nito. Os espectros foram realizados a 4,2 K e sem campo aplicado. Os parâmetros de Mössbauer obtidos foram $\Delta E_Q = 3,55$ mm/s e $\delta = 0,70$ mm/s para a desulforedoxina e $\Delta E_Q = 3,37$ mm/s e $\delta = 0,71$ mm/s para a rubredoxina. Dentro da incerteza ($\pm 0,02$ mm/s) os parâmetros da rubredoxina de D.gigas coincidem com os encontrados para a rubredoxina de C.pasteurianum (64). O desdobramento de quadrupolo na desulforedoxina é praticamente independente da temperatura tal como na rubredoxina; a T=200K encontrou-se $\Delta E_Q = 3,50$ mm/s.

O desvio isomérico da desulforedoxina reduzida é típico de ferro(II) de spin-alto, S=2, com coordenação tetraédrica a enxofre.

Para se aprofundar mais as diferenças entre a desulforedoxina e a rubredoxina, mediram-se espectros a 200K em campos paralelos de 55 KG. A "pattern" invertida do tripleto e doubleto da Figura III. 47 mostra bem as diferenças entre as duas proteínas: a desulforedoxina tem $\Delta E_Q > 0$ e $\eta < 0,5$ (o estado fundamental orbital tem simetria $d_{x^2-y^2}$) enquanto que a rubredoxina tem $\Delta E_Q > 0$ e $\eta < 0,5$ (orbital d_{z^2}). O valor elevado de desdobramento de quadrupolo é característico de ferro (II) de alto spin com um estado fundamental orbital não degenerado. Em simetria tetraédrica cinco electrões estão esfericamente distribuídos pelos cinco orbitais 3d e o sexto electrão está igualmente distribuído pelos os orbitais degenerados

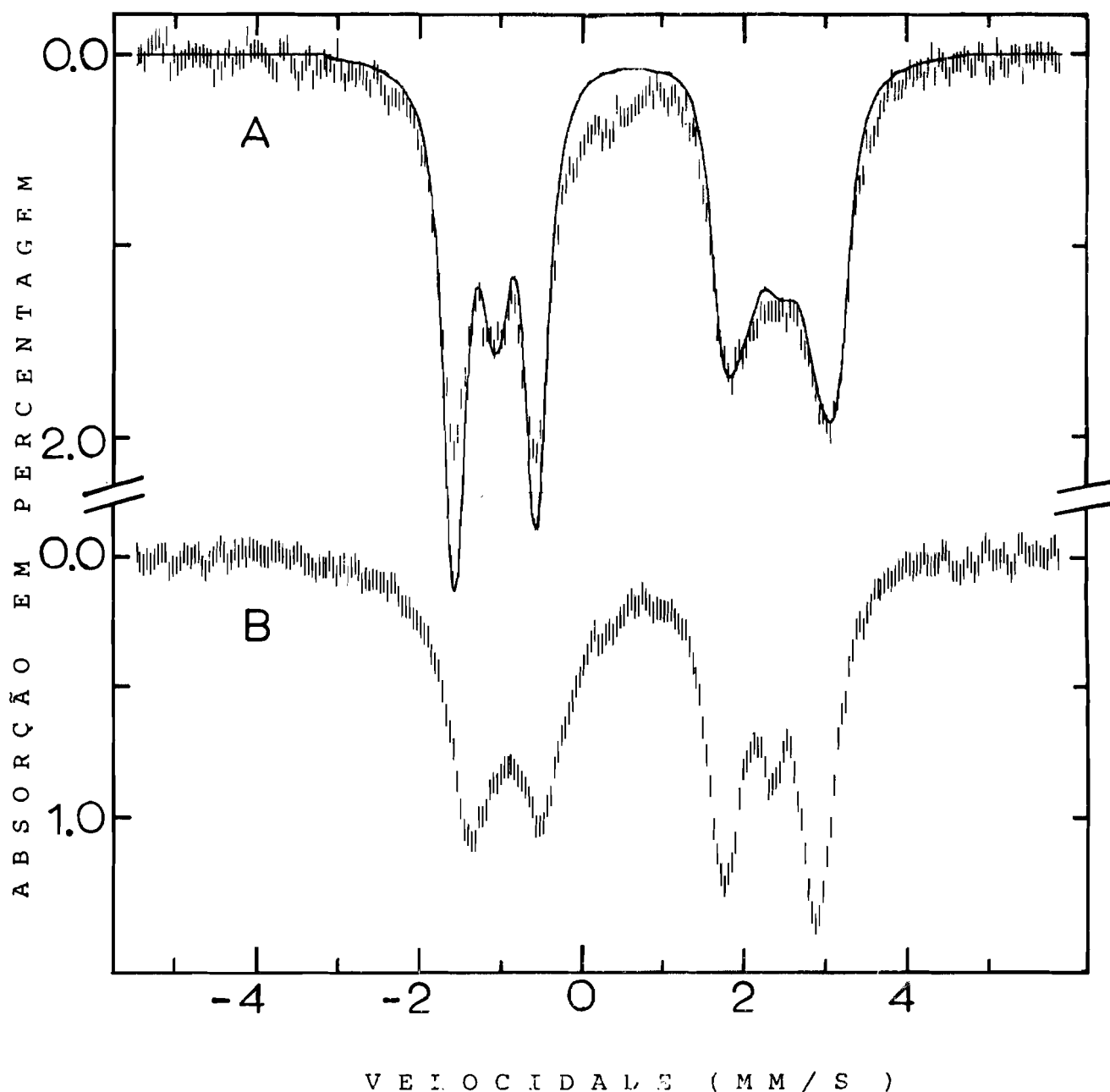


Figura III.47 . Espectro de Mossbauer da desulforedoxina (A) e rubredoxina (B) de D.gigas a 200 K num campo magnético de 55 KG aplicado paralelamente à radiação γ de observação.

A estrutura de triplete e dobleto está invertida quando se comparam os dois espectros. A linha a cheio é o espectro teórico simulado a partir dos parâmetros apresentados na Tabela III.11 . O espectro foi calculado admitindo que a relaxação é rápida.

(d_z^2 , $d_{x^2-y^2}$). Devia-se obter um desdobramento de quadrupolo igual a zero porque um electrão numa orbital d_z^2 produz um gradiente de campo eléctrico de intensidade igual mas de sinal oposto ao produzido por um electrão numa orbital $d_{x^2-y^2}$. O valor elevado de desdobramento de quadrupolo indica que os dois estados d_z^2 e $d_{x^2-y^2}$ estão bem separados em energia. Como ΔE_Q tem sinais diferentes para a desulforedoxina e rubredoxina somos levados a concluir que os estados fundamentais são diferentes para as duas proteínas; portanto, d_z^2 para a rubredoxina e $d_{x^2-y^2}$ para a desulforedoxina.

O espectro da Figura III.47 confirma a análise de Shulz e Debruner (65) que concluíram, a partir dos resultados a baixa temperatura, que $\Delta E_Q < 0$ para a rubredoxina de C.pasteurianum (a velocidade de relaxação de spin da rubredoxina de C.pasteurianum é demasiado lenta para permitir a observação da estrutura do tripleto para velocidades positivas).

Na Figura III.48 mostram-se quatro espectros da desulforedoxina reduzida realizados a 4,2 K em campos elevados paralelos.

Para analisar os espectros das Figuras III.47 e 48 simulamos por computador espectros teóricos para moléculas orientadas ao acaso, usando o hamiltoneano de spin, equações para $S=2$. Em contraste com o caso de ferro(III) de spin-alto ferro(II) requer anisotropia no termo electrónico de Zeeman ($\tilde{g}$) e na interacção magnética hiperfina ($\tilde{A}$).

A metodologia para extrair parâmetros a partir de um conjunto de espectros tem sido descrita na literatura (76).

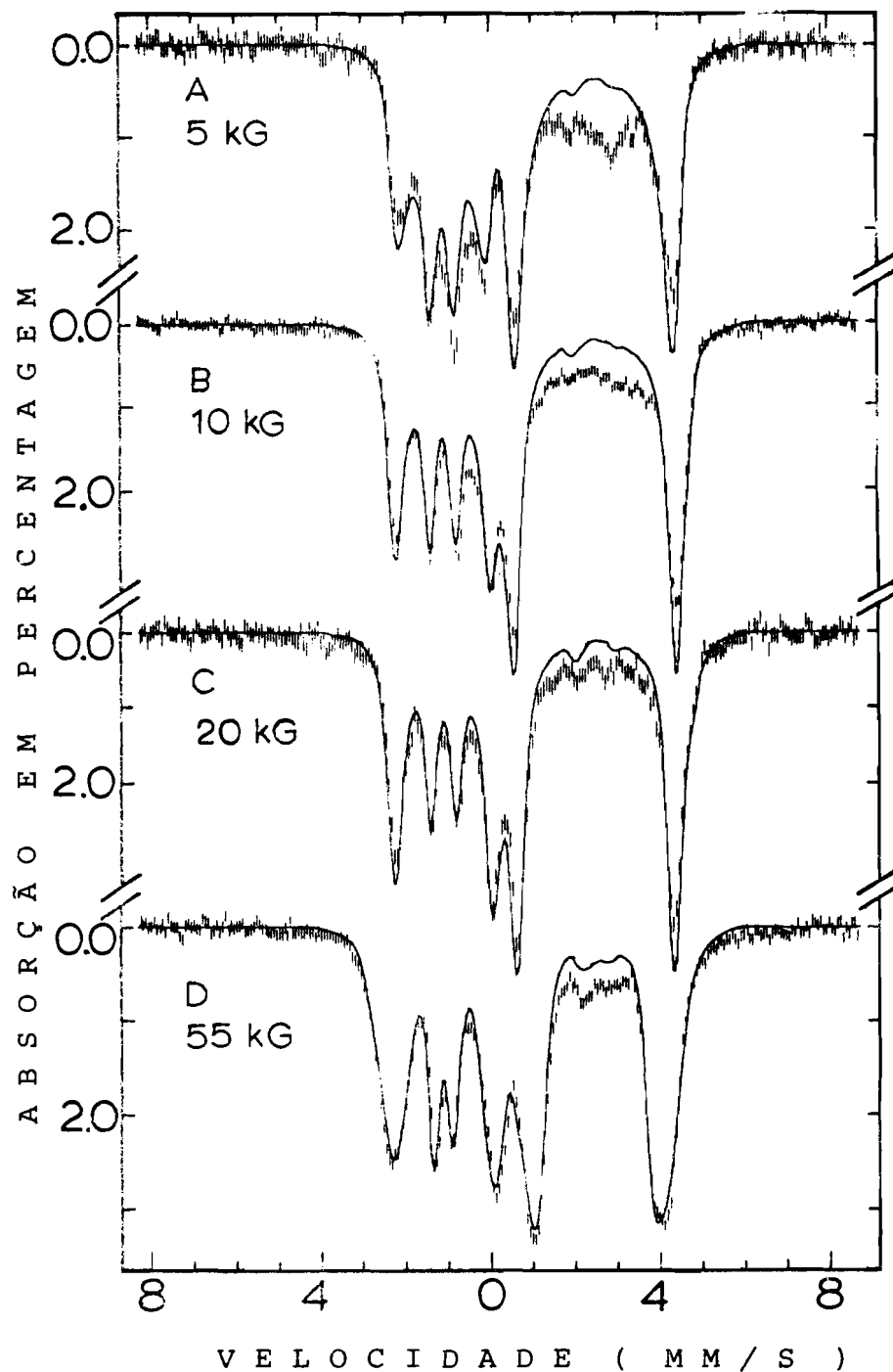


Figura III. 48 . Espectro de Mössbauer da desulforedoxina reduzida a 4,2 K em função do campo magnético aplicado paralelamente à radiação γ de observação. As linhas desenhadas a cheio representam espectros teóricos calculados a partir dos parâmetros apresentados na Tabela III.11 .As diferenças observadas entre as curvas teóricas e as experimentais na região à volta de +3 mm/s são provavelmente devidas ao ferro impureza.

Como já observamos, devido à não variação do desdobramento de quadrupolo com a temperatura, o primeiro estado orbital excitado ($5T_2$) está bem separado do estado orbital fundamental ($5E$). Isto permite-nos exprimir duas componentes do tensor g em função dos parâmetros de estrutura fina D e E , $g_x = g_z - 2(D-E)/\lambda$, e $g_y = g_z - 2(D+E)/\lambda$; sendo λ a constante de acoplamento spin-orbita, este resultado é baseado numa perturbação de segunda ordem (76).

A grandeza crucial que controla os espectros é o campo magnético interno $\vec{H}_{int} = - \langle \vec{S} \rangle \cdot \frac{\vec{A}}{g_n n}$ sendo $\langle \vec{S} \rangle$ o valor expectável do spin electrónico. No limite da relaxação lenta a baixa temperatura ($kT < |D|$, $kT < \beta_e H$), $\langle \vec{S} \rangle$ é essencialmente o valor expectável do estado mais baixo do quinteto de spin. Para velocidade de relaxação rápida e temperaturas elevadas (para $T > 200$ K na desulforedoxina reduzida) $\langle \vec{S} \rangle = \langle \vec{S} \rangle_{th}$ sendo $\langle \vec{S} \rangle_{th}$ obtido fazendo uma média térmica dos cinco subníveis de spin (77)

$$\langle \vec{S}_i \rangle_{th} = \frac{\sum_{N=1}^5 \langle \vec{S}_i \rangle_N e^{-\frac{\Delta E_N}{kT}}}{\sum_{N=1}^5 e^{-\frac{\Delta E_N}{kT}}}$$

onde i designa a componente do spin electrónico e N representa cada um dos cinco estados. E_N é a energia do estado N relativa ao estado de mais baixa energia.

O número de parâmetros ajustáveis nas equações é bastante grande. Há dois parâmetros do "zero-field" (D e E/D), três componentes principais do tensor A (A_x , A_y e A_z), o parâmetro de assimetria η (conhece-se ΔE_Q) e os três ângulos de Euler α, β , e γ (g_z é geralmente próximo de 2 e os resultados

não são muito sensíveis a este parâmetro). É portanto necessário determinar nove parâmetros. Felizmente que, por escolha apropriada das condições experimentais, podem determinar-se subconjuntos destes parâmetros.

Dois factos são notáveis nos espectros a baixa temperatura da Figura III.48 . Primeiro, o desdobramento magnético é saturado para campos aplicados relativamente fracos, o que implica que a velocidade de relaxação do spin electrónico a 4,2 K seja lenta quando comparada com as frequências de precessão nuclear. Segundo, o espectro para campo elevado consiste de linhas razoavelmente aguçadas, em vez de bandas alargadas, devido ao facto de se estar a estudar uma proteína numa solução congelada, ou seja, o campo aplicado tem uma orientação diferente para cada molécula relativa ao tensor de quadrupolo, que é fixo na molécula. Esta observação implica que na desulforedoxina reduzida o campo interno tenha uma direcção fixa relativa aos eixos moleculares. Além disso, o espaçamento relativo das linhas de absorção na Figura III.48 levam a concluir que a maior componente do gradiente de campo $V_{z+z'}$ está desviada de $\beta \approx 10^\circ$ relativamente a $\vec{H}_{int}$, segundo uma análise semelhante à de Kündig (78).

O facto de $\vec{H}_{int}$ ter uma direcção fixa implica que a 4,2K duas componentes de $\langle \vec{S} \rangle$ são muito pequenas comparadas com a terceira. Uma análise não muito aprofundada do espectro de 55KG mostra que $|D| > 4 \text{ cm}^{-1}$. Para $|D| < 4 \text{ cm}^{-1}$ começa a haver duas direcções para as quais $\langle \vec{S} \rangle$ é semelhante.

O desdobramento dos dois estados de menor energia é dado por (76)

$$\Delta = 2D \left\{ \left[1 + 3 \left(E/D \right)^2 \right]^{1/2} - 1 \right\}$$

Usando um programa que calcula espectros de Mössbauer a partir da equação (11) testaram-se vários valores de Δ de modo a traduzir o comportamento de saturação em função do campo aplicado. A partir destas simulações os dois estados de spin de energia mais baixa do quinteto, $S=2$, estão separados por menos de 1cm^{-1} na ausência de campo aplicado. Isto implica que $D < 0$. A partir de simulação detalhada encontrou-se um valor de $\Delta = 0,6 \text{ cm}^{-1}$. Para $D < 0$ o campo interno a 4,2 K tem a direcção do eixo dos zz , $\vec{H}_{\text{int}} = - \langle \vec{S}_z \rangle A_z / g_n \beta_n$, onde $\langle \vec{S}_z \rangle$ é o valor expectável do spin electrónico do estado fundamental (x, y, z são definidos pelo termo de "zero-field") Uma vez que $\langle \vec{S}_z \rangle$ é praticamente independente de E/D e D para $H > 10\text{KG}$ ($-2 < \langle \vec{S}_z \rangle < -1,95$) obtem-se $A_z / g_n \beta_n = -67 \text{ KG}$ directamente do desdobramento magnético total.

Uma vez que $\Delta E_Q > 0$ e η é pequeno, a banda de absorção do lado direito na Figura III.47 provém de transições para os subestados $m_s = \pm 3/2$ do estado nuclear excitado. O desdobramento magnético desta banda de absorção é determinado pela componente de $\vec{H}_{\text{int}}$ ao longo de V_z, z' . Esta componente é dada aproximadamente por $H_{z'} = \langle S_z \rangle_{\text{th}} A_z \cos \beta / g_n \beta_n$ onde $\beta = 10^\circ$. Portanto $\langle S_z \rangle_{\text{th}}$ (a 200K) pode ser determinado pelo desdobramento da banda do lado direito na Figura III.47. Para a determinação de A_x e A_y , uma vez que $\Delta E_Q > 0$ e $\eta < 0,5$ o desdobramento magnético da banda de absorção a velocidades

negativas é controlado por A_x e A_y . Tendo em conta a simetria quase axial do tensor do gradiente do campo eléctrico, pode-se considerar $A_x = A_y$ o que é uma suposição razoável (76) e obter-se $-230 \text{ kG} < A_x/g_n \beta_n < -170 \text{ kG}$. Com esta restrição o parâmetro D desdobramento de "zero-field" e portanto E/D podem ser determinados a partir do espectro da Figura III.48. As linhas a cheio das figuras são o resultado de simulações espectrais usando os parâmetros da Tabela III.11. Considerando que a amostra tem cerca de 10% de impureza, o que parece dar origem a bandas alargadas a alto campo, as simulações dos espectros são bastante satisfatórias.

Na Figuras III.49 apresenta-se o diagrama de energia e do valor expectável de spin para cada uma das direcções em função do campo aplicado, calculado usando o valor de D e E/D apresentados na Tabela III.11. Como se vê, só ao longo do eixo dos zz é que $\langle S \rangle$ toma valores apreciáveis. A 4,2 K só o estado de mais baixa energia é que se encontra populado e é este que dá origem aos espectros de Mössbauer observados.

III.6.3.3 - Rubredoxina oxidada de *D.gigas*

Na Figura III.50 mostram-se os espectros de Mössbauer da rubredoxina de *D.gigas* em soluções congeladas a 1,5 K, 4,2 K e 19 K, num campo magnético fraco aplicado paralelamente à direcção dos raios γ .

Os espectros não diferem dos observados na rubredoxina de *C.pasteurianum*.

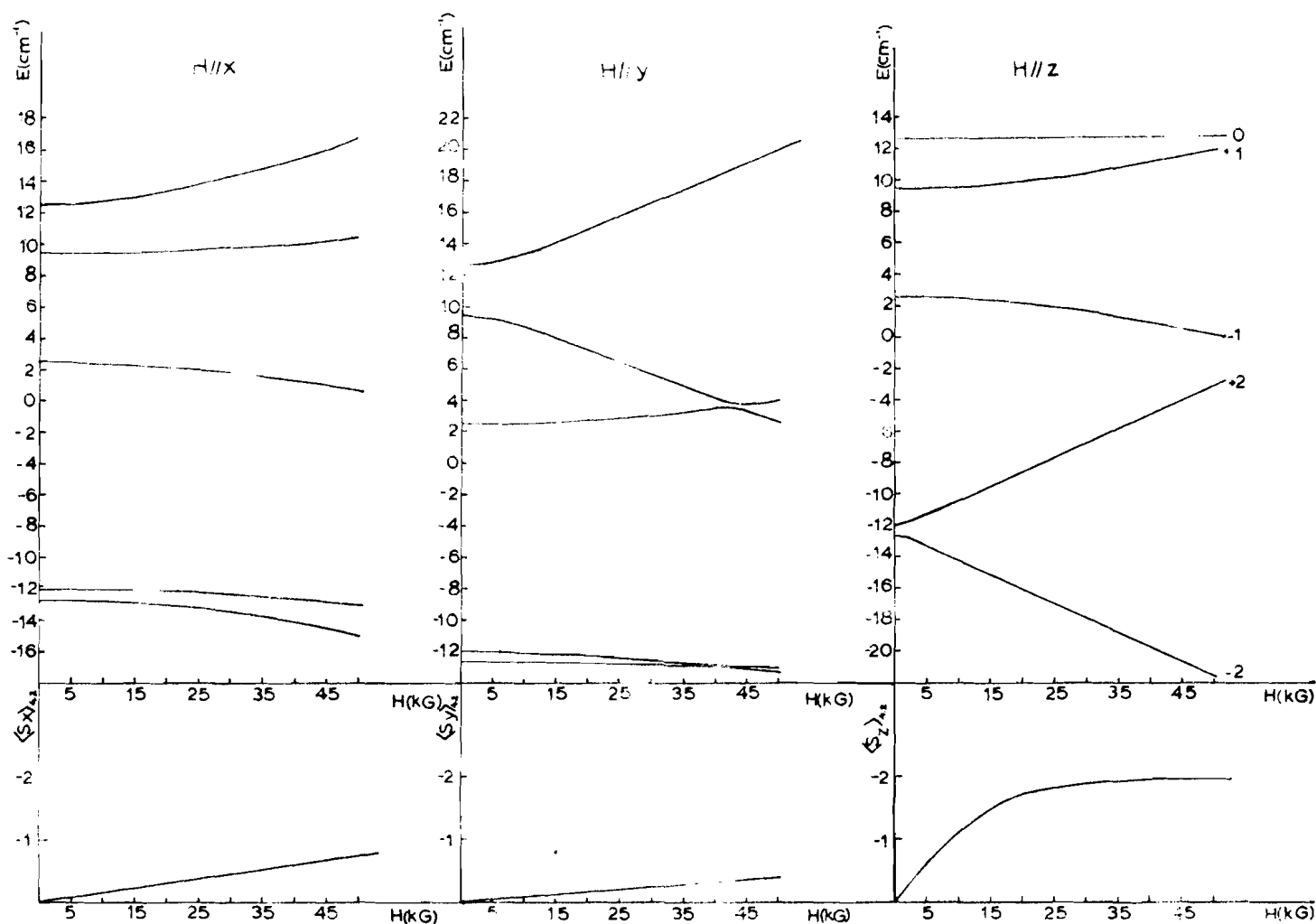


Figura III.49 . Diagrama de variação da energia dos vários subníveis do Fe^{2+} ($S=2$) (desulforedoxina reduzida) em função do campo magnético aplicado. Em baixo, na figura , está representada a variação do valor expectável do spin electrónico a 4,2 K em função do campo magnético.

Os cálculos teóricos foram realizados a partir do conjunto de parâmetros indicados na Tabela III.11

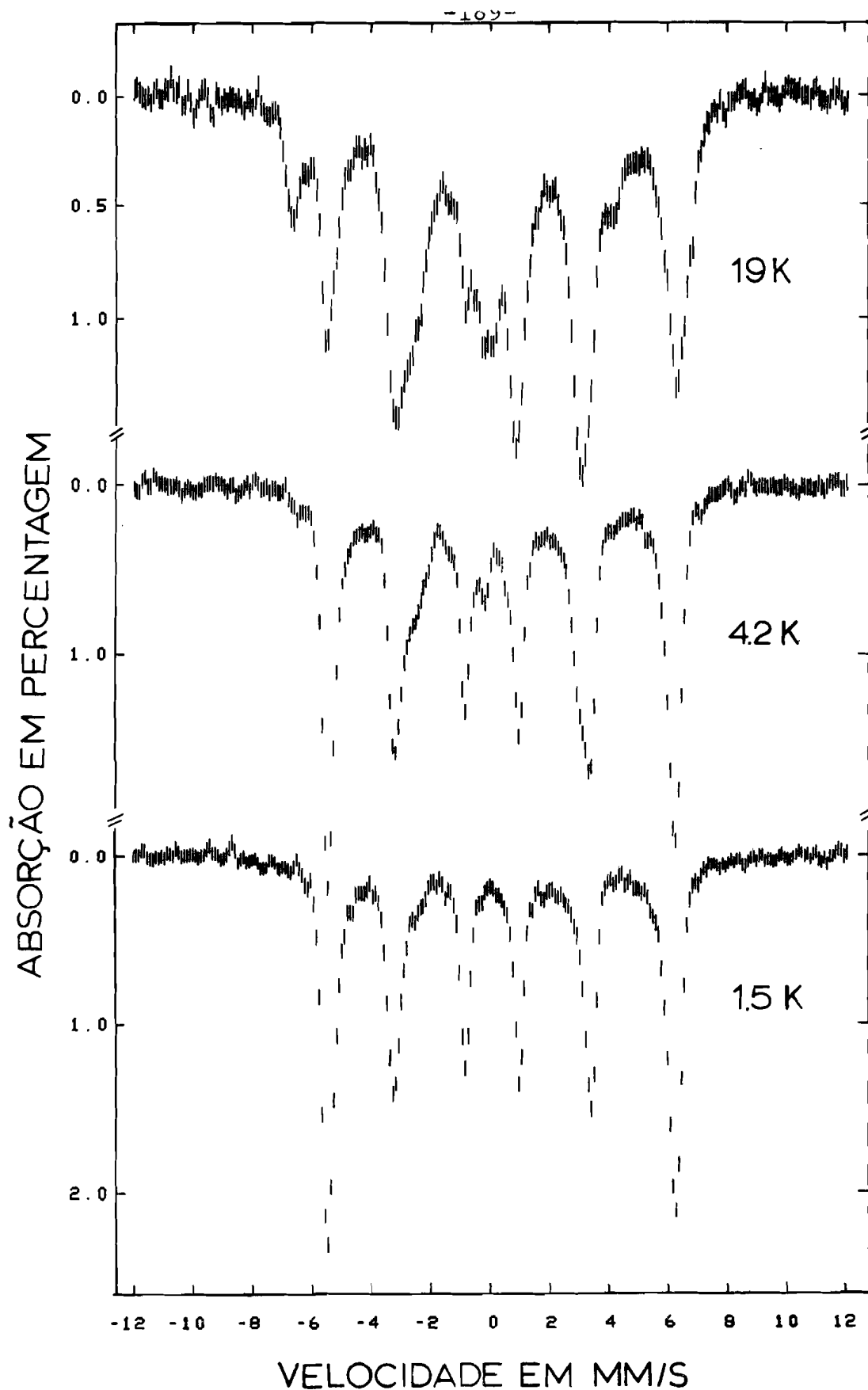


Figura III.50 . Espectros de Mossbauer da rubredoxina de D.gigas num campo magnético de 500 G aplicado paralelamente à radiação de observação .

Na Tabela III.12 apresenta-se uma comparação entre os parâmetros obtidos para esta rubredoxina e a de C.pasteurianum. Os valores apresentados para a rubredoxina de D.gigas devem ser considerados como uma primeira tentativa.

TABELA III.12

	Rd de <u>C.pasteurianum</u>	Rd de <u>D.gigas</u>
δ (mm/s)	0,32	0,25
τ	0,3	0,3
ΔE_Q (mm/s)	-0,50 (5)	-0,47
η	0,2 (1)	0,19
$D(\text{cm}^{-1})$	1,92	1,5
λ	0,23 (2)	0,25
A_x (kG)	165	108
A_y (kG)	159	156
A_z (kG)	169	158

III.6.4 - DISCUSSÃO

Os estudos apresentados nas secções anteriores sugerem grandes semelhanças entre os cromóforos da desulforedoxina e da rubredoxina.

Os resultados de RPE e Mössbauer apoiam esta sugestão mas também revelam alguma disparidade estrutural entre as duas proteínas, o que parece ser bastante interessante.

Várias rubredoxinas têm sido isoladas de diversos organismos e estudadas por diversas técnicas físicas (31). O ferro na rubredoxina está coordenado numa forma aproximadamente tetraédrica a quatro cisteínas (3). Estudos de EXAFS na rubredoxina (29, 30) e de difracção de Raios-X em dois modelos de rubredoxina (34,41) sugerem fortemente que os ligandos sulfurados na rubredoxina estão essencialmente numa configuração não constrangida. Este ponto de vista foi comprovado pela comparação dos resultados de Mössbauer (79,80).

O espectro de absorção e de MCD da desulforedoxina sugere bastante semelhança com a rubredoxina. Os resultados de RPE contudo, indicam algumas diferenças geométricas; o valor pequeno do parâmetro de rombicidade $E/D=0,08$ ($E/D=0,28$ para a rubredoxina) origina um espectro de RPE mais axial para a desulforedoxina (isto contudo não implica necessariamente uma geometria de coordenação mais axial (81)).

Ambas as proteínas no estado oxidado e reduzido têm quase o mesmo desvio isomérico que aliás é característico de coordenação tetraédrica a enxofre (82). O campo de saturação da desulfo-

redoxina dado por $H_{\text{sat}} = -5A_0/2g_n\beta_n$ é - 385 kG o que é uma medida do valor da constante de acoplamento hiperfino A_0 . Este valor é ainda mais ~~baixo do que o encontrado~~ para as rubredoxinas de C.pasteurianum e D.gigas, $H_{\text{sat}} = -410$ kG. Isto sugere uma maior covalência da ligação metal-ligando para a desulforedoxina (compostos iônicos têm campos de saturação de cerca de -550 kG).

Na forma reduzida o centro de ferro da desulforedoxina está no estado ferroso de alto-spin $S=2$. Devido ao desdobramento de quadrupolo não depender da temperatura isto implica a existência de um nível orbital fundamental isolado, separado pelo menos de 800 cm^{-1} do primeiro estado excitado orbital. Os resultados mostram que $\Delta E_Q > 0$ e $\eta < 0,5$, o que implica um estado orbital fundamental de características predominantes $d_{x^2-y^2}$. Em contraste o estado fundamental da rubredoxina é uma orbital d_z^2 . No contexto da teoria do campo dos ligandos os parâmetros que descrevem as distorções tetragonais têm sinais contrários para ambas as proteínas. É interessante notar que parâmetros de campo de ligando tetragonal com sinais opostos aparecem também para ferredoxinas de 2Fe reduzidas. O local ferroso da putidaredoxina (83) e adrenodoxina (84) têm $\Delta E_Q > 0$, enquanto que as ferredoxinas de espinafre e salsa (84) têm $\Delta E_Q < 0$.

Durante o estudo desta proteína temos pensado várias vezes na sequência invulgar das cisteínas e se não será esta a razão que origina uma diferença nas propriedades do cromóforo. As experiências realizadas em relação ao estado das cisteínas levaram a concluir que cada átomo de ferro está coordenado por quatro cisteínas. Os desvios isoméricos observados são consistentes com os valores propostos por Reiff (82) como sendo diag-

nóstico de ferro com coordenação tetraédrica a enxofre. Se o ferro está ligado a quatro resíduos de cisteína seria de concluir que a desulforedoxina tem um centro activo electronicamente distorcido e a distorção deve ser causada pelos resíduos 28 e 29. Como já discutimos atrás, não podemos saber se as quatro cisteínas pertencem à mesma cadeia polipeptídica uma vez que a molécula é um dímero.

Iniciámos recentemente estudos de EXAFS que possivelmente nos darão mais detalhes sobre a geometria do centro activo. Estudos de difracção de raios-X estão em progresso e num futuro próximo a estrutura desta proteína será conhecida.

III.7 - BIBLIOGRAFIA

1. Bach,R. e Le Gall,J., (comunicação pessoal).
2. IUB Nomenclature Committee on Iron-Sulphur Proteins, Eur.J. Biochem., 93, 427 (1979).
3. Watenpaugh,K.D., Sieker,L.C., Merriot,J.R., e Jensen,L.H., Acta Cryst., 829, 943 (1973).
4. Watenpaugh,K.D., Sieker,L.C., Herriot,J.R. e Jensen,L.H., Cold Spring Harbour Symp.Quant.Biol., 36, 359 (1971).
5. Adman,E.T., Sieker,L.C., Jensen,L.H., Bruschi,M., e Le Gall,J., J.Mol.Biol., 112, 113 (1977).
6. Buchanan,B.B., Lovenberg,W. e Rabinowitz,J.C., Proc.Natl.Acad. Sci.USA, 49, 345 (1963).
7. Mortenson,L.E., Biochim.Biophys.Acta, 81, 71 (1964).
8. Stadtman,T.C., em "Non-heme Iron Proteins: Role in Energy Conversion", (A.San Pietro,ed.) p.439, Yellow Springs, Ohio, Antich Press (1965).
9. Mayhew.S.G., e Peel,J.L., Biochem.J., 100, 80 (1966).
10. Le Gall,J. e Dragoni,N., Biochem.Biophys.Res.Comm., 23, 145 (1966).
11. Lovenberg,W., in Conf.Protides Biolog.Fluids, 14th (H.Peeters, ed.) p.165, Elsevier,Amsterdam (1966).
12. Bachmayer,H., Piette,L.H., Yasunobu,K.T. e Whiteley,H.R., Proc.Nat.Acad.Sci.,USA, 57, 122 (1967).
13. Newman,D.J. e Postgate,J.R., Eur.J.Biochem., 7, 45 (1968).
14. Bruschi,M., Biochem.Biophys.Acta, 434, 4 (1976).
15. Bruschi,M., Biochem.Biophys.Res.Comm.,70, 615 (1976).
16. Bruschi,M., Hatchikian,E.C., Golovleva,L.A. e Le Gall,J., J.Bacteriol., 129, 30 (1977).

17. Probst, I., Moura, J.J.G., Moura, I., Bruschi, M., e Le Gall, J.,
Biochim.Biophys.Acta, 502, 38 (1978).
18. Moura, I., Moura, J.J.G., Bruschi, M. e Le Gall, J., Biochim.Biophys.
Acta, 591, 1 (1980).
19. Hatchikian, E.C., Jones, H.D., e Bruschi, M., Biochim.Biophys.Acta
548, 471 (1979).
20. Peterson, J.A., Basu, D., e Coon, M.J., J.Biol.Chem., 241, 5162
(1966).
21. Moura, I., Moura, J.J.G., Santos, M.H., Xavier, A.V., e Le Gall, J.,
FEBS Lett., 107, 419 (1979).
22. Bunker, B. e Stern, E.A., Biophys.J., 19, 253 (1977).
23. Pierrot, M., Haser, R., Frey, M., Bruschi, M., Le Gall, J., Sieker,
L.C., e Jensen, L.H., J.Mol.Biol., 107, 179 (1976).
24. Vogel, H., Bruschi, M. e Le Gall, J., J.Mol.Evol., 9, 111 (1977).
25. May, S.W. e Kuo, J.Y., J.Biol.Chem., 252, 2390 (1977).
26. Odom, J.M., Bruschi, M., Peck, H.D.Jr. e Le Gall, J., Fed.Proc.
35, 1360 (1976).
27. Herriot, J.R., Sieker, L.C., e Jensen, L.H., J.Mol.Biol., 50, 391,
(1970).
28. Watenpaugh, K.D., Sieker, L.C., e Jensen, L.H., J.Mol Biol., 131,
509 (1979).
29. Shulman, R.G., Eisenberger, P., Blumberg, W.E., e Stombaugh, N.A.,
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 72, 4003 (1975).
30. Sayers, D.E., Stern, E.A. e Herriot, J.R., J.Chem.Phys., 64, 427
(1976).
31. Eaton, W.A. e Lovenberg, W., em "Iron-Sulfur Proteins" (Lovenberg
W. ed.), Vol.2, p.127 (1973).

32. Sieker, L.C., Watenpaugh, K.D., e Jensen, L.H., Am.Cristallogr. Ass. Sping.M.Abstr., Berkeley, p.79 (1974).
33. Churchill, M.R. e Wormald, J., Inorg.Chem., 10, 1778 (1971).
34. Coucouvanis, D., Swenson, D., Baenziger, N.C., Holah, D.G., Kostikas, A., Simopulos, A. e Petrouleas, V., J.Am.Chem.Soc., 98, 5721 (1976).
35. Davison, A., e Switkes, E.S., Inorg.Chem., 10, 837 (1971).
36. Davison, A. e Reger, D.L., Inorg.Chem., 10, 1967 (1971).
37. Coucouvanis, D., Holah, D.G., e Hollander, J.F., Inorg.Chem., 14, 2657 (1975).
38. Holah, D.G., e Coucouvanis, D., J.Am.Chem.Soc., 97, 6917 (1975).
39. Anglin, J.R., e Davison, A., Inorg.Chem., 14, 234 (1975).
40. Lane, R.W., Ibers, J.A., Frankel, R.B., e Holm, R.H., Proc.Natl. Acad.Sci., USA, 72, 2868 (1975).
41. Lane, R.W., Ibers, J.A., Frankel, R.B., Papaefthymiou, G.C. e Colm, R.H., J.Amer.Chem.Soc., 99, 84 (1977).
42. Philips, W.D., Poe, M., Weiher, J.F., McDonald, C.C., e Lovenberg, W., Nature, 227, 574 (1970).
43. Lovenberg, W., e Sobel, B.E., Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 54, 193 (1965).
44. Rao, K.K., Evans, M.C.W., Cammack, R., Hall, D.O., Thomson, C.L., Jackson, P.J. e Johnson, C.E., Biochem.J., 129, 1063 (1972).
45. Kostikas, A., Petrouleas, V., Simopoulos, A., Coucouvanis, D., e Holah, D.G., Chem.Phys.Lett., 38, 582 (1976).
46. Peterson, J.A., e Coon, M.J., J.Biol.Chem., 243, 329 (1968).
47. Moura, I., Xavier, A.V., Cammack, R., Bruschi, M., e Le Gall, J., Biochim.Biophys.Acta, 533, 156 (1978).
48. Hong, J.S. e Rabinowitz, J.C., J.Biol.Chem., 245, 6574 (1970).

49. Boyer, P.D., J.Am.Chem.Soc., 76, 4331 (1954).
50. Ambler, R.P., Methods in Enzymology, 11, 436 (1967).
51. Peterson, J.A., Basu, D., Coon, M.J., J.Biol.Chem., 241, 5162 (1966).
52. McCarty, K.F., e Lovenberg, W., Biochem.Biophys.Res.Comm., 40, 1053 (1970).
53. Sieker, L.C., Bruschi, M., Le Gall, J., Moura, I., e Xavier, A.V., Ciênc.Biol. (Portugal), 5, 145 (1980).
54. Rivoal, J.C., Briat, B., Cammack, R., Hall, D.O., Rao, K.K., Douglas, I.N., e Thomson, A.J., Biochim.Biophys.Acta, 493, 122 (1977).
55. Rivoal, J.C., e Briat, B., Mol.Phys., 27, 1081 (1974).
56. Gillard, R.D., McKenzie, E.D., Mason, R., Mayhew, S.G., Peel, J.L., e Stangroom, J.E., Nature (Londres), 208, 769 (1965).
57. Atherton, N.M., Garbett, K., Gillard, R.D., Mason, R., Mayhew, S.J., Peel, J.L. e Stangroom, J.E., Nature (London), 212, 590 (1966).
58. Garbett, K., Gillard, R.D., Knowles, P.F., e Stangroom, J.E., Nature (London), 215, 824 (1967).
59. Lovenberg, W. e Williams, W.M., Biochemistry, 8, 141 (1969).
60. McDonald, C.C., Philips, W.D., e Glickson, J.D., J.Amer.Chem.Soc., 93, 235 (1971).
61. Peisach, J., Blumberg, W.E., Lode, E.T., e Coon, M.J., J.Biol.Chem., 246, 5877 (1971).
62. Blumberg, W.E., e Peisach, J., Ann.N.Y.Acad.Sci., 222, 539 (1973).
63. Palmer, G., Brintzinger, H., Estabrook, R.W. e Sands, R.H., em "Proceedings of the Second International Conference on Magnetic Research in Biological Systems", (A.Ehrenberg, B.G.Malmstrom, e T.Vanngard, eds.), p.159, Pergamon Press, Oxford (1967).
64. Debrunner, P.G., Münck, E., Que, L. e Schulz, C.C., Iron-Sulfur Proteins, 3, 381 (1976).

65. Schulz,C., e Debrunner,P.G., Int.Conf.Appl.Mössbauer Effect, J.Phys.Paris Colloque 37, 66-153 (1976).
66. Spartialian,K., e Oosterhuis, ., J.Chem.Phys., 59, 617 (1973).
67. Champion,P.M., Lipscomb,J.D., Münck,E., Debrunner,P.G., e Gunsalus,I.C., Biochemistry, 14, 451 (1975).
68. Champion,P.M., Chiang,R., Münck,E., Debrunner,P.G., e Hager, L.P., Biochemistry, 14, 4159 (1975).
69. Kent,T., Spartialian,K., Lang,G. e Yonetani,T., Biochim.Biophys. Acta, 490, 331 (1977).
70. Aasa,R., e Vanngard,T., J.Magn.Res., 19, 308 (1975).
71. Blumberg,W.E., em "Magnetic Resonance in Biological Systems", (Ehrenberg,A., et al., eds.) p.119, Pergamon Press, Oxford (1967).
72. Le Gall,J., DerVartanian,D.V., e Peck,H.D., Current Topics in Bioenergetics, (1979) in press.
73. Carter Jr.,C.W., Kraut,J., Freer,S.T., Alden,R.A., Sieker,L.C., Adam,E.T. e Jensen,L.H., Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 69, 3526 (1972).
74. Moore,G.R., e Williams, R.J.P., FEBS Lett., 79, 229 (1977).
75. Cammack,R., Biochem.Soc.Trans., 3, 482 (1975).
76. Zimmermann, R., Spiering,H., e Ritter,G., Chem.Phys., 4, 133, (1974).
77. Münck,E. e Champion,P.M., J.Phys.Colloque, 35, suppl.12, 33 (1974).
78. Kundig,W.,Nucl.Instrum.Methods, 48, 219 (1967).
79. Petrouleas,V., Simopoulus,A., Kostikas,A. e Coucouvanis,D., J.Phys.Colloque 37, Suppl.12, 159 (1967).
80. Frankel,R.B., Zapaefthymiou,G.C., Lane,R.W., e Holm.R.H., J.Phys.Colloque 37, Suppl.12, 165 (1976).
81. Emptage,M.H., Zimmermann,R., Que,L.Jr., Münck,E., Hamilton,W.D., e Orme-Johnson,W.H., Biochim.Biophys.Acta, 495, 12 (1977).

82. Reiff, W.M., em "Mössbauer Effect Methodology, (Gruwerman, I.J., e Seidel, C.W., eds.) Vol.8, z.89, Plenum Press, N.Y., (1973).
83. Münck, E., Debrunner, P.G., Tsibris, J.C.M., e Gunsalus, I.C., Biochemistry 11, 855, (1972).
84. Dunham, W.R., Bearden, A.J., Salmeen, I.T., Palmer, G., Sands, R.H., Orme-Johnson, W.H., e Beinert, H., Biochim. Biophys. Acta, 253, 134 (1971).
85. Bornstein, P., Biochem. Biophys. Res. Commun., 36, 977 (1969).

IV . EVIDÊNCIA SOBRE A PRESENÇA
DUM NOVO TIPO DE CENTRO
CONTENDO TRÊS FERROS NA
FERREDOXINA II DE D. GIGAS

IV.1 - INTRODUÇÃO

IV.1.1 - PROTEÍNAS DE FERRO-ENXOFRE

As proteínas de ferro-enxofre são proteínas que contêm ferro não hémico ligado a ligandos sulfurados por resíduos cisteína da cadeia polipeptídica e, com excepção das rubredoxinas, por enxofre lábil (1,2,3).

De acordo com a classificação proposta pela IUPAC IUB (4) as proteínas de ferro-enxofre podem dividir-se em proteínas simples e conjugadas, contendo estas últimas grupos prostéticos adicionais (4).

Uma vez que os centros ferro-enxofre podem aceitar ou doar electrões, um de cada vez, a sua função mais vulgar está relacionada com processos de oxidação-redução. Desempenham um papel importante no metabolismo do carbono, hidrogénio, enxofre e azoto, utilizando uma larga gama de potenciais redox (+350 mV na bactéria fotossintética a -600 mV nos cloroplastos).

Muitas das proteínas de ferro-enxofre são classificadas como ferredoxinas, proteínas que transferem electrões de um sistema enzimático para outro, mas que não têm actividade enzimática própria. Contudo, conhecem-se proteínas com outras funções, como a hidrogenase, que contém centros ferro-enxofre e para a qual tem sido postulado que estes centros são activos na catálise. A aconitase (5) contém um único tipo de centro, e tem um papel principal no ciclo do ácido cítrico. Contudo, o centro ferro-enxofre, embora não seja o centro catalítico, parece ter um papel regulador na actividade enzimática.

Algumas das proteínas de ferro-enxofre mais simples têm sido extensivamente caracterizadas pela cristalografia de Raios-X, espectroscopia, e até à pouco tempo, era conhecida a presença de

três tipos de centros (Figura I.2.). Estes são o centro de 1-ferro $[Rd]$, 2-ferros $[2Fe-2S]$ e 4-ferros $[4Fe-4S]$. Este último pode ser subdividido, dependendo do estado de oxidação em que se apresenta. Como se verá adiante supõe-se que a proteína de ferro-enxofre conjugada contém centros de ferro-enxofre semelhantes, o que nalguns casos tem sido demonstrado. Contudo, têm sido observados centros com propriedades anômalas que, como iremos ver neste capítulo, representam uma nova classe de centro.

As proteínas de ferro-enxofre conjugadas contêm outros grupos prostéticos, tais como flavina, hemo, molibdênio, clorofila, pirofosfato de tiamina ou uma combinação destes. Muitas destas proteínas são enzimas com actividade própria.

Os centros de ferro-enxofre conferem cor às proteínas quer vermelho quer castanho. Os espectros ópticos são característicos do tipo de centro, (ver Figura IV.1) mas são alargados e em sistemas complexos são difíceis de resolver. Os espectros de RPE dos centros em estados de oxidação apropriados são distintos (Tabela IV.1) (6) e é o método mais comum de detecção deste tipo de proteínas em sistemas complexos. Devido a estas propriedades, as proteínas de ferro-enxofre são frequentemente isoladas antes de se conhecer o seu papel fisiológico. A análise do tipo e número de centros de ferro-enxofre nas proteínas nem sempre é fácil. A análise de ferro e enxofre lábil pode dar valores errados devido à interferência da proteína e à incerteza na determinação da concentração e do peso molecular da proteína. Têm sido desenvolvidos métodos para

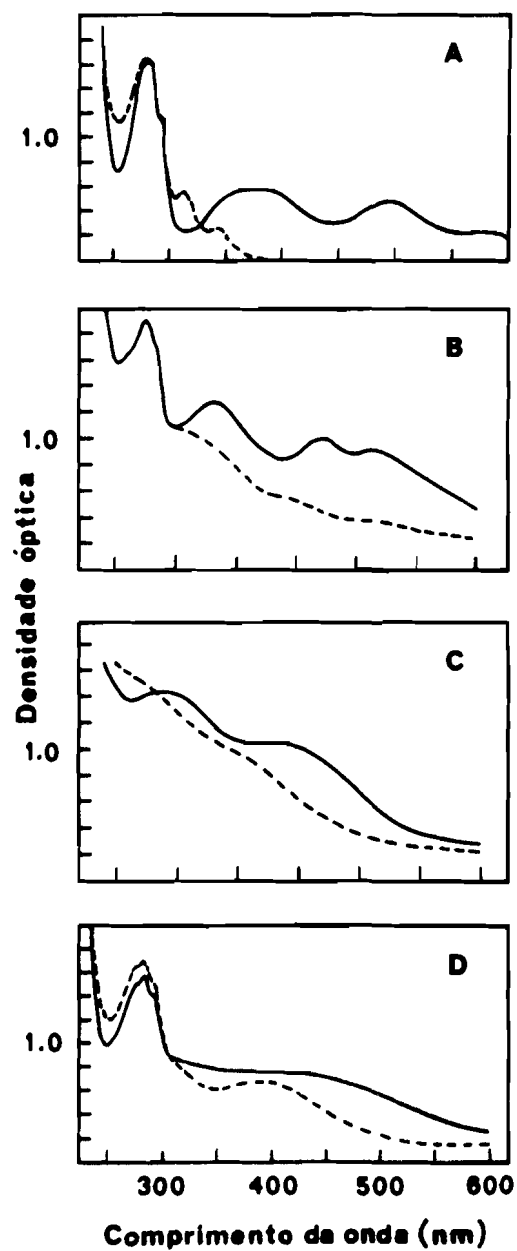


Figura IV.1. Espectros electrónicos de absorção u.v.-visível de centros ferro-enxofre.

Forma oxidada (—) ; forma reduzida (---) .

A - Rubredoxina ; B - Ferredoxina (2Fe,2S) ;

C - Ferredoxina (4Fe,4S) ; D - HiPIP .

TABELA IV.1

Características do sinal de R.P.E.

Rb	Sinal a $g=4,3$ que se pode observar facilmente a 77 K com sinais adicionais a $g=9,4$ para $T < 20$ K, na forma oxidada. Não se observa sinal na forma reduzida.
[2Fe-2S]	Sinal a $g < 2$ na forma reduzida, observável a 77 K. O sinal pode variar de aguçado (putida redoxina) a alargado e rômico (ferredoxinas de plantas). Observa-se um sinal de R.P.E. isotrópico em 80% de DMSO em condições redutoras para $T < 77$ K.
[4Fe-4S]	R.P.E. em 80% de DMSO (em condições redutoras) produz um sinal do tipo axial para temperaturas inferiores a 35 K.

analisar o tipo de centros ferro-enxofre presentes, baseados na extrusão dos centros da proteína (7) ou na espectroscopia de RPE (8).

IV.1.1.1 - Ferredoxinas com centros [4Fe-4S]

As ferredoxinas de 8 Fe de Peptococcus aerogenes ($E = -400$ mV) e a proteína de ferro-enxofre de alto potencial (HiPIP) da bactéria fotossintética Chromatium vinosum ($E = +350$ mV) contêm o mesmo tipo de centro [4Fe-4S] (9). A grande diferença no potencial redox foi explicada por Carter (10) em termos dos diferentes estados de oxidação que os centros poderiam tomar nas duas proteínas. A "hipótese dos três estados" é apresentada na Tabela IV.2. A ferredoxina de P.aerogenes é diamagnética no estado oxidado, enquanto que a HiPIP é diamagnética na forma reduzida. A ferredoxina reduzida é paramagnética, com um sinal de RPE centrado a $g = 1,96$ (11), enquanto que a HiPIP dá origem a um sinal de RPE no estado oxidado com valores de g maiores que 2 (12). O estado de oxidação do centro é designado por +1, +2, +3, adicionando as cargas formais do ferro e enxofre lábil. Portanto, a ferredoxina de P.aerogenes tem dois centros do tipo 1+/2+, enquanto que a HiPIP tem um centro do tipo 2+/3+.

Cammack (13) conseguiu reduzir o centro de [4Fe-4S] da HiPIP de Ch.vinosum ao estado 1+, quando a proteína é desenrolada em dimetilsulfóxido. De maneira semelhante, os centros da ferredoxina de C.pasteurianum podem ser oxidados

TABELA IV.2

Estados de oxidação do centro [4Fe-4S]

"Valência formal dos átomos de ferro"	estado de oxidação	estado magnético	Transições redox típicas em algumas proteínas	
4Fe^{3+}	+4			
$3\text{Fe}^{3+}, 1\text{Fe}^{2+}$	+3	para	HiPIP_{ox}	$\text{Fd}_{\text{super ox}}$
$2\text{Fe}^{3+}, 2\text{Fe}^{2+}$	+2	dia	$\downarrow +350\text{mV}$	$\uparrow$
$1\text{Fe}^{3+}, 3\text{Fe}^{2+}$	+1	para	$\text{HiPIP}_{\text{red}}(\text{estado nativo})$	Fd_{ox}
4Fe^{2+}	0		$\uparrow$	$\downarrow -400 \text{ mV}$
			$\text{HiPIP}_{\text{super red.}}$	Fd_{red}

ao estado 3+ por tratamento com $K_3Fe(CN)_6$ (14).

IV.1.2.- AS FERREDOXINAS DE D.GIGAS

A ferredoxina de D.gigas pode ser isolada em diferentes formas oligoméricas (15) designadas por FdI, FdI' e FdII. Os pesos moleculares das formas oligoméricas são 18 000, 18 000 e 24 000, respectivamente. Com base na composição de ácidos aminados elas são polímeros da mesma subunidade básica de peso molecular, aproximadamente 6 000. A sequência desta subunidade é conhecida (16,17) e apresentada na Figura IV.2.

Os resultados de RMN, de susceptibilidade magnética e de RPE levaram à conclusão que a FdI era semelhante às ferredoxinas bacterianas típicas. Apresenta um paramagnetismo residual na forma oxidada. Ao ser reduzida com ditionito, a molécula torna-se paramagnética (18). Na forma oxidada apresenta um máximo de absorção a 405 nm e por redução a contribuição no visível diminui (15). De acordo com a terminologia de Carter (10) esta forma representaria o estado 1+ do centro de ferro-enxofre. O sinal de RPE na forma reduzida é típico de uma ferredoxina reduzida no estado 1+ ($g=1,94$). No entanto, na forma oxidada observa-se um sinal "isotrópico" a $g=2,02$, que corresponde a 10% do sinal observado após a redução (18).

A FdII é paramagnética na forma oxidada e o espectro de visível tem um máximo a 415 nm (15). Na forma oxidada (proteína nativa) apresenta um sinal de RPE do tipo "isotrópico" a $g=2,02$, muito intenso (18). Por redução com ditionito

Figura IV.2 - Sequência de ácidos aminados da ferredoxina de D.gigas (esta sequência é igual tanto na ferredoxina I, ferredoxina I' e ferredoxina II).

aparece um sinal a $g=1,94$, que só corresponde a 2% do sinal observado na forma oxidada.

A reconstituição da FdII passando pela apoproteína produz uma ferredoxina cujas propriedades são semelhantes às da ferredoxina I (18).

A FdII tem um peso molecular mais elevado do que a FdI, o que poderia indicar que a sua formação estivesse associada com a transformação do trímero a tetramero.

A FdI' comporta-se duma maneira intermediária. Apresenta um sinal de RPE na forma oxidada e reduzida, semelhantes aos da FdII oxidada e FdI reduzida em proporções semelhantes.

Foram determinados os potenciais redox associados com a redução do sinal isotrópico e com o aparecimento do sinal a $g = 1,94$ (18). Na Tabela IV.3 apresenta-se o valor destes potenciais para as três formas, conjuntamente com o valor obtido para a integração de spins.

Tabela IV.3

	nº spins/6 000	Potencial redox (mV)
FdI (ox) $g=2,02$	0,07	- 50
FdI (red) $g=1,94$	0,68	-450
FdI' (ox) $g=2,02$	0,28	- 30
FdI' (red) $g=1,94$	0,33	-430
FdII (ox) $g=2,02$	0,73	-130
FdII (red) $g=1,94$	0,02	-437

A ferredoxina de D.gigas é activa na transferência de electrões na reacção fosforoclástica assim como na transferência de electrões do hidrogénio molecular, via hidrogenase e citocromo c₃ para a redução de sulfito (15,19). Como se mostra na Figura IV.3 os electrões são transferidos a valores diferentes de potencial para cada uma das reacções.

A participação da FdI e FdII nestas duas reacções foi testada por Moura et al. (15,19). Verificou-se que tanto a FdI como a FdII eram activas na transferência electrónica entre a hidrogenase e a redução do sulfito. No entanto, para concentrações inferiores à concentração saturante a FdII é mais eficiente que a forma trimérica FdI, como se pode ver na Figura IV.4. Na reacção fosforoclástica as duas ferredoxinas não são equivalentes no transporte de electrões entre o piruvato e o hidrogénio molecular. Como se vê na Figura IV.4 a FdI é mais activa na transferência de electrões entre o piruvato e o hidrogénio molecular. A ferredoxina II começa a ser activa no transporte de electrões do piruvato após uma fase inicial em que não é activa (Figura IV.5).

Neste capítulo apresentam-se novos resultados de análise de ferro, de susceptibilidade magnética, de RPE e de Mössbauer que levam à conclusão da existência de um novo tipo de centro activo contendo três ferros na ferredoxina II. Este tipo de

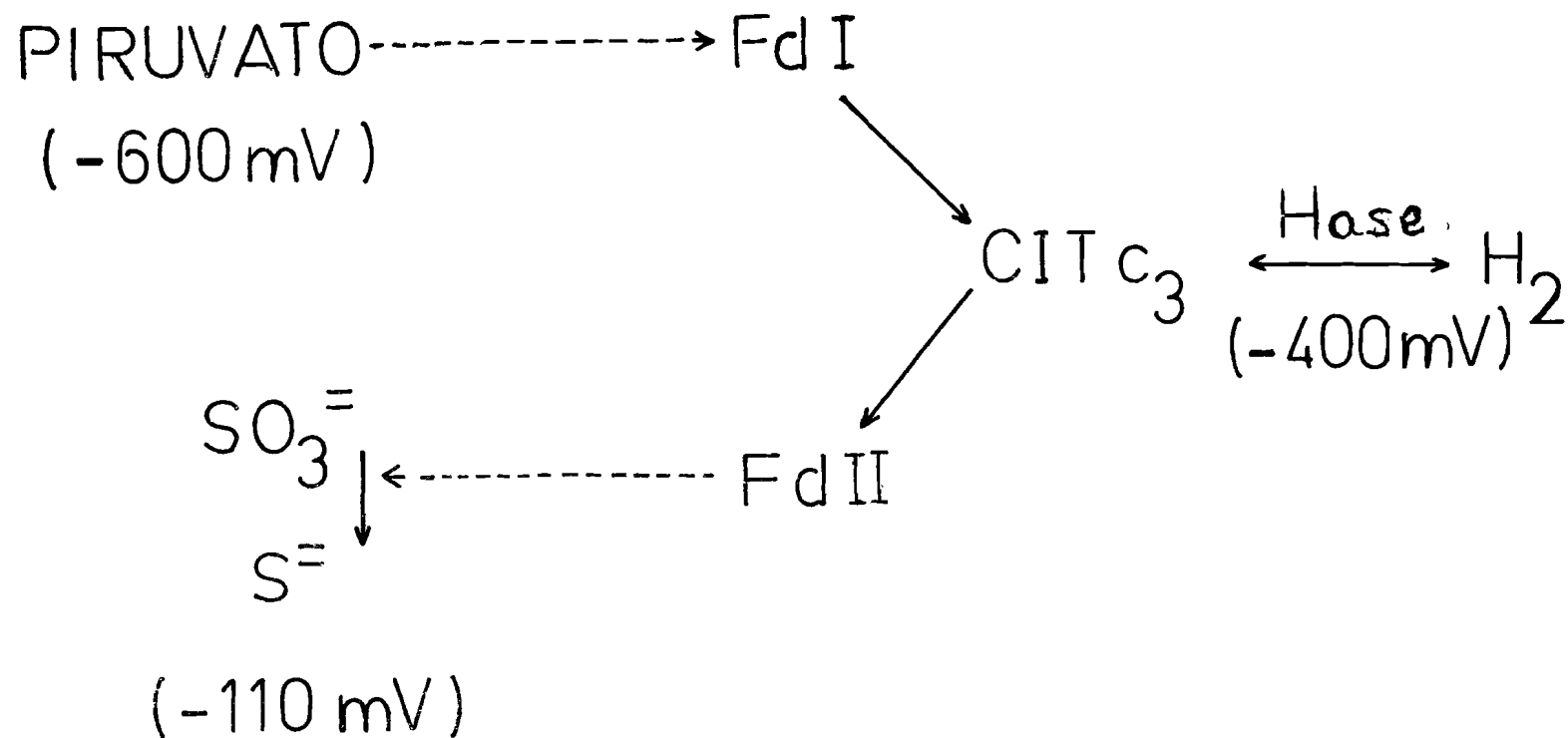


Figura IV.3. Representação esquemática de dois percursos metabólicos importantes no transporte electrónico das espécies Desulfovibrio , a reacção fosforoclástica e o sistema de redução do sulfito.

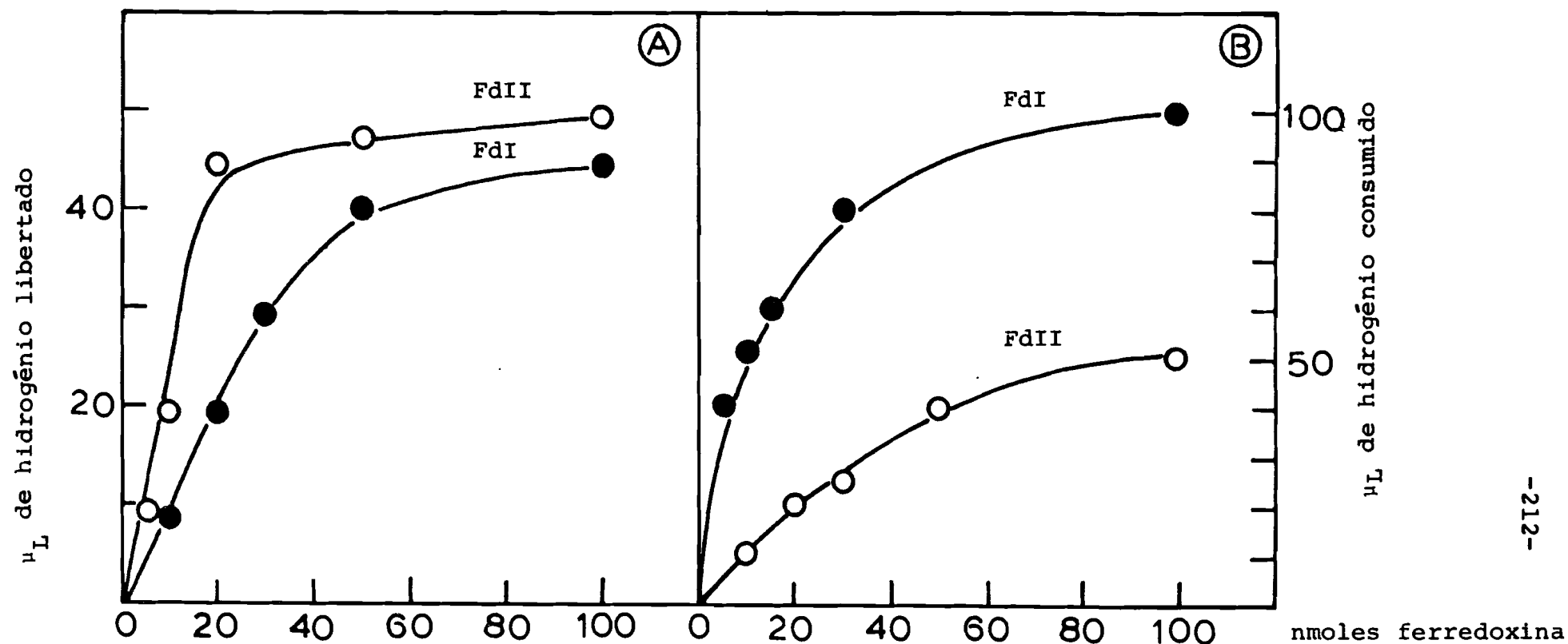


Figura IV.4. Estimulação pela Ferredoxina de *D. gigas* do transporte electrónico em dois percursos metabólicos relevantes : A dependência da actividade sulfito reductase da concentração de Fd I e II. Os valores de consumo de hidrogênio representam a actividade medida ao fim de 12 min. (15); B Dependência da actividade piruvato desidrogenase da concentração de Fd I e II. Os valores determinados para a produção de hidrogênio representam a actividade medida durante 12 min. (entre 8-20 min. para a FdI e entre 28-40 min. para a FdII devido à existência dum período inicial no qual a FdII não é activa (19). Os valores foram corrigidos tendo em conta a actividade endogénica.

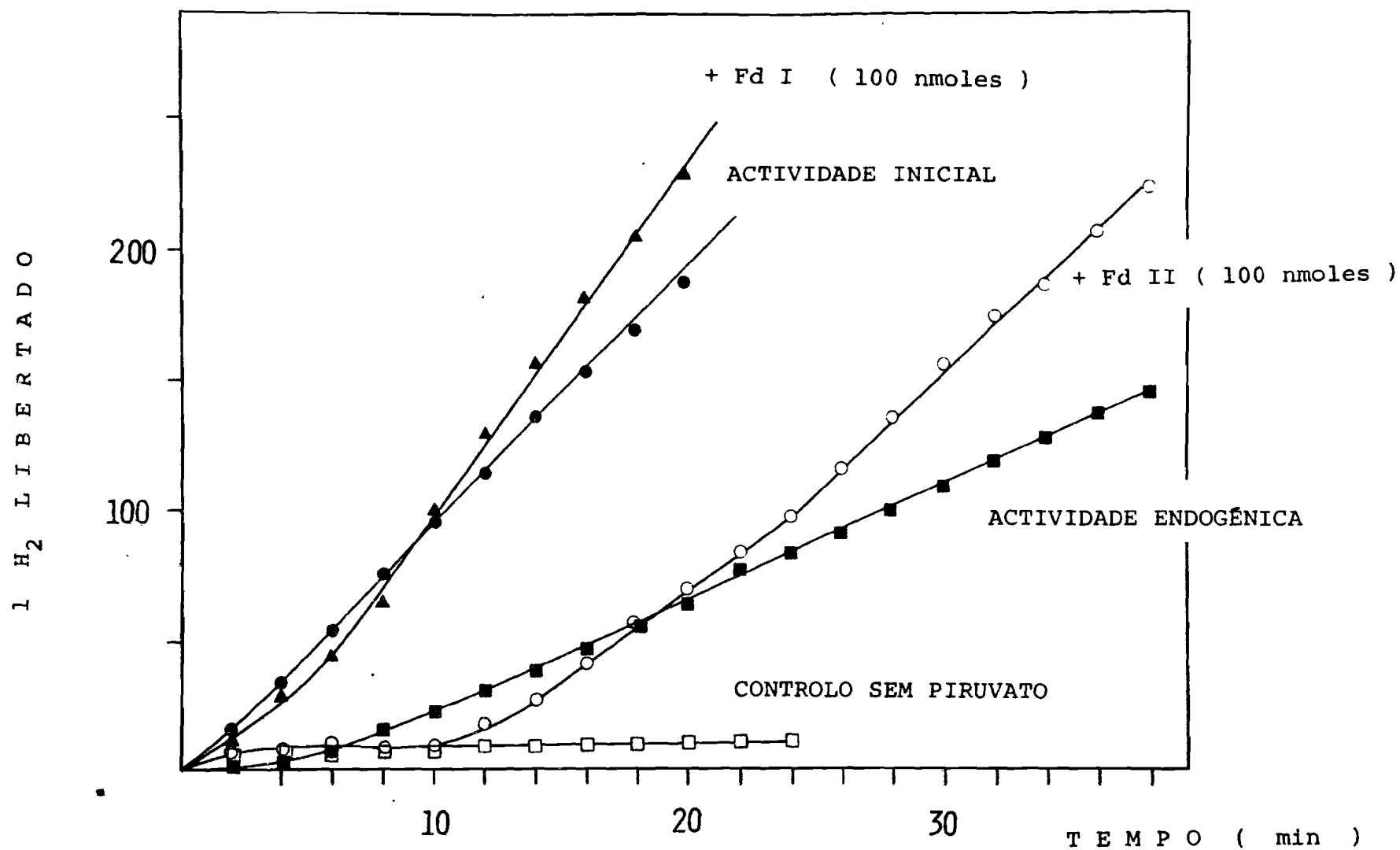


Figura IV.5. Participação da Feredoxina I e II de D.gigas no reacção fosforoclástica.

centro foi posto primeiramente em evidência numa ferredoxina da Azotobacter vinelandii (20). Estudos de difracção de Raios-X feitos por Stout (21) nesta proteína apoiam os resultados obtidos por espectroscopia de Mössbauer (20). No entanto, para analisar os espectros de Mössbauer nesta proteína foi necessário realizar processos de análise bastante invulgares uma vez que, além do centro de $3Fe$, existe um centro $[4Fe-4S]$. No caso da ferredoxina II de D. gigas a análise é simplificada, pois esta proteína só contém um tipo de centro.

IV.2 - RESULTADOS

IV.2.1 - ANÁLISE DE FERRO

Realizaram-se análises de ferro, repetidas vezes, em quatro amostras diferentes de ferredoxina II, provenientes de diferentes "batches" de purificação.

A concentração de proteína foi determinada por análise de ácidos aminados. O valor de concentração de proteína determinado, utilizando o valor de ϵ_{415} (15), concorda bem com o da análise de ácidos aminados.

Na Tabela IV.4 apresenta-se o conjunto de valores obtidos para as diversas análises, assim como a média.

Tabela IV.4

	Amostra A	Amostra B	Amostra C	Amostra D
Ferro/ /monômero	2,87	3,11	2,95	2,92
	2,96	3,10	2,93	3,20
	3,13	3,20	2,97	3,00
média	2,99	3,14	2,95	3,04

Podemos considerar estas análises reprodutíveis e, portanto, que a ferredoxina II proveniente de diferentes "batches" contém sempre $3,03 \pm 0,11$ Fe/mon.

IV.2.2 - MEDIDAS DE SUSCEPTIBILIDADE MAGNÉTICA

A contribuição paramagnética para a susceptibilidade molar (χ_M^P) dos estados oxidado e reduzido da ferredoxina II de D.gigas foi determinada pelo método descrito na seção II.10.1, o qual envolve o uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (22). Foram medidas as diferenças entre a posição da ressonância da referência (DTSS) dentro da solução de proteína e do tubo capilar, Δf , e convertidas em susceptibilidades magnéticas usando a relação

$$\chi_M = - \frac{3 \Delta f}{4\pi f c}$$

Na expressão usou-se $\alpha = 0$ pois as medidas foram feitas num selenoide. Considerou-se que a densidade do soluto não era muito diferente da do solvente.

Na Tabela IV.5 apresentam-se os valores obtidos para χ_M na forma oxidada e reduzida. A componente paramagnética da susceptibilidade, χ_M^P é obtida a partir de

$$\chi_M = \chi_M^P + \chi_M^D$$

onde χ_M^D é a componente diamagnética da susceptibilidade magnética. O valor da susceptibilidade diamagnética deve ser determinado a partir do valor da apoproteína. Como não se realizou esta experiência por razões óbvias (destruição do material) tomou-se um valor de $-1 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{mole}$ (23).

Tabela IV.5

	Concentração	Δf (Hz)	χ_M ($\text{cm}^3 / \text{mole}$) (sem correcção)
Oxidada	3,49 mM	11,9	$3,01 \times 10^{-3}$
Reduzida	3,49 mM	45,6	$11,55 \times 10^{-3}$

O valor da susceptibilidade paramagnética molar está relacionado com o momento magnético efectivo pela expressão

$$\mu_{\text{eff}}^2 = \frac{3 kT}{N \beta^2} \chi_M^P$$

onde N , β , k e T são respectivamente o número de Avogadro, magnetão de Bohr, constante de Boltzmann e temperatura absoluta.

O momento magnético efectivo está relacionado com o número quântico de spin S pela relação $\mu_{\text{eff}} = g\sqrt{S(S+1)}$

Na Tabela IV.6 apresenta-se o valor de μ_{eff} para vários valores de S

Tabela IV.6

S	μ_{eff}
1/2	1.73
1	2.83
3/2	3.87
2	4.90
5/2	5.92

Na Tabela IV.7 apresenta-se o valor de μ_{eff} obtido por centro para a FdII.

Tabela IV.7

	χ_M (s/correção)	μ_{eff}	χ_M ($\chi_M^D = -1 \times 10^{-3}$) (c/ correção)	μ_{eff}
Oxidada	3.01	2.68	4.01	3.09
Reduzida	11.55	5.24	13.55	5.47

O valor da correcção diamagnética é mais importante para a forma oxidada do que para a forma reduzida porque aquela tem menor susceptibilidade magnética, o que vai introduzir uma maior variação no valor de μ_{eff} .

Como é sabido a susceptibilidade nas proteínas de ferro-enxofre não segue a lei de Curie (22). O momento magnético aumenta com a temperatura devido à população de outros estados paramagnéticos.

O valor encontrado para a forma oxidada da ferredoxina II é semelhante ao observado para a forma reduzida das ferredoxinas de $[4\text{Fe},4\text{S}]$ (24,25) e parece estar de acordo com um valor de $S=1/2$ para o spin electrónico do centro. Na forma reduzida o valor do momento magnético efectivo parece indicar um valor de $S=2$. De qualquer modo este valor à temperatura ambiente pode não corresponder ao valor de S a baixa temperatura e pensamos realizar futuramente determinações à temperatura do hélio líquido para esclarecer este problema.

IV.2.3 - ESTUDOS DE RPE

A ferredoxina II tal como isolada tem um sinal do tipo "isotrópico" à volta de $g=2$. Um espectro típico é apresentado na Figura IV.6 a 8K.

Fizeram-se estudos extensivos deste sinal numa gama de temperaturas entre 2,7K a 16K. Na figura IV.7 apresenta-se um conjunto de espectros obtidos a diferentes temperaturas. A temperaturas superiores a 12K o espectro começa a alargar e desaparece a estrutura observada a baixa temperatura para $g=2,00$.

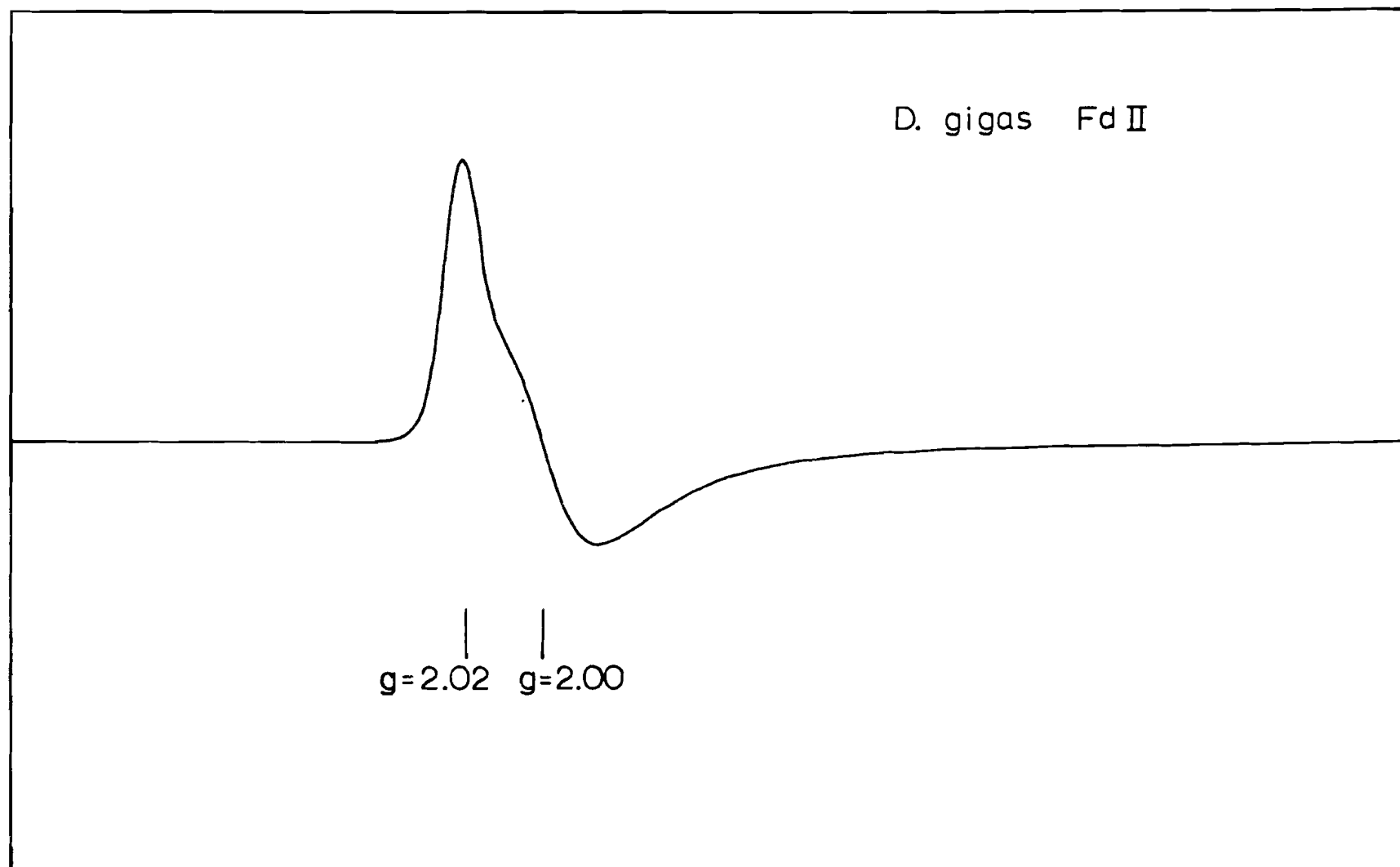


Figura IV.6. Espectro de R.P.E. da Ferredoxina II de D.gigas na forma oxidada (nativa), 0,185 mM (em monômero). O espectro foi traçado nas condições indicadas: potência 30 μ W; frequência 9,218 GHz ; amplitude de modulação 4G ; temperatura 8K e ganho 1.250.

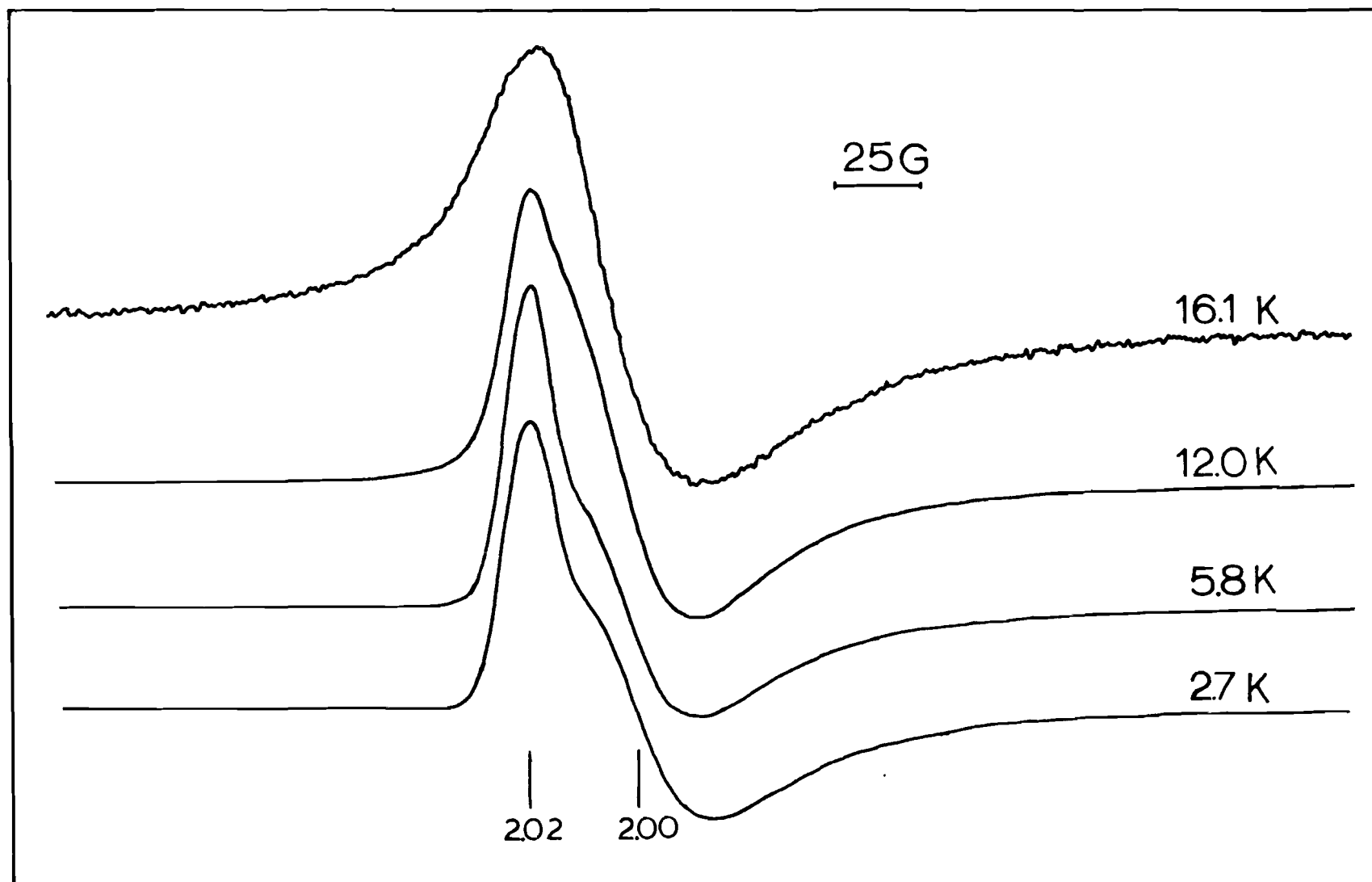


Figura IV.7. Espectro de R.P.E. da Ferredoxina II de D.gigas na forma oxidada. Estudo da dependência da Temperatura. Condições experimentais usadas : potência 30 μ W ; frequência 9,220 GHz ; amplitude de modulação 4G .

Na Figura IV.8 apresenta-se um estudo da dependência do sinal em função da potência da frequência aplicada a 2,7K. Na Figura IV.9 apresenta-se o gráfico do $\log I/\sqrt{P}$ em função da potência.

O sinal satura para potências da ordem dos 10 μW . Na mesma figura compara-se o comportamento da Fd Methanosarcina barkerii (26) e o sinal a $g=2,02$ da FdI.

O comportamento destes sinais com a potência é semelhante. Estes estudos sugerem fortemente que o material é homogêneo, isto é, no espectro de RPE só existe uma espécie presente.

Quantificou-se os espectros da ferredoxina II de D.gigas traçados a 6K, 8K e 12K em relação ao Cu-EDTA.

Na Tabela IV.8 apresenta-se os valores das áreas obtidas por dupla integração numérica dos espectros da Ferredoxina II e Cu EDTA.

TABELA IV.8

	Concentração	Temperatura	Power μW	Ganho	Diâmetro tubo (mm)	Area
<u>CuEDTA</u>	2,08 mM	6K	30	1000	3,65	35486
		8K	30	1250	3,65	34808
		12K	30	1600	3,53	24438
<u>FdII</u>	0,185 mM	6K	30	1000	3,64	2882
		8K	30	1250	3,64	2679
		12K	30	1600	3,64	1974

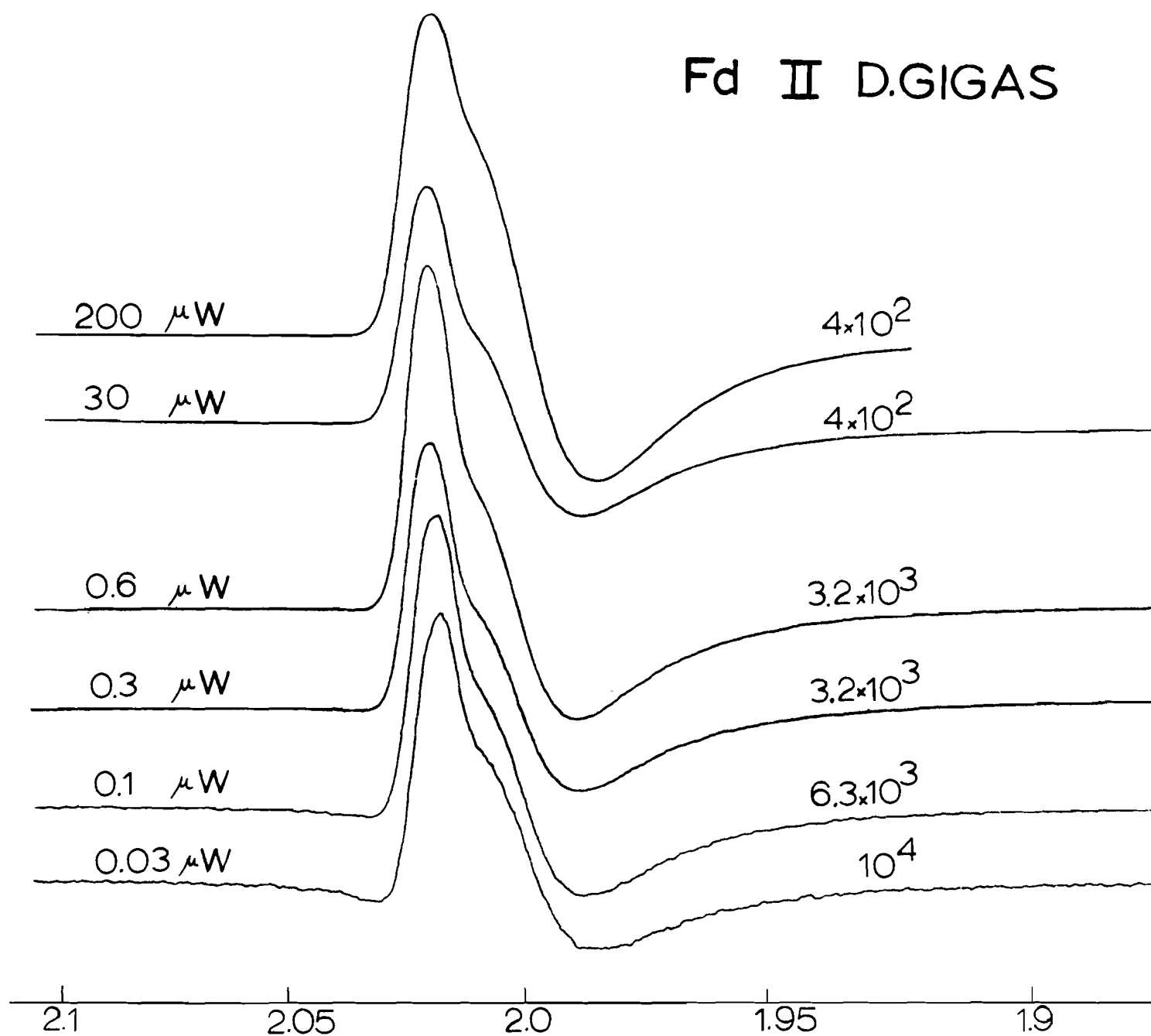


Figura IV.8. Espectros de R.P.E. da Ferredoxina II de D.gigas na forma oxidada a várias potências : frequência 9,220 GHz ; amplitude de modulação 4G ; temperatura 2,7 K.

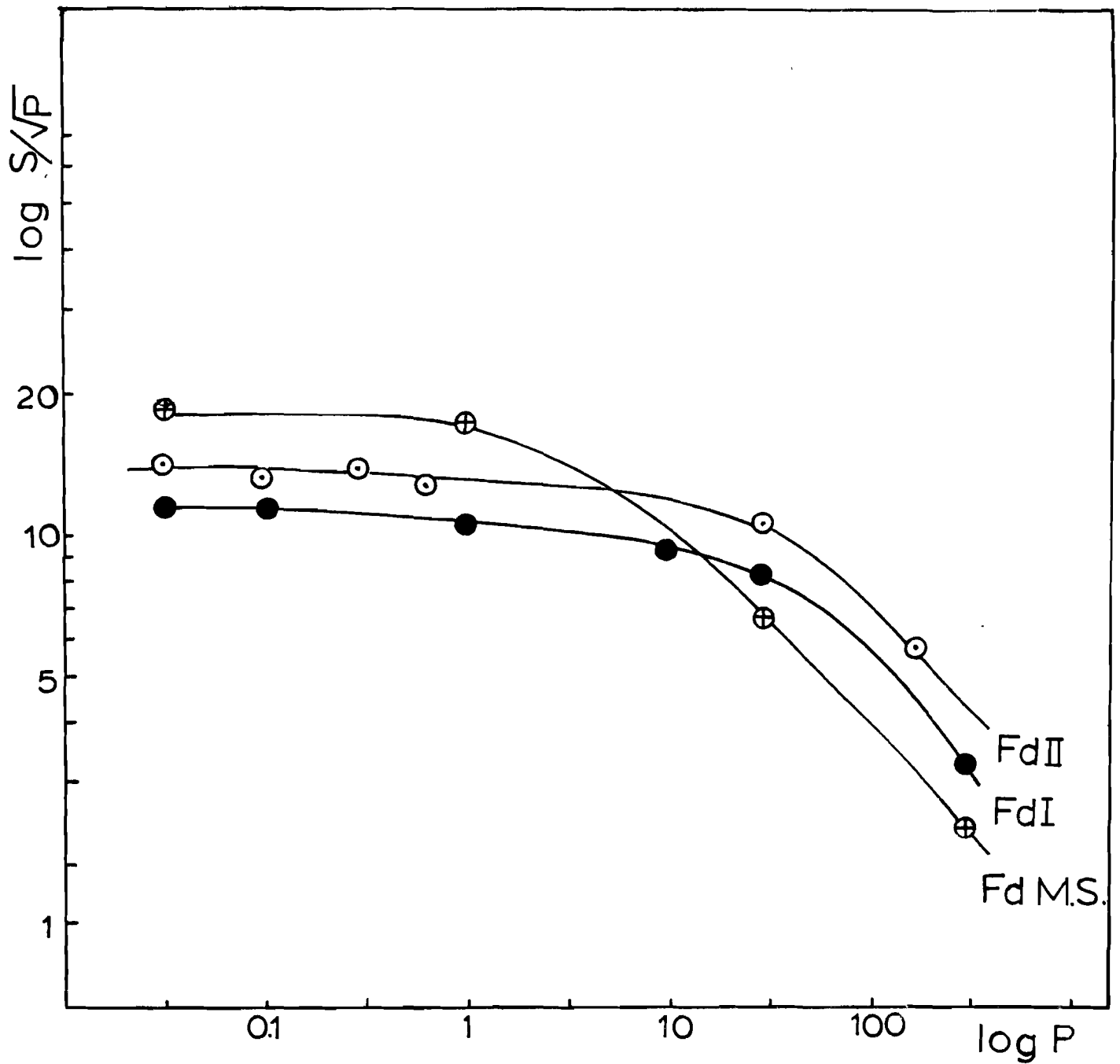


Figura IV.9. Curvas de saturação do sinal de R.P.E. a $g = 2,02$ obtido para a FdI e FdII de D.gigas e para a Fd de Methanobacterium barkeri .

Como os valores de g são diferentes para as duas amostras tem que se usar a correcção de Aasa e Vanngard (27) para a dependência da probabilidade de transição com o valor de g

$$g_{\text{prob}}^{\text{média}} = 2/3 \left\{ (g_x^2 + g_y^2 + g_z^2)/3 \right\}^{1/2} + 1/9 (g_x + g_y + g_z)$$

Tendo em conta os valores de g_i para o CuEDTA e FdII pode calcular-se o valor de $g_{\text{prob}}^{\text{média}}$:

$$\text{CuEDTA} \quad g_{\parallel} = 2,337 \quad g_{\perp} = 2,09 \quad g_{\text{prob}}^{\text{média}} = 2,17$$

$$\text{FdII} \quad g_z = 2,02 \quad g_y = 2,00 \quad g_x = 1,97 \quad g_{\text{prob}}^{\text{média}} = 2,00$$

Com estes dados podemos calcular a concentração de spins na amostra de FdII às várias temperaturas, segundo a expressão:

$$\text{spins /monómero} = \frac{A/A' \times (d/d')^2 \times g_{\text{prob}}^{\text{média}} / g_{\text{prob}}^{\text{média}} \times C_{\text{CuEDTA}}}{C_{\text{monómero}}}$$

em que A e A' são áreas dos sinais, d e d' são os diâmetros dos tubos e $g_{\text{prob}}^{\text{média}}$ e $g_{\text{prob}}^{\text{média}}$ são os valores das probabilidades médias para a FdII e o CuEDTA respectivamente.

Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela IV.9.

TABELA IV.9

Temperatura	nº spin /monómero
6K	0,99
8K	0,95
12K	0,93

Fazendo uma média dos valores encontrados para as várias temperaturas e tendo em conta a análise de ferro podemos dizer que se encontraram $0,95 \pm 0,10$ spin /3Fe. O facto de não se ter obtido exactamente o mesmo número de spin às várias temperaturas deve-se ao facto de ser difícil traçar os espectros da amostra e do CuEDTA exactamente à mesma temperatura.

Tentou-se simular o espectro de RPE da FdII. Conseguiu-se uma boa aproximação do espectro observado usando $g_z = 2,02$, $g_y = 2,02$ e $g_x = 1,97$, com larguras gaussianas de 15,35 e 80 gauss a g_z , g_y e g_x respectivamente. Na Figura IV.10 mostra-se o espectro simulado comparado com o espectro da FdII.

IV.2.4 - ESTUDOS DE MÖSSBAUER

Na Figura IV.11 mostra-se o espectro de Mössbauer da ferredoxina II oxidada a 77K. A linha sólida foi traçada pelo método dos mínimos quadrados supondo que os três ferros produzem o mesmo espectro. A largura das linhas (0,28mm/s) permite tirar esta conclusão. Os valores do desdobramento de quadrupolo $\Delta E_Q = 0,54 \pm 0,03$ mm/s são praticamente os mesmos dos observados para a rubredoxina, sugerindo uma coordenação tetraédrica a átomos de enxofre.

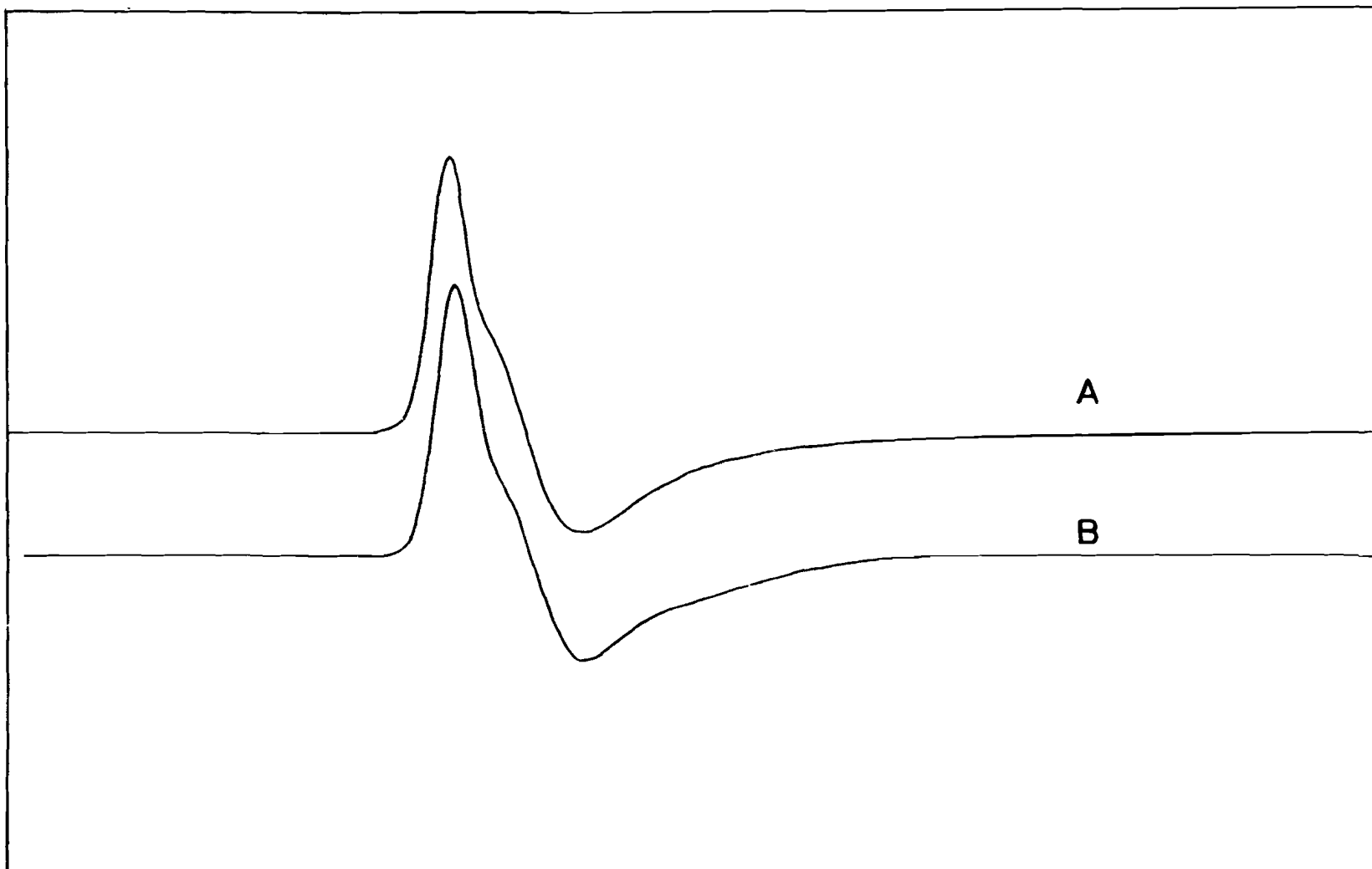


Figura IV.10. Comparação do espectro de R.P.E. da FdII de D.gigas (A) com o espectro simulado (B) usando $g_z = 2,02$; $g_y = 2,00$ e $g_x = 1,97$ com larguras gaussianas de 15 , 35 e 80 G a g_z, g_y e g_x respectivamente.

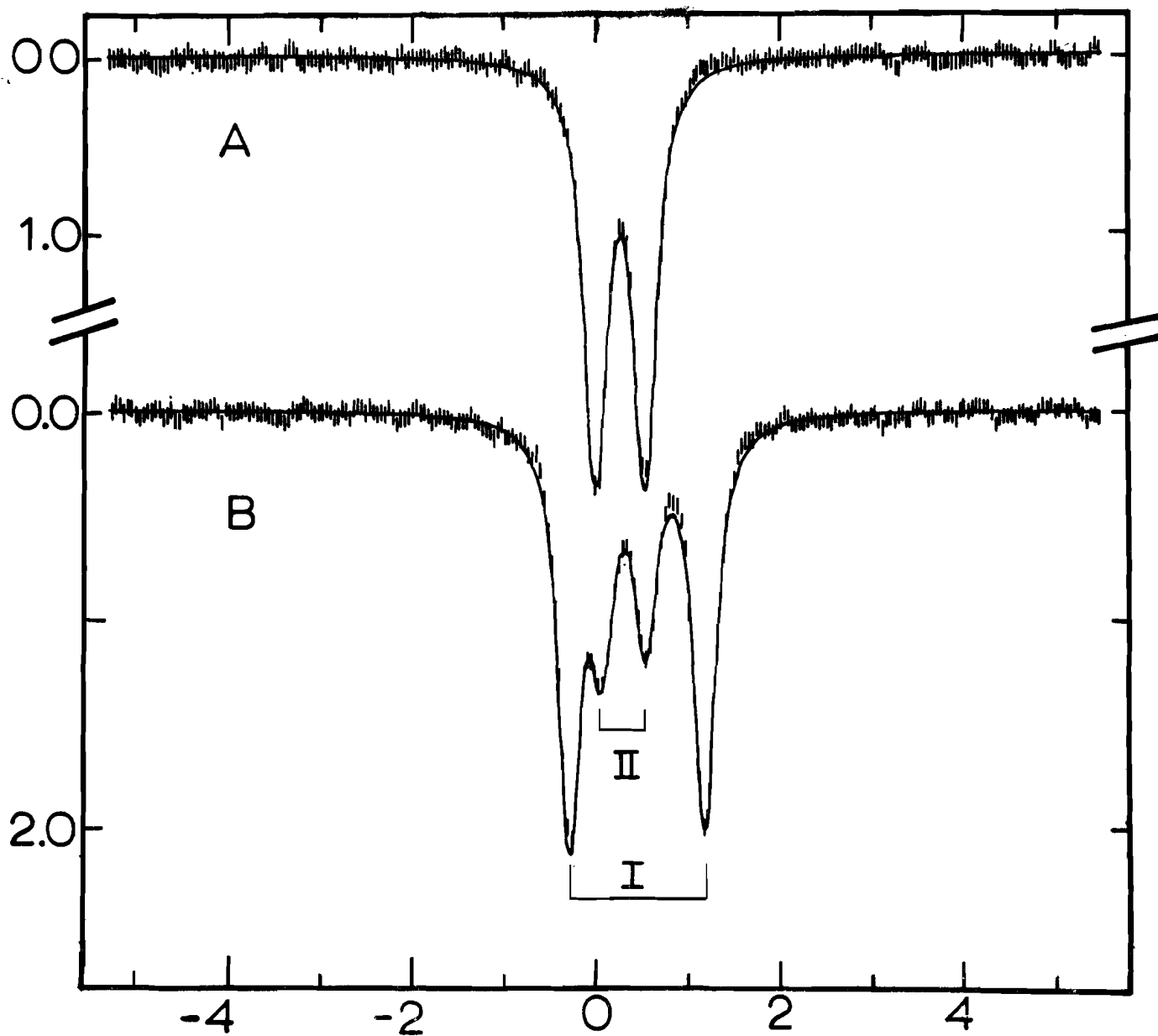


Figura IV.11. Espectros de Mossbauer da FeII de *D.gigas* sem campo aplicado:

A - forma oxidada a 77 K.

B - Forma reduzida a 4,2 K.

A 4,2K observa-se um espectro magnético (ver Figura IV.12) onde se observam três espectros magnéticos distintos, O espectro é muito semelhante ao observado para o centro com $g = 2,01$ da ferredoxina de A.vinelandii (28). Na Figura IV.12 mostra-se uma simulação das três componentes magnéticas e como a soma reproduz o espectro observado.

Na Figura IV.11 apresenta-se o espectro da FdII reduzida a 4,2K, sem campo magnético aplicado. Os dobletes I e II, indicados na Figura IV.11 têm desdobramentos de quadrupolo e desvios isoméricos semelhantes aos encontrados na ferredoxina de A.vinelandii (20). Ambos os dobletes são simétricos e têm linhas de absorção aguçadas. As linhas a cheio na Figura IV.11 são o resultado do método dos mínimos quadrados. A razão das intensidades dos dobletes I e II está na proporção de 2:1. Os parâmetros são $\Delta E_Q = 1,47 \pm 0,03$ mm/s e $\delta = 0,46 \pm 0,02$ mm/s para o doblete I e $\Delta E_Q = 0,47 \pm 0,02$ mm/s e $\delta = 0,30 \pm 0,02$ mm/s para o doblete II.

O ferro associado com o doblete II tem características de ferro de alto spin. Realizaram-se estudos da FdII reduzida a 4,2 K, a vários valores de campo magnético. Na Figura IV.13 mostra-se um espectro a 10 kG.

Uma das propriedades pouco vulgares na FdII reduzida, é que um campo de poucas centenas de gauss produz um alargamento substancial, tanto do dobleto I como do dobleto II, devido a interações magnéticas hiperfinas. Este comportamento invulgar sugere fortemente que os espectros magnéticos dos sítios I e II são controlados pelo mesmo spin electrónico $\vec{S}$.

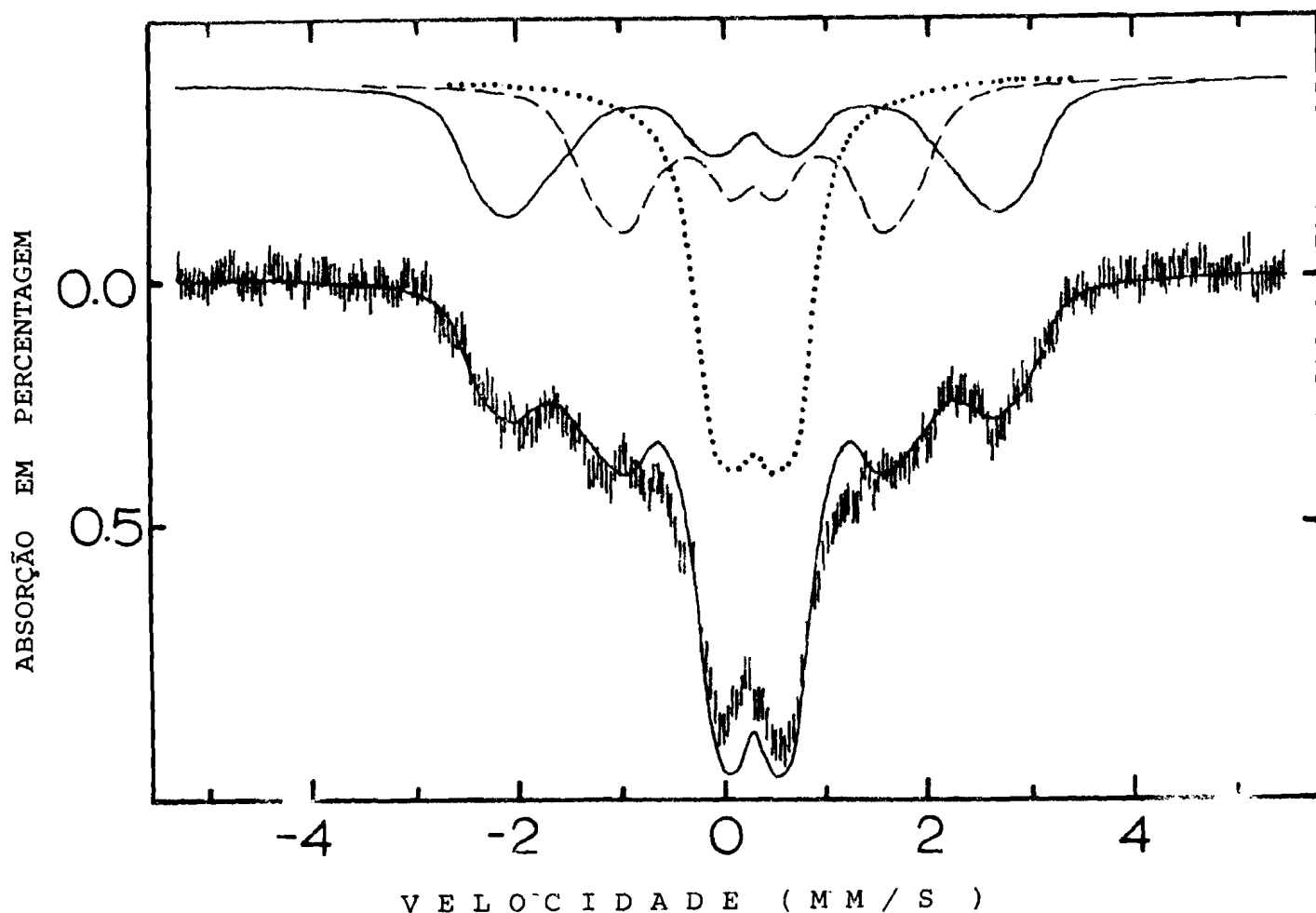


Figura IV.12. Espectros de Mössbauer da Ferredoxina II de D.gigas na forma oxidada a 15 K num campo de 600 G aplicado paralelamente à radiação γ de observação. A linha sólida desenhada sobre o espectro é a sobreposição de três espectros calculados a partir do hamiltoniano de spin. Os valores dos parametros hiperfinos usados são indicados na Tabela IV.10.

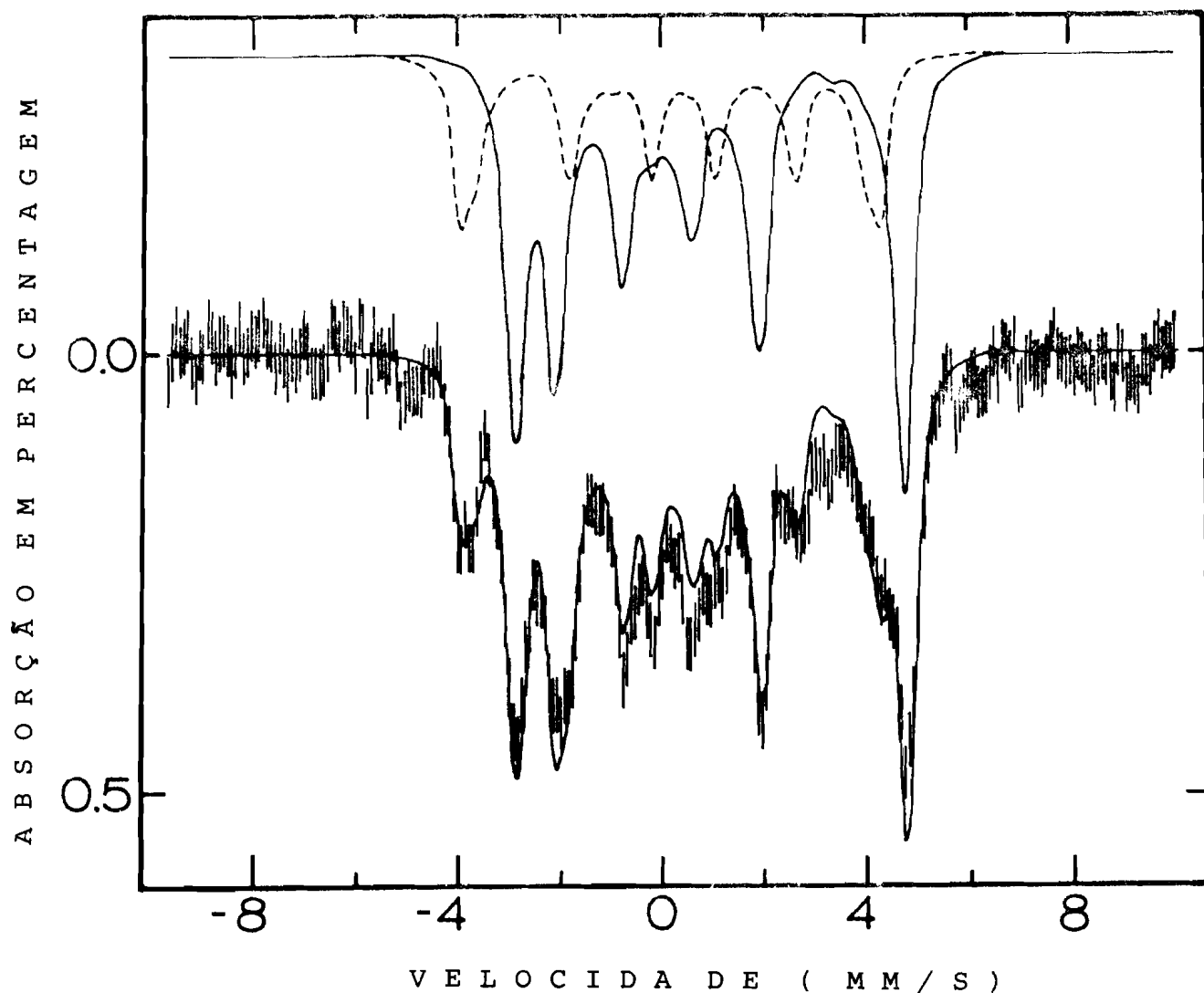


Figura IV.13. Espectro de Mössbauer da Ferredoxina II de D.gigas na forma reduzida a 4,2 K num campo magnético de 10 KG aplicado paralelamente à radiação γ de observação. É mostrada também a curva teórica e a decomposição do espectro em duas subcomponentes com intensidade 2:1. A subcomponente correspondente ao doblete I é traçada com uma linha contínua. Para o doblete II observa-se um campo magnético interno positivo. Os espectros foram calculados para um hamiltoniano de spin com $S=2$, usando os parâmetros da Tabela IV.11.

Os espectros realizados na FdII reduzida permitem-nos tirar as seguintes conclusões:

1. A velocidade de relaxação do spin electrónico a 4.2 K é lenta, comparada com as frequências de precessão nuclear.
2. O spin electrónico S tem que ser um número inteiro (possivelmente S=2) pelas medidas de susceptibilidade magnética.
3. Uma vez que os campos magnéticos hiperfinos saturam para campos aplicados fracos os níveis electrónicos mais baixos são dois estados com uma separação de energia $\Delta = 0.35 \text{ cm}^{-1}$
4. A análise dos resultados revela que os dois ferros do duplete I continuam indistinguíveis em campos aplicados, elevados. O espectro da Figura IV.13 é a sobreposição de dois espectros com uma intensidade de 2:1. Além disso o núcleo de ferro associado com o sítio II está sujeito a um campo magnético interno positivo provando que este núcleo tem de pertencer a uma estrutura de spins acoplados. O sistema electrónico tem um eixo de magnetização fácil e para campos de valor máximo 10 kG o espectro de Mössbauer dos sítios I e II é caracterizado por campos internos de -237 KG e 250 KG respectivamente. Na Figura IV.13 apresenta-se uma simulação; mostra-se também a decomposição do espectro em sub-componentes.

O resultado mais importante é o facto de o comportamento magnético dos ferros ser descrito por um spin electrónico comum, o que sugere, fortemente, um centro com spins acoplados.

IV.3 - DISCUSSÃO

Nesta discussão vamos apresentar primeiramente os factos que nos levam a concluir a presença de um novo tipo de centro, contendo três ferros na ferredoxina II de D.gigas.

As várias amostras de ferredoxina II analisadas contém três átomos de ferro por monômero, sem evidência de existência de impurezas contendo ferro, tanto por RPE (não existe sinal a $g = 4,3$), como por Mössbauer. Os resultados de RPE revelam a presença de um só tipo de centro paramagnético na forma oxidada e a quantificação de spin dá 0,95 spin/3Fe. O espectro magnético de Mössbauer da FdII oxidada a 4,2K mostra a presença de três sítios de ferro distintos o que confirma que eles pertencem ao centro que dá origem ao sinal de RPE.

O valor da susceptibilidade magnética encontrado para a forma oxidada leva a concluir que os três ferros com características de alto-spin ($S=5/2$) têm que estar acoplados para produzir um sistema com $S=1/2$.

Após a redução por um electrão o centro torna-se silencioso por RPE. Os resultados das medidas de susceptibilidade magnética mostram que a FdII reduzida é paramagnética e provavelmente $S=2$. O espectro de Mössbauer mostra duas vizinhanças de ferro distintas numa razão de 2:1. A forma do espectro magnético de Mössbauer e o comportamento com o campo magnético aplicado sugere um spin electrónico comum, ou seja um centro de spin acoplado. O acoplamento de spin é

indicado pela observação de campos magnéticos hiperfinos positivos e negativos (ver Tabela IV.10). Tanto a forma oxidada como a reduzida mostram independentemente a presença de um centro de três ferros.

É interessante o facto de ambos os ferros serem distintos na forma oxidada (há três espectros distintos de Mössbauer a 4,2K). Na forma reduzida dois átomos de ferro (doblete I) são indistinguíveis, mesmo em campos magnéticos elevados (ver Tabela IV.11). O aumento no desdobramento de quadrupolo e no desvio isomérico sugerem que os dois átomos de ferro do doblete I partilham o electrão que entra na estrutura após a redução; ambos os ferros têm aproximadamente um estado de oxidação formal $\text{Fe}^{+2,5}$ (ver Figura IV.14).

As propriedades do centro da ferredoxina II são comparáveis às do novo centro descoberto na ferredoxina de A.vinelandii (20). Neste caso o potencial redox é de -130mV (18).

Estudos de Raios-X realizados na ferredoxina de A.vinelandii uma resolução de 2,5 Å (21) mostram que esta molécula contém dois centros de Fe/S separados por 12 Å mas de forma e tamanho diferentes. O centro maior é um centro $[\text{4Fe},\text{4S}]$ ligado à proteína por cada átomo de ferro. O centro mais pequeno é planar e possui uma estrutura $[\text{3Fe},\text{xS}]$. O modelo deste novo tipo de centro pode ser descrito a partir de um centro $[\text{2Fe},\text{2S}]$ que abriu um dos lados para poder acomodar um átomo de ferro com coordenação tetraédrica distorcida. (21).

TABELA IV.10

Parâmetros hiperfinos usados na simulação do espectro de D.gigas na forma oxidada. Os desvios isoméricos à temperatura de 77 K foram calculados relativamente ao ferro metálico, à temperatura ambiente. O sinal de A para o sítio 3 é extremamente difícil de determinar e deve ser considerado uma tentativa. Usou-se um valor de $\eta=1$ e 0,4mm/s para a largura de linha.

Sítio	1	2	3
$A_x/g_n\beta_n$ (kG)	-197	+211	(+) 26
$A_y/g_n\beta_n$ (kG)	-321	+117	(+) 26
$A_z/g_n\beta_n$ (kG)	-321	+117	(+) 26
ΔE_Q (mm/s)	+0,54	+0,54	+0,54
δ (mm/s)	0,27	0,27	0,27

TABELA IV.11

Parâmetros hiperfinos usados na simulação do espectro da ferredoxina II de D.gigas na forma reduzida.

Os parâmetros do desdobramento do "zero-field" usados foram $D=2,5 \text{ cm}^{-1}$ e $\lambda=0,22$. Esta escolha origina um diagrama de energias com dois níveis de energia separados de $\Delta=0,35 \text{ cm}^{-1}$.

	Sítio I	Sítio II
$\Delta E_Q \text{ (mm/s)}$	1,47	-0,47
η	0,4	-2
$\delta \text{ (mm/s)}$	0,46	0,30
$A_x/gn\beta n \text{ (kG)}$	-160	+70
$A_y/gn\beta n$	-120	+130
$A_z/gn\beta n$	-120	+127
β	20	15

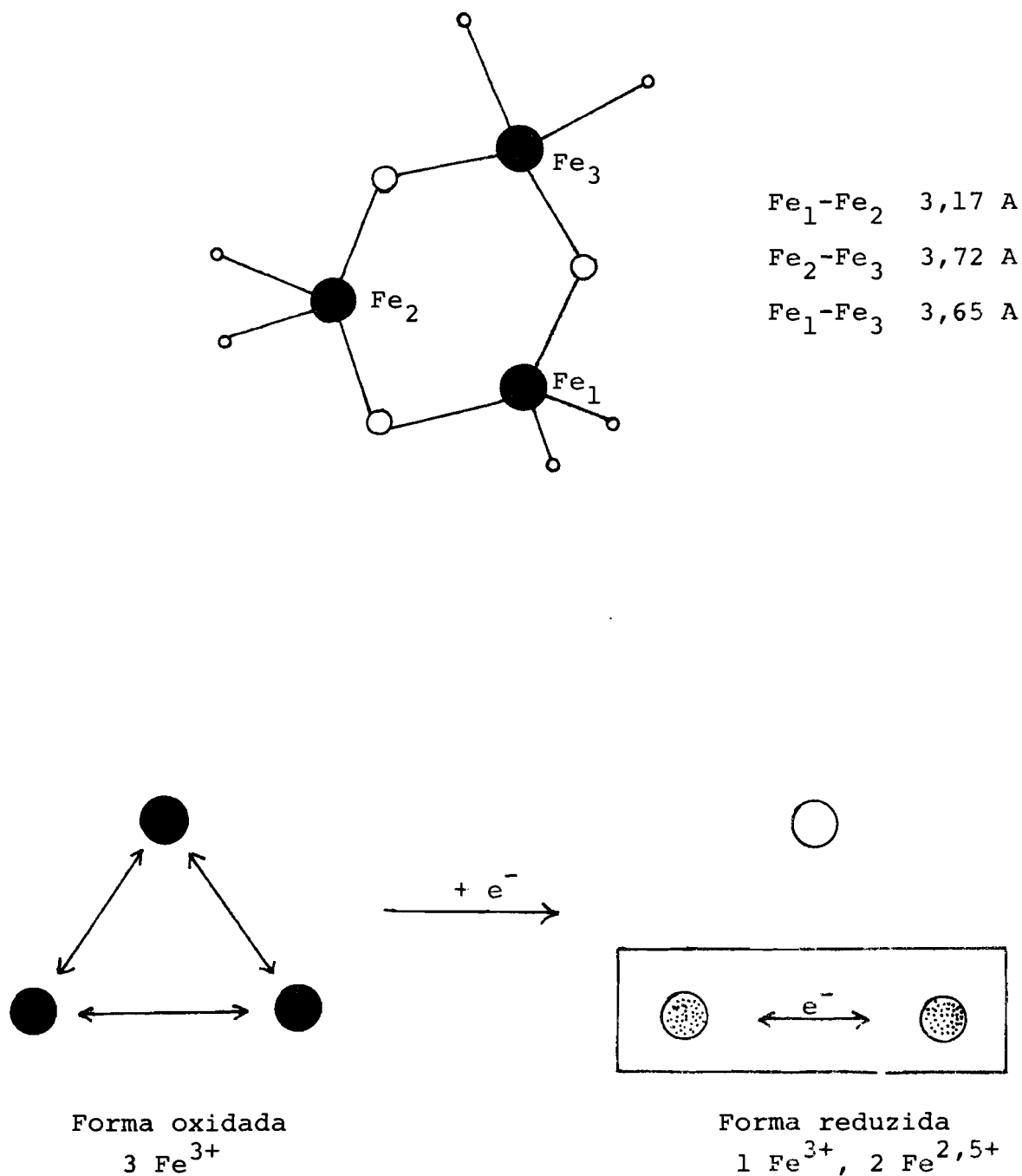


Figura IV.14.

(A) Estrutura do centro $3Fe,xS$ observada por difracção de Raios-X a 2,5 Å de resolução (21) . x é provavelmente igual a 3 pois análises efectuadas na aconitase parecem indicar razões equimoleculares de Fe e S (5) .

(B) Modelo para a redução do centro $3Fe,xS$ em que o electrão adquirido pelo centro reduzido é partilhado por dois átomos de ferro de acordo com os dados obtidos por espectroscopia de Mossbauer.

O novo centro $[3\text{Fe}, x\text{S}]$ com três átomos de ferro ligados covalentemente, parece ser uma estrutura presente em diversos sistemas biológicos, uma vez que pode ser encontrada em proteínas tão diferentes como a aconitase, isolada a partir do coração de boi, e a glutamato sintetase (29). Estas proteínas apresentam um sinal característico de Mössbauer na forma reduzida idêntico ao obtido na Ferredoxina II de D.gigas (ver Figura IV.11).

Uma análise cuidadosa da literatura publicada para proteínas contendo centros ferro-enxofre, permite suspeitar da presença deste novo tipo de centro noutros sistemas. Possíveis candidatos, devido às características do sinal de RPE e outras propriedades gerais, tais como o potencial redox, são: FdI de Mycobacterium flavum (30); Fd de Thermus thermophilus (31); succinato desidrogenase da mitocôndria (32); FdIV de Rhodospirillum rubrum (33); e a hidrogenase de Desulfovibrio gigas (resultados não publicados).

A observação por RPE de um sinal isotrópico associado a um potencial redox não positivo, poderá sugerir a presença deste novo tipo de centro. Contudo, presentemente, só a complementação da sua caracterização por espectroscopia de Mössbauer, em particular na forma reduzida, pode, como vimos, dar prontamente esta resposta.

Como exemplo, apresentamos na Figura IV.15 o espectro de RPE da ferredoxina de Methanosarcina barkerii. O sinal isotrópico é observado na forma nativa e é semelhante ao da FdII de D.gigas. Para testar se este novo tipo de centro existiria também nesta ferredoxina, realizou-se o espectro de Mössbauer na forma reduzida, a 4,2K. O espectro apresenta dois doubletos, de intensidade 2:1, com desdobramentos de quadrupolo e desvios isoméricos semelhantes aos da FdII de D.gigas reduzida.

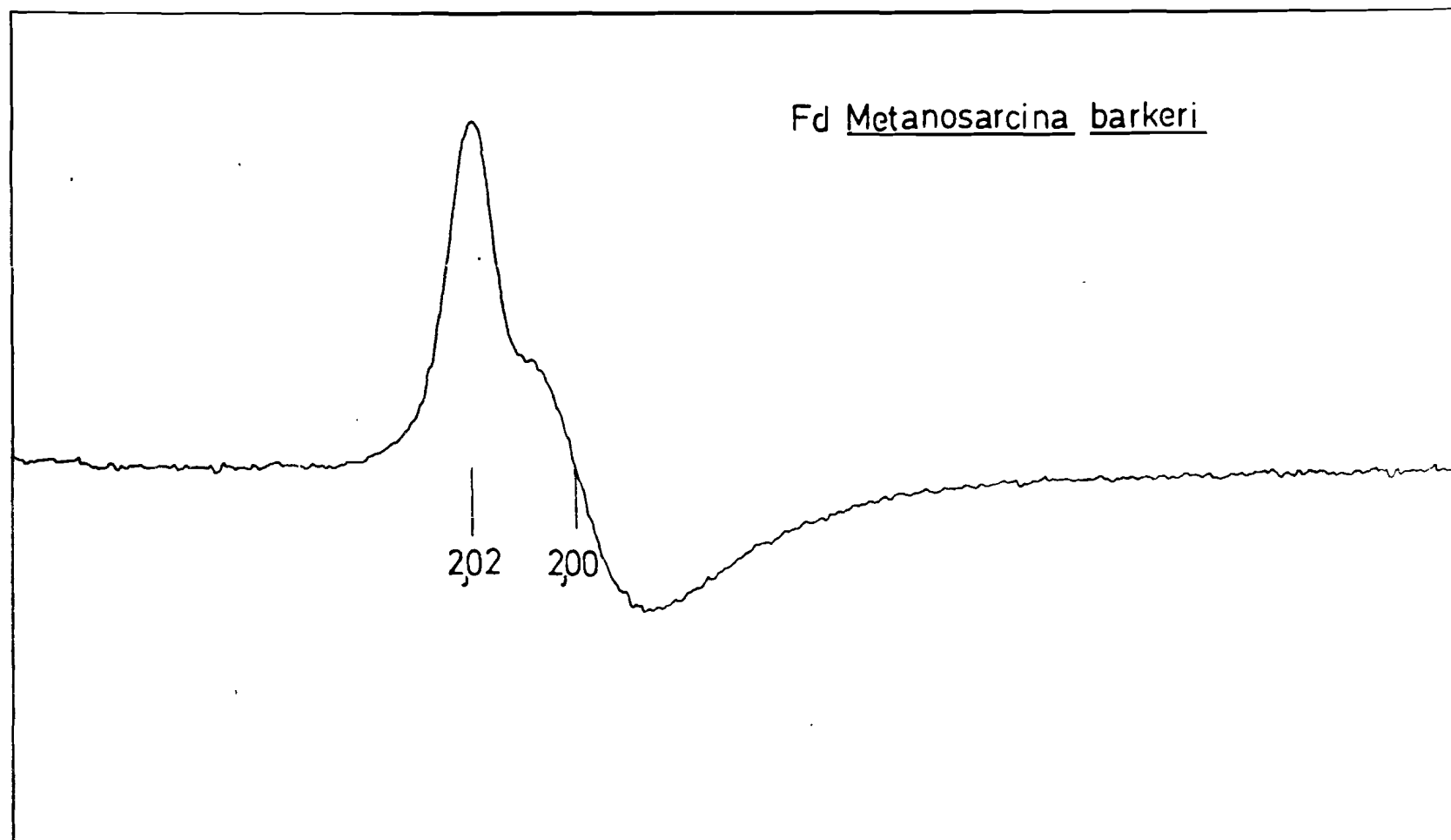


Figura IV.15 - Espectro de RPE da ferredoxina de Methanosarcina barkerii.

Condições experimentais: potência 10 μ W; frequência 9,215 GHz;

amplitude de modulação 4G; temperatura 8 K; ganho $1,25 \times 10^4$

Uma das técnicas utilizadas para identificar centros $[4\text{Fe},4\text{S}]$ tem sido a realização de espectros de RPE na forma reduzida na presença de 80% DMSO. Tanto as proteínas contendo centros $[4\text{Fe},4\text{S}]$ do tipo HiPIP (+3, +2) como as contendo centros $[4\text{Fe},4\text{S}]$ (+2, +1) produzem o mesmo tipo de espectro quando reduzidas na presença de DMSO. Cammack, observou que por redução da HiPIP de Chromatium (13) na presença de 80% DMSO se obtinha um espectro característico dos centros $[4\text{Fe},4\text{S}]$ e cuja quantificação correspondia a 60% do valor esperado.

No caso da FdII de D.gigas, este tratamento produz um sinal deste tipo, mas cuja quantificação só representa 0,04 spin/monômero (18). Este sinal seria portanto correspondente a uma pequena percentagem de centros $[4\text{Fe},4\text{S}]$ existentes na FdII, cuja presença tinha sido detectada na redução da proteína (0,02 spin/monômero) (18).

As técnicas de extrusão, até ao presente momento, parecem não dar um resultado satisfatório. Tanto a aconitase (34) como a ferredoxina de A.vinelandii (20) dão origem a centros $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ quando os processos de extrusão são aplicados. Suspeitamos que os centros de três ferros se podem decompor dando origem a centros de $[2\text{Fe}-2\text{S}]$. Averill et.al. (35) observaram que o espectro de absorção da ferredoxina de A.vinelandii em 80% DMSO e 10 mM em benzenotiol não podia ser simulado como uma soma de centros $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ e $[4\text{Fe}-4\text{S}]$. Além disso, o espectro obtido após extrusão modificava-se lentamente com o tempo. Seria interessante saber em que estágio do processo de extrusão ocorre a decomposição do centro de três ferros. Resultados experimentais sobre esta questão podem elucidar alguns aspectos estruturais deste novo tipo de centro. Se o terceiro átomo de ferro se mantém na proteína, experiências de marcação isotópica seriam interessantes se se conse-

guissem condições reversíveis.

Os dados de Raios-X obtidos sobre a nova estrutura de três ferros na ferredoxina de Azotobacter vinelandii (21) sugerem a possibilidade de um dos ligandos de ferro ser um resíduo carboxílico em vez de uma cisteína (os resultados de Mössbauer não são incompatíveis com esta sugestão)

Se compararmos as sequências da ferredoxina de A.vinelandii ferredoxina II de D.gigas e ferredoxina de Methanosarcina barkerii existe uma região (indicada na Figura IV.16) em que há um resíduo de um ácido aminado acídico na mesma posição, candidato a possível ligando do ferro. Só uma melhor elucidação desta estrutura por Raios-X poderá indicar quais os ligandos deste novo tipo de estrutura.

Na Tabela IV.12 apresenta-se , como resumo, um conjunto de características do novo tipo de centro $[3Fe,xS]$. Consideramos que a ferredoxina II de D.gigas pode ser usada como proteína protótipo contendo este tipo de centro.

Fd	<u>D.gigas</u>	Pro-Ile-Glu-Val-Asn-Asp-Asp-Cis-Met-Ala-Cis-	Glu-Ala-Cis-Val- <u>Glu-Ile-Cis-Pro</u>
Fd	<u>A.vinelandii</u>	Ala-Fen-Val-Val-Tre-Asp-Asn-Cis-Ile-Lis-Cis-Lis-Tir-Tre-Asp-Cis-Val- <u>Glu-Val-Cis-Pro</u>	
Fd	<u>M.sarcina</u> <u>barkerii</u>	(Met Pro) Ala-Tre (Pro) Asn-Ala-Asp-Glu-Cis (Tre) Glu-Cis	Gli ()Cis-Val- <u>Asp-Glu-Cis-Pro</u>

Figura IV.16 - Comparação de parte das sequência de ácidos aminados da ferredoxina de D.gigas ferredoxina de A.vinelandii e ferredoxina de Methanosarcina barkerii.

TABELA IV.12

Características do novo centro 3Fe-xS

(A FdII de D.gigas é considerada o protótipo)

Propriedades	Forma oxidada	Forma reduzida
<u>Espectro de absorção</u>	23,1(305) 15,7(405)	9,6(425 "ombro")
ϵ_{mm} (λ_{max} , nm)	13,3(453 "ombro")	
<u>Dicroísmo circular</u> ^(a)	bandas negativas a 317, 423	
λ , (nm)	bandas positivas a 474, 580	
<u>Espectro de R.P.E</u>	$g=2,02$ próximo de isotrópico $(g_z=2,02, g_y=2,00,$ $g_z=1,97)$	não tem sinal ^(b)
	alargamento para $T > 16$ K saturação a $10 \mu\text{W}$ (2,7 K)	
<u>Espectro de Mössbauer</u>	$0,27 \pm 0,03$	$0,46 \pm 0,02$ (doblete I) ^(c)
(mm/s)	$0,54 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,02$ (doblete II)
E_Q (mm/s)		$1,47 \pm 0,03$ (doblete I)
		$0,47 \pm 0,02$ (doblete II)
		razão dos dobletos $I/II \approx 2,00$
		alargamento caracte- rístico para campos >600 G

(a) Na forma geral o espectro de C.D. da FdII não é semelhante ao dos centros $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ excepto na sua intensidade (18).

(b) Um sinal muito pouco intenso do tipo 1,94 pode ser observado na FdII (menos do que 2%) (18).

(c) Os doubletos I e II estão indicados na Figura IV.

IV.4 - POSSÍVEL INTERCONVERSÃO ENTRE OS CENTROS [3Fe-xS] E [4Fe-4S]

Estudámos recentemente duas novas amostras de ferredoxina II de D.gigas, reconstituída com ^{57}Fe , tanto por RPE como por Mössbauer. Após reconstituição as amostras não apresentam sinal de RPE na forma oxidada e quando reduzidas o sinal é semelhante ao de uma ferredoxina no estado +1 (ver Figura IV.17). Estas amostras, foram estudadas por Mössbauer e confirmaram a análise feita por RPE: a amostra de ferredoxina II reconstituída só contém centros [4Fe-4S], cujas propriedades são semelhantes às do centro [4Fe-4S] da ferredoxina de B.stearothermophilus (36). Na figura IV.18 comparam-se os espectros de Mössbauer da FdII reconstituída na forma reduzida com o espectro simulado usando parâmetros da ferredoxina de B.stearothermophilus (36).

Novos estudos, realizados numa amostra de ferredoxina I, mostram que na forma oxidada esta proteína apresenta em RPE um sinal isotrópico que corresponde a 30% do ferro total (Figura IV.19); verificámos que a percentagem de sinal isotrópico presente nas amostras de FdI parece variar de 10 a 30%). Após redução, apresenta um intenso sinal de RPE com valores de g a $g_z=2,07$, $g_y=1,94$ e $g_x=1,92$.

A intensidade do sinal na forma reduzida corresponde à intensidade que faltava na forma oxidada, A 4,2 K, esta forma tem um espectro magnético de Mössbauer praticamente sobreponível ao espectro de Mössbauer obtido para a FdII reconstituída na forma reduzida (Figura IV.18). Após oxidação, o sinal a $g=1,94$ desaparece e o espectro de Mössbauer modifica-se numa "pattern" de quadrupolo. Estudos a campo alto mostram que

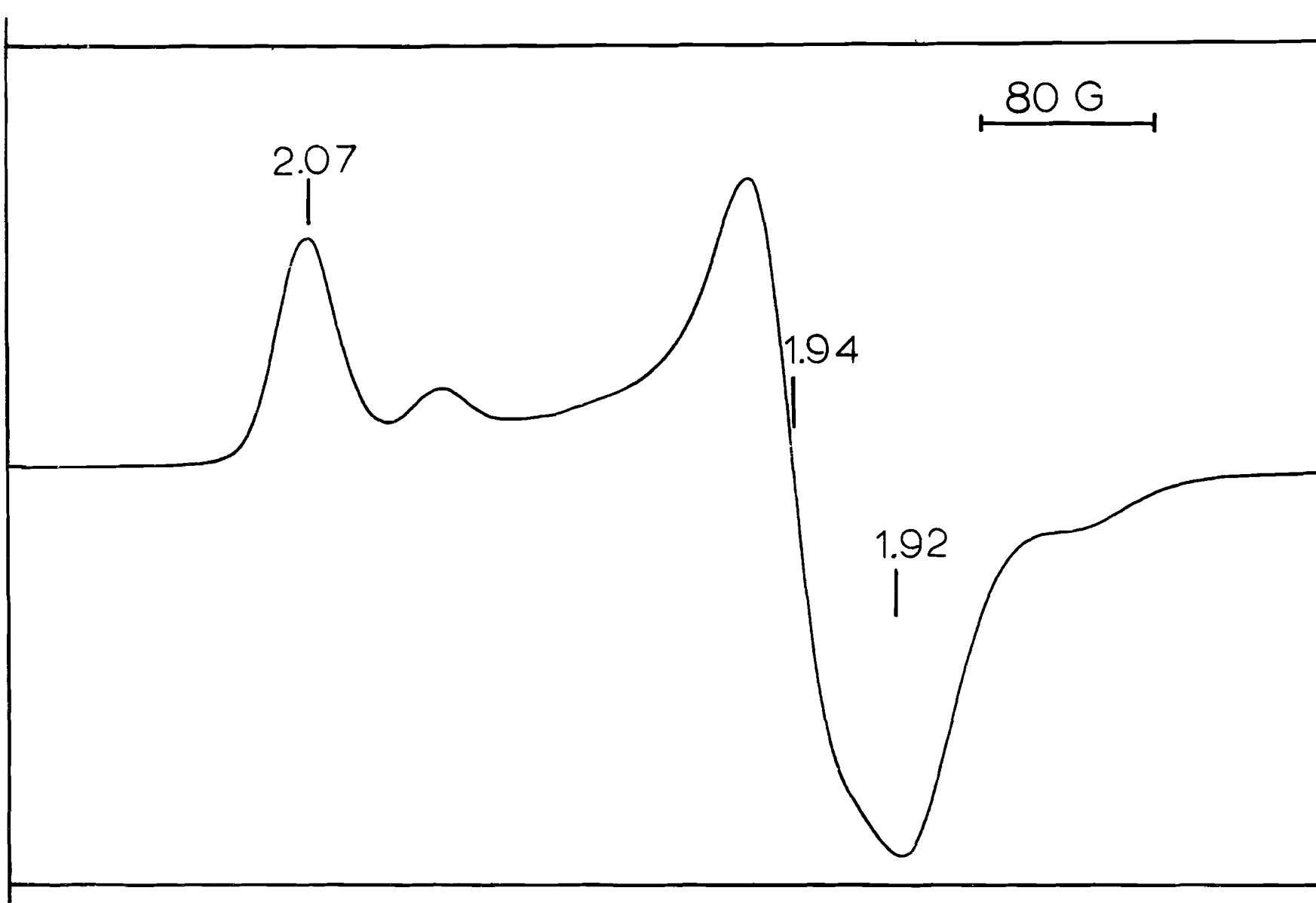


Figura IV.17. Espectro de R.P.E. da Ferredoxina II de D.gigas reconstituída com ^{57}Fe , na forma reduzida. O espectro foi obtido nas seguintes condições: potência 2 mW ; frequência 9,223 GHz ; amplitude de modulação 10 G ; temperatura 18 K e ganho 1.000.

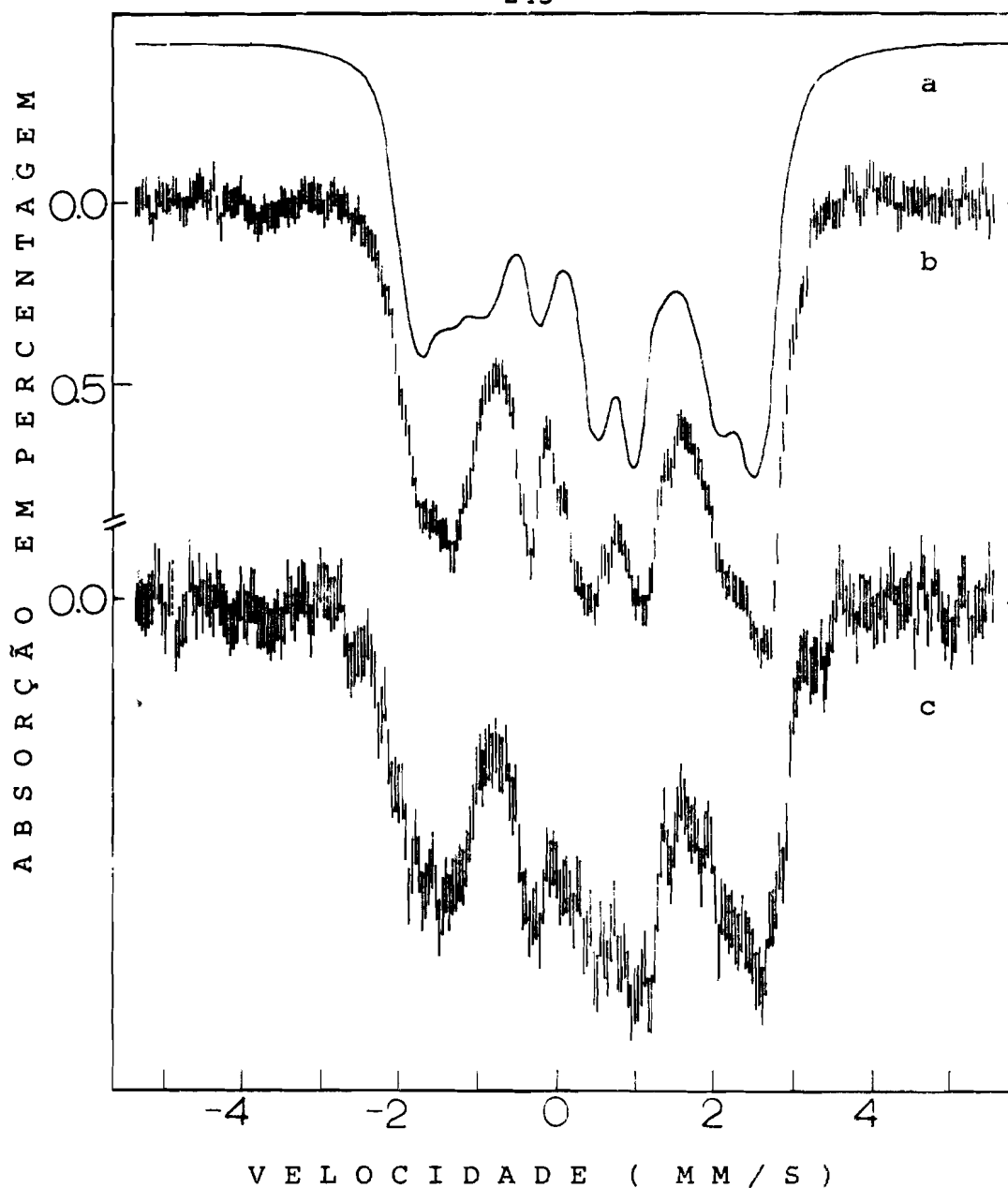


Figura IV.18.

(A) Espectro de Mossbauer simulado usando os parametros obtidos para a Ferredoxina de B.stearothermophilus na forma reduzida obtido a 4,2 K num campo magnético de 600 G aplicado paralelamente à radiação γ de observação (36) .Os valores de ΔE_Q e δ usados foram os determinados para a Ferredoxina II de D.gigas reconstituída ,na forma reduzida.

(B) Espectro de Mossbauer da Ferredoxina II de D.gigas reconstituída ,na forma reduzida, a 4,2 K num campo magnético de 600 G aplicado paralelamente à radiação γ de observação.

(C) Espectro de Mossbauer da Ferredoxina I de D.gigas na forma reduzida (amostra não enriquecida em ^{57}Fe) após ter sido subtraído 30% do sinal correspondente ao centro $3\text{Fe}, xS$.Condições idênticas ao do espectro (B) .

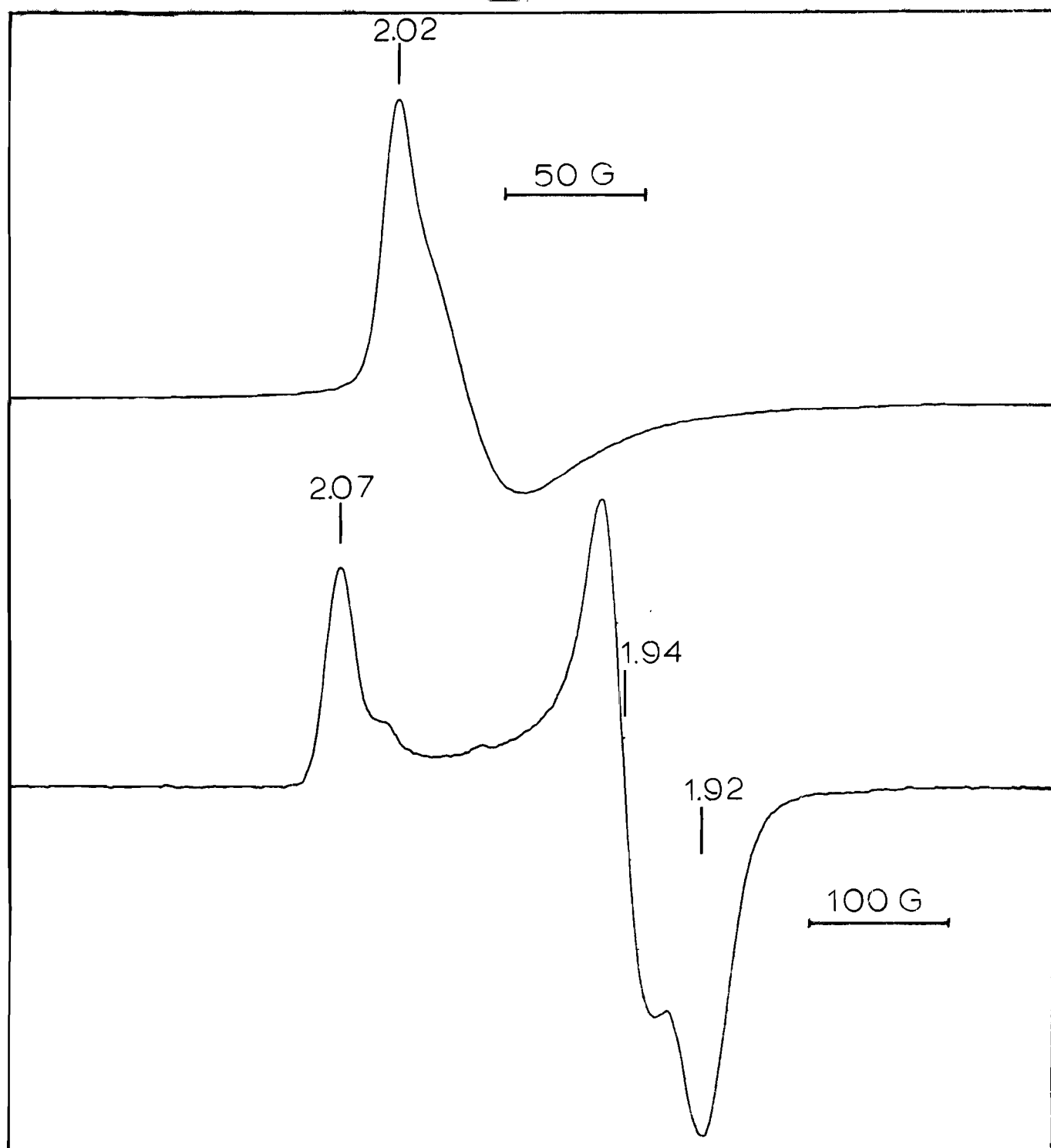


Figura IV.19 - Espectro de RPE da ferredoxina I (A) forma oxidada (B) forma reduzida. Condições experimentais: potencia 10 W; frequência 9,220 GHz; amplitude de modulação 4G; temperatura 8 K e ganho 4 000 (A) e 8 000 (B).

esta "pattern" provém de átomos de ferro em sítios diamagnéticos confirmando a presença de centros $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ como a espécie mais importante na FdI.

Os resultados obtidos com as formas oligoméricas da ferredoxina de D.gigas e o material reconstituído, levam-nos a concluir que a mesma cadeia polipeptídica pode acomodar centros $[3\text{Fe},\text{xS}]$ ou centros $[4\text{Fe}-4\text{S}]$. A FdII representa uma preparação muito pura e homogênea, sendo um exemplo duma proteína que só contém centros do tipo $[3\text{Fe}-\text{xS}]$. A FdI é isolada numa forma que contém centros $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ e um pequeno número de centros $[3\text{Fe}-\text{xS}]$. Esta situação é diferente da ferredoxina de A.vinelandii, em que cada molécula da estrutura nova está associada com centros $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ do tipo HiPIP.

A FdII e FdI de D.gigas intervêm em dois passos metabólicos importantes deste organismo redutor de sulfato: a reacção fosforoclástica e o sistema sulfito reductase. Os estudos estruturais descritos acima podem ser analisados em relação aos potenciais redox e actividade fisiológica das duas formas oligoméricas:

1) O valor do potencial redox do centro $[3\text{Fe}-\text{xS}]$ é -130 mV. Para a FdI o potencial do centro $[3\text{Fe}-\text{xS}]$ é -50 mV e o do $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ é -455 mV (18).

2) A FdII é mais eficiente no sistema de transporte de electrões da sulfito reductase.

3) A FdI é activa no transporte de electrões na reacção fosforoclástica (19). Nas mesmas condições a FdII não é activa. Contudo, depois de uma fase inicial a FdII também estimula a reacção.

Tomando em conjunto estas considerações, podemos tirar algumas conclusões.

Como o potencial redox da sulfito reductase é cerca de -110 mV e o da piruvato desidrogenase é cerca de -600 mV, é natural que os centros $[3\text{Fe-xS}]$ que têm potenciais redox menos negativos, sejam os mais eficientes na redução do sulfito e que só os centros $[4\text{Fe-4S}]$ que têm potenciais redox suficientemente negativos sejam activos na reacção fosforoclástica. Isto implica que os centros $[3\text{Fe-xS}]$ da FdII se possam converter em $[4\text{Fe-4S}]$. Esta interconversão é apoiada pelo facto de que a FdII só é activa neste sistema depois de uma fase inicial e pelo facto de se obterem centros $[4\text{Fe-4S}]$ após reconstituição da FdII.

O facto de a mesma cadeia polipeptídica poder acomodar estes dois tipos de centros levanta dois problemas: qual é o processo que controla a síntese de um centro de três ou quatro ferros? Haverá interconversão entre as duas estruturas (como sugere a reconstituição e a participação da FdII na reacção fosforoclástica)? Haverá um papel biológico específico para cada tipo de estrutura? Serão as estruturas $[4\text{Fe-4S}]$ mais fáceis de construir? Mas, se é o caso, porque é que as estruturas $[3\text{Fe-xS}]$ são tão estáveis? A resposta a estas perguntas necessita de um estudo bioquímico mais profundo para o qual o sistema metabólico do Desulfovibrio gigas é adequado.

IV.5 - BIBLIOGRAFIA

1. Lovenberg,W. (1973) Iron Sulfur Proteins, Vol. 1 e 2, Academic Press, New York.
2. Orme-Johnson,W.H. (1973) Ann.Rev.Biochem., 42, 159.
3. Parmer,G. (1975) Iron-Sulfur Proteins. Em: The Enzymes, ed.Boyer,P.D., 3.^a edição, 1975, Vol.11, p.1
4. IUB Nomenclature Committee on Iron-Sulphur Proteins, Eur.J.Biochem., 93, 427-430 (1979).
5. Rusicka,F.J. e Beinert,H., J.Biol.Chem., 253, 2514 (1978).
6. Orme-Johnson,W.H. and Sands,R.H. (1973) Probing Iron-Sulfur Proteins with EPR and ENDOR Spectroscopy. Em Iron-Sulfur Proteins, ed. Lovenberg,W. (1973) Vol.2, p.195.
7. Orme-Johnson,W.H. and Holm,R.H. (1978) Meth.Enzymol., 53, 268.
8. Cammack,R. (1975) Biochem.Soc.Trans., 3, 482.
9. Carter,C.W. (1977) X-Ray Analysis of High Potential Iron-Sulfur Proteins and Ferredoxins. Em Iron-Sulfur Proteins, ed. Lovenberg,W. (1977) Vol.3, p.157.
10. Carter, C.W., Kraut,J., Freer,S.T., Alden,R.A., Sieker, L.C., Adman,E.T. and Jensen,L.H. (1972) Proc.Nat.Acad. Sci., USA, 69, 3526.
11. Stombaugh,N.A., Sundquist,J.E., Burris,R.H., and Orme-Johnson,W.H. (1976) Biochemistry, 15, 2633.
12. Antanaitis,B.C., and Moss,T.H. (1975) Biochim.Biophys. Acta, 405, 262.

13. Cammack, R. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 54, 548.
14. Sweeney, W.V., Bearden, A.J., and Rabinowitz, (1974)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 59, 188.
15. Bruschi, M., Hatchikian, E.C., Le Gall, J., Moura, J.J.G.,
e Xavier, A.V. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 449, 275.
16. Travis, J., Newman, J.D., Le Gall, J., Peck, H.D., Jr. (1971)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 452.
17. Bruschi, M. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 91, 623.
18. Cammack, R. x Rao, K.K., Hall, D.O., Moura, J.J.G., Xavier,
A.V., Bruschi, M., Le Gall, J., DeVille, A., e Gayda, J.P.
(1977) *Biochim. Biophys. Acta*, 490, 311.
19. Moura, J.J.G., Xavier, A.V., Hatchikian, E.C., e Le Gall, J.,
(1978) *FEBS Lett.*, 89, 177.
20. Emptage, M., Kent, T.A., Huynh, B.H., Rawlings, J., Orme-
-Johnson, W.H., e Münck, E. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 1793.
21. Stout, C.D., Gosh, D. Pattabhi e Robbins, A. (1980) *J. Biol.*
Chem., 255, 1797.
22. Poe, M. and Philips, W.D. (1972) *Methods in Enzymology*,
vol. 44, p. 304, Academic Press, New York.
23. Emptage, M.H., Xavier, A.V., Wood, J.M., Ambler, R., Alsadii,
B.M., Moore, G.R., Williams, R.J.P., e Bartsch, R., submeti-
do ao *Biochem.* (1980).
24. Poe, M., Philips, W.D., McDonald, C.C. e Orme-Johnson, W.H.,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, 705 (1971).
25. Poe, M., Philips, W.D., McDonald, C.C., e Lovenberg, W.,
Proc. Natl. Acad. Sci., 65, 797 (1970).
26. Nossos resultados não publicados.

27. Aasa,R. e Vanngard,T., J.Magn.Res., 19, 308 (1975).
28. Sweeney,W.V., Rabinowitz,J.C., e Yoch,D.C., J.Biol.Chem.,
250, 7842 (1975).
29. Huynh,B.H. e Münck,E. (comunicação pessoal).
30. Yates,H., Eur.J.Biochem., 85, 291 (1978).
31. Ohnishi,T., Blum,H., Sato,S., Nakazawa,K., Hon-hami,K.,
e Oshima,T., J.Biol.Chem., 255, 345 (1980).
32. Ohnishi,T., Lim,J., Winter,D.B., e King,T.E., J.Biol.Chem.,
251, 2105 (1976).
33. Yoch,D.C., Charithers,R.P., e Arnon,D.I., J.Biol.Chem.,
252, 7453 (1977).
34. Kurtz,D.W., Holm,R.H., Ruzicka,F.J., Beinert,H., Coles,
C.J., Singer,T.P., J.Biol.Chem., 254, 4967 (1979).
35. Averill,B.A., Bale,J.R., Orme-Johnson,W.H., J.Am.Chem.Soc.,
100, 3034 (1978).
36. Middleton,P., Dickson,D.P.E., Johnson,C.E. and Rush,J.D.,
Eur.J.Biochem., 88, 135 (1978).