



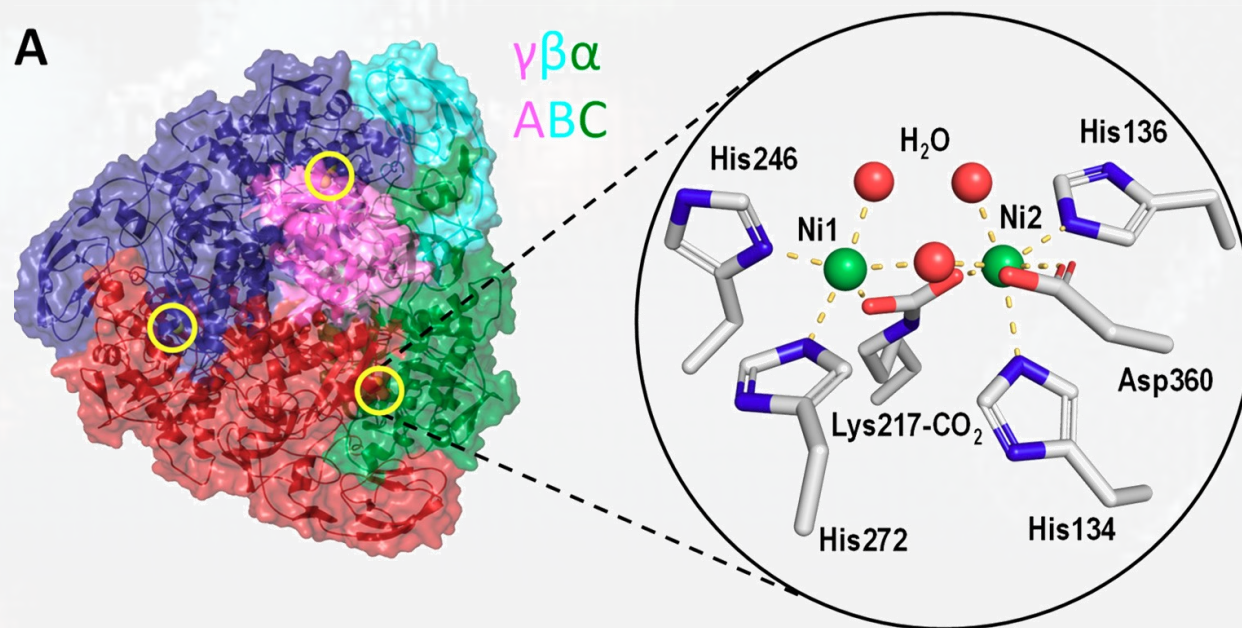
Bioinorgânica do Níquel

Dr. Tiago P. Camargo

A química Bioinorgânica do Níquel

Por muito tempo, o níquel foi o único elemento dos metais de transição (3d) para o qual um papel biológico não pôde ser definitivamente estabelecido

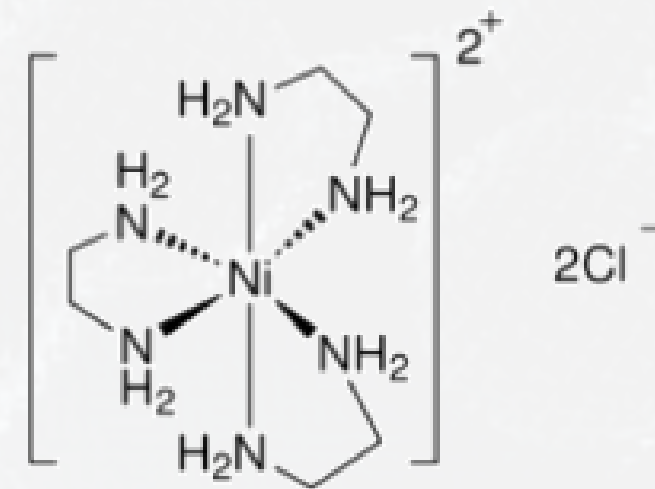
Isso mudou apenas em 1975, quando B. Zerner descobriu que a urease é uma enzima de níquel. O papel do níquel na metanogênese foi descoberto alguns anos depois por acaso, quando o grupo de R. Thauer realizou experimentos de crescimento em bactérias metanogênicas. Isso levou à descoberta de que a coenzima F430 é um porfirinóide de níquel, que algumas hidrogenases são enzimas de níquel e que a monóxido de carbono desidrogenase de metanógenos contém níquel.



A química Bioinorgânica do Níquel

As razões para este “descuido” foram múltiplas: os íons de níquel não exibem uma absorção de luz (cor) muito característica na presença de ligantes fisiologicamente relevantes. Os efeitos Mossbauer não são facilmente acessíveis para isótopos de níquel, e mesmo Ni^I paramagnético (d⁹) ou Ni^{III} (d⁷) nem sempre podem ser detectados de forma inequívoca por espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons (EPR) devido à falta de acoplamento hiperfino de isótopos de metal (a abundância natural de ⁶¹Ni com I = 3/2 é apenas 1,25%).

Átomos de níquel em enzimas permaneceram indetectáveis por um longo tempo devido à sua frequente associação com aglomerados de Fe/S. No entanto, aplicando métodos de detecção mais sensíveis na absorção atômica ou espectroscopia de emissão (AAS), medidas magnética (SQUID) ou espectroscopia EPR usando material enriquecido com ⁶¹Ni, algumas enzimas contendo níquel de plantas e microrganismos foram agora estabelecidas e parcialmente caracterizadas.



A química Bioinorgânica do Níquel

A química bioinorgânica do níquel é única, principalmente em vista das espécies organometálicas que ocorrem em uma série de processos biológicos catalisados por enzimas de níquel. Muitas dessas transformações “organometálicas”, ocorrendo exclusivamente em arqueias e bactérias, envolvem o consumo ou produção de CH_4 (de CO_2), e essa química biológica “C1” tem um grande impacto no ciclo global de carbono.

Table 9.1 Ni-dependent enzymes and their abundance in organisms.

Ni-dependent proteins	Organisms
urease (Section 9.2)	archaea, bacteria, eukaryotes
[NiFe] hydrogenases (Section 9.3)	archaea, bacteria
carbon monoxide dehydrogenase (CODH) (Section 9.4)	archaea, bacteria
acetyl-CoA synthase/decarbonylase (ACS) (Section 9.4)	archaea, bacteria
methyl-coenzyme M reductase (MCR) (including the F_{430} cofactor) (Section 9.5)	archaea
superoxide dismutase (Ni-SOD) (Section 9.6)	bacteria

O desenvolvimento de bactérias produtoras de oxigênio para superar as bactérias produtoras de metano dominantes foi discutido em termos de uma demanda mais baixa de níquel e um fornecimento de níquel vulcânico reduzido há cerca de 2,7 bilhões de anos, como consequência do qual a atmosfera terrestre mudou dramaticamente no período entre 2,5 e 2,3 bilhões de anos atrás.

Urease

As enzimas urease, que podem ser isoladas, por exemplo, de bactérias ou produtos vegetais como o feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), têm uma história interessante. Ao contrário da opinião de R. Willstatter, foram as primeiras enzimas a serem preparadas na forma cristalina pura. No entanto, seu conteúdo de níquel não foi determinado até cerca de 50 anos depois.

A urease “clássica” catalisa a degradação da ureia em dióxido de carbono e amônia.

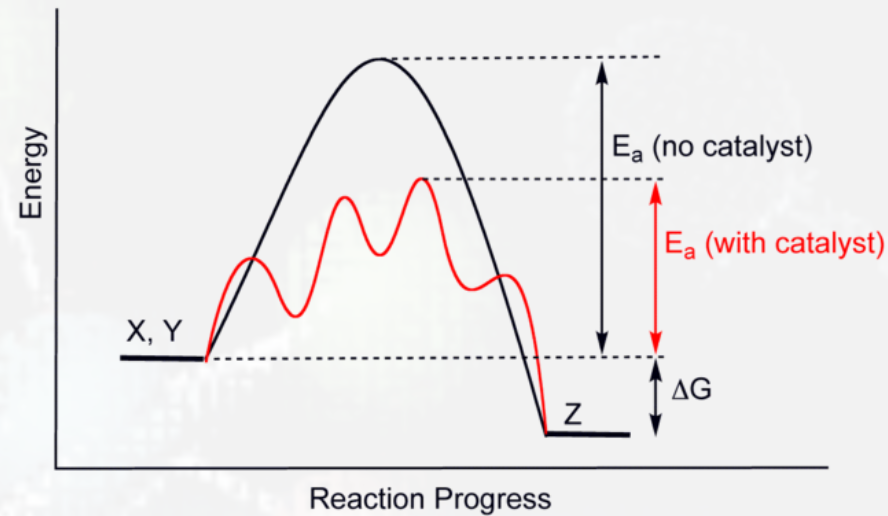


A uréia é uma molécula muito estável, que normalmente se hidrolisa muito lentamente para dar ácido isociânico e amônia, sendo o valor de meia-vida da reação não catalisada de 3,6 anos a 38°C.



Urease

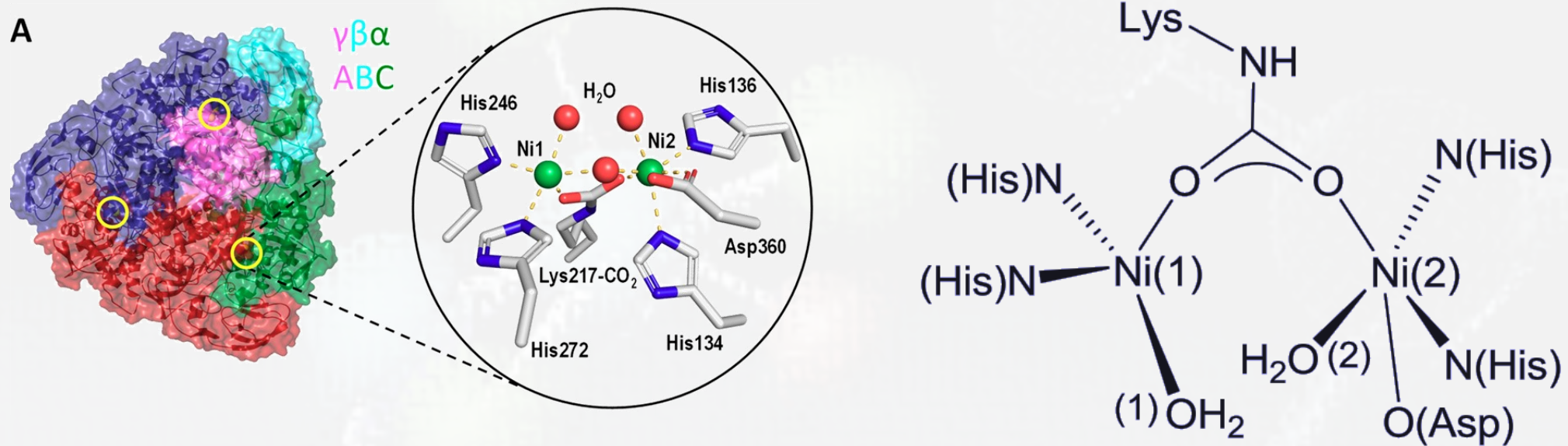
A atividade catalítica da enzima aumenta a taxa de hidrólise completa por um fator de cerca de 10^{14} . Essa aceleração surpreendente só pode ser explicada por uma mudança no mecanismo de reação.



Enquanto a reação não catalisada envolve a eliminação direta de amônia, a enzima presumivelmente catalisa uma reação de hidrólise com carbamato, $\text{H}_2\text{N-COO}^-$, como o primeiro intermediário. Uma ligação metal-substrato facilitaria este último mecanismo de reação.

Urease

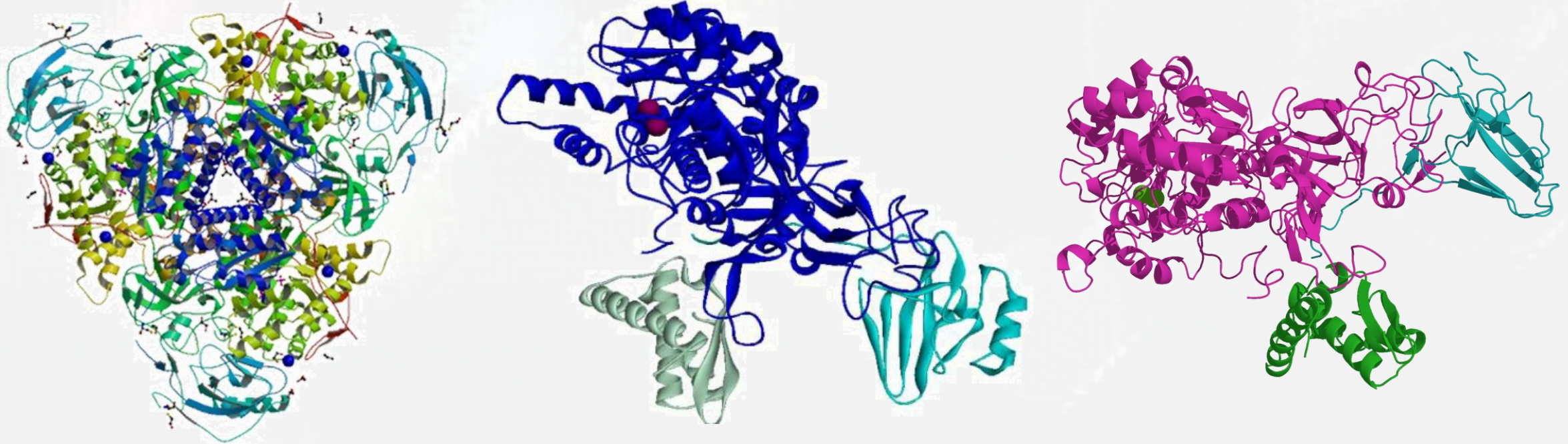
As estruturas cristalinas de três ureases bacterianas, de *Klebsiella aerogenes*, *Bacillus pasteurii* e *Helicobacter pylori*, indicam a conservação das principais características estruturais do centro de reação, em que dois átomos de Ni^{II} são separados por 3,5 Å e ligados por um resíduo de lisina carbamilada.



Um átomo de Ni^{II} é pentacoordenad (N₂O₃), enquanto o outro é descrito como “pseudotetraédrico” (N₂O₂), com um ligante fracamente ligado.

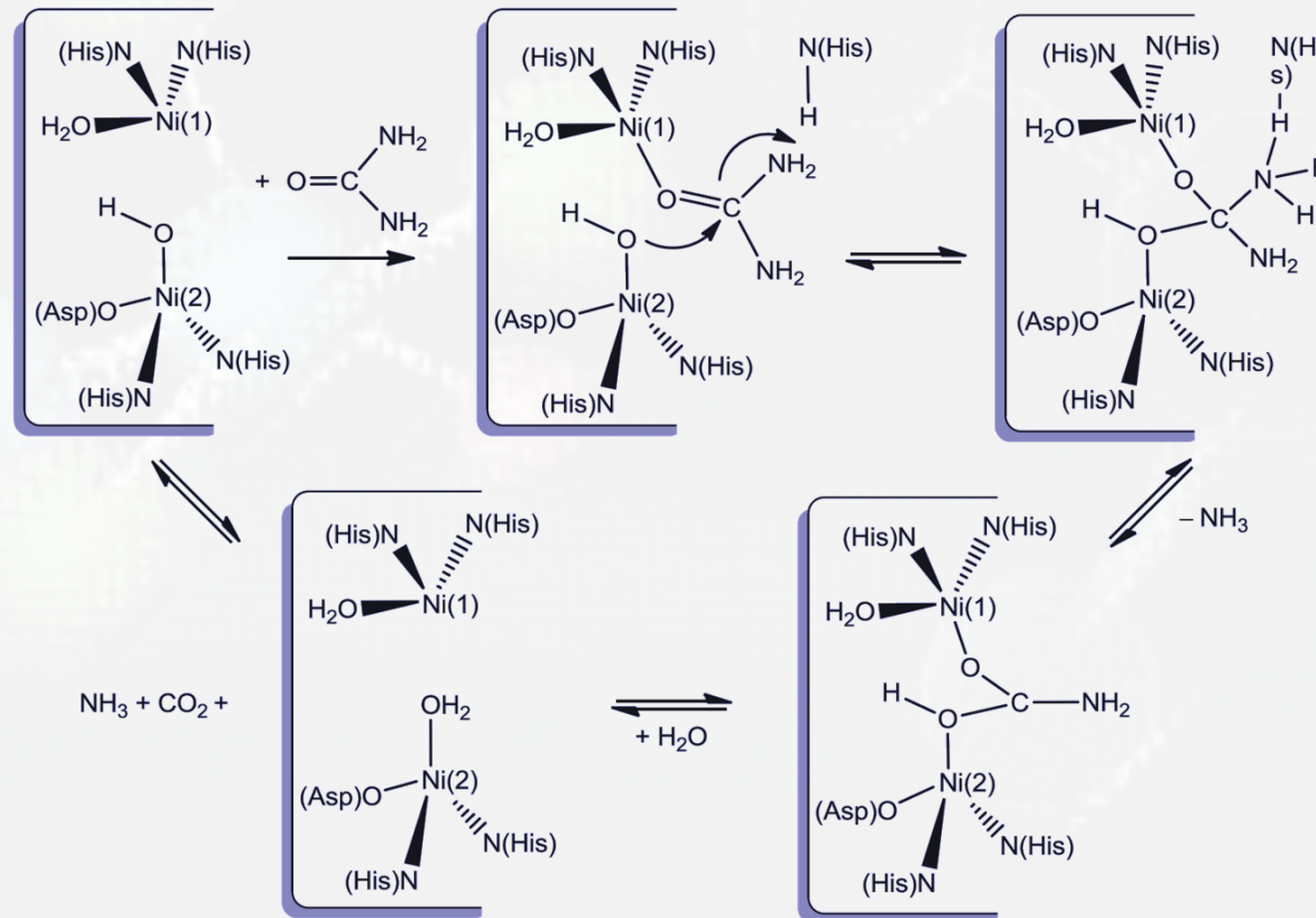
Urease

A holoenzima da urease do feijão consiste em seis subunidades equivalentes (91 kDa); cada um contém dois sítios bimetálicos. As medidas de EXAFS, bem como os estudos magnéticos e espectroscópicos de absorção estão de acordo com os resultados da estrutura cristalina. A análise magnética aponta para um equilíbrio entre as formas de spin alto ($S = 1$) e spin baixo ($S = 0$), o que é típico para Ni^{II} penta ou hexacoordenado distorcido devido a pequenas e variáveis diferenças de energia entre d_{z^2} e Orbitais $d_{x^2 - y^2}$.



Urease

O mecanismo proposto de acordo com os estudos de modelos e dados experimentais mencionados anteriormente. Envolve um ataque eletrofílico de um dos centros de níquel no átomo de oxigênio carbonil e um ataque nucleofílico de uma espécie hidroxila de níquel no carbono carbonílico.

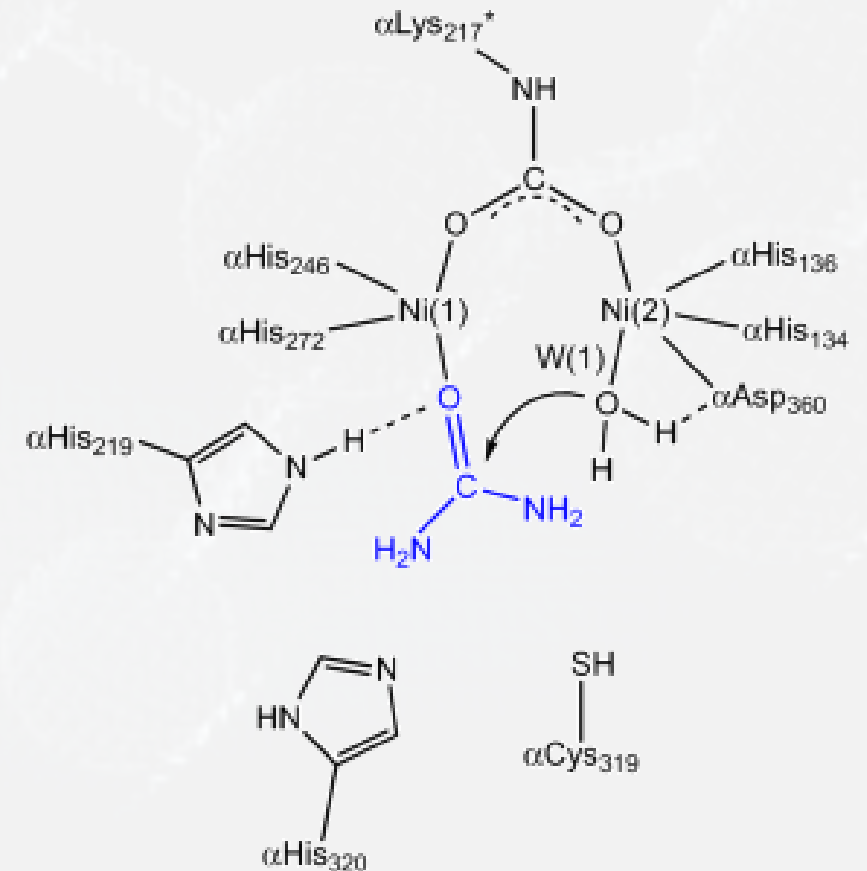


Urease

O mecanismo proposto de acordo com os estudos de modelos e dados experimentais mencionados anteriormente. Envolve um ataque eletrofílico de um dos centros de níquel no átomo de oxigênio carbonil e um ataque nucleofílico de uma espécie hidroxila de níquel no carbono carbonílico.

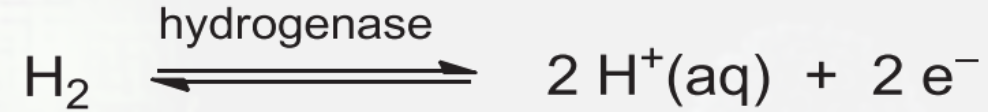
Existem hipóteses mecanísticas semelhantes para a função de enzimas hidrolíticas contendo zinco, onde os prótons freqüentemente agem como espécies eletrofílicas.

Na década de 1980, descobriu-se que a bactéria Gram-negativa *Helicobacter pylori* é amplamente responsável por úlceras gástricas e câncer de estômago. O Prêmio Nobel de Medicina foi concedido em 2005 a B. J. Marshall e J. R. Warren por suas contribuições para esta descoberta. Provavelmente mais de 50% da população mundial abriga *H. pylori* no trato gastrointestinal superior, e a bactéria deve sua capacidade de sobreviver às condições adversas (pH~1) a uma alta concentração da urease. Isso permite que a bactéria produza grandes quantidades de amônia (NH₃) a partir da ureia, que amortece a forte acidez



Hidrogenases

Hidrogenases (“H₂ases”) são enzimas que catalisam a oxidação reversível de dois elétrons (9.5) do hidrogênio molecular.



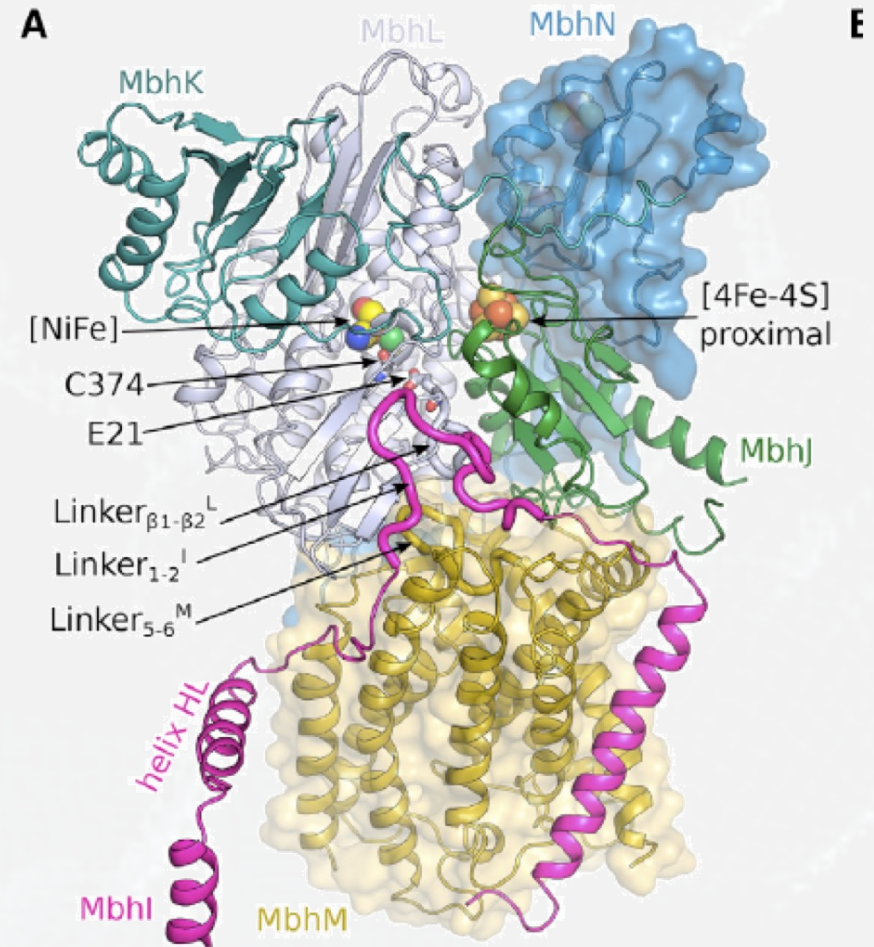
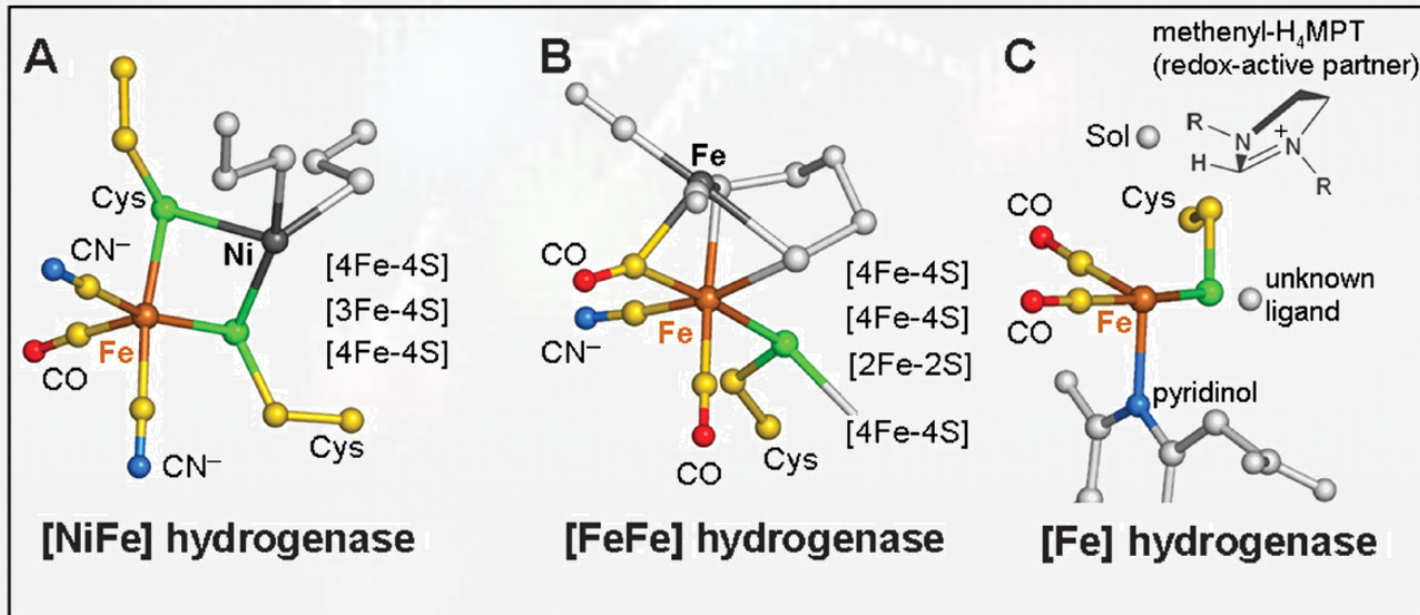
Essa reação desempenha um papel importante no curso da “fixação” de N₂, na fosforilação microbiana e na fermentação de substâncias biológicas em metano, entre outras. Os microrganismos anaeróbios e alguns aeróbios contêm enzimas hidrogenase.

O conceito da natureza de conversão de hidrogênio ou o processo reverso de geração de hidrogênio é baseado na divisão heterolítica de dihidrogênio ($\text{H}_2 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{H}^-$) em centros catalíticos. A acidez do H₂, que é extremamente baixa (pK_a = 35), aumenta drasticamente ao se ligar a um metal.

Para a reação acima, a transferência de dois elétrons é viável sob condições fisiológicas em cerca de -0,3 V. A simples redução de um elétron de um próton para dar um átomo de hidrogênio exigiria potenciais mais negativos de menos de -2.0 V e, portanto, condições completamente não fisiológicas. Os componentes inorgânicos das hidrogenases servem como reservatórios de elétrons e, presumivelmente, como centros catalíticos.

Hydrogenases

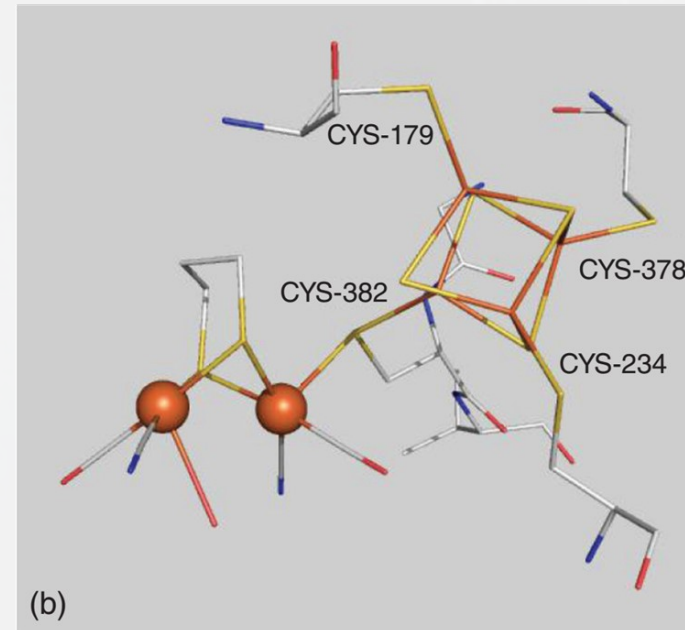
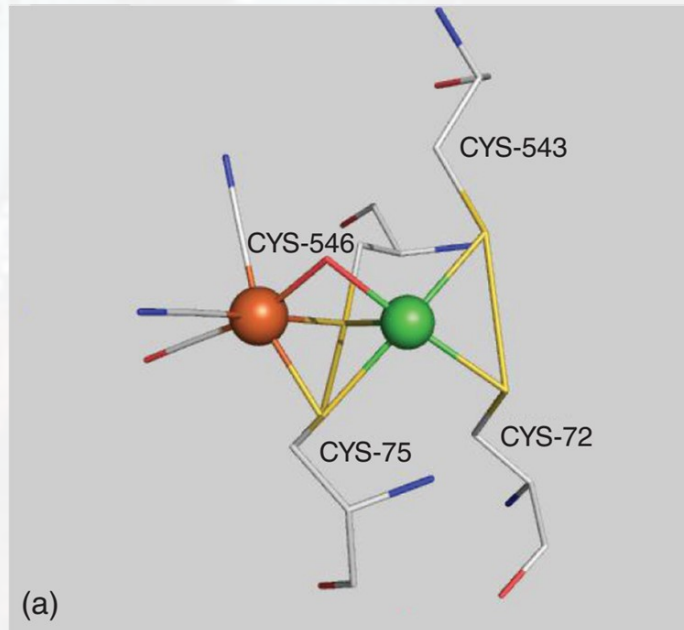
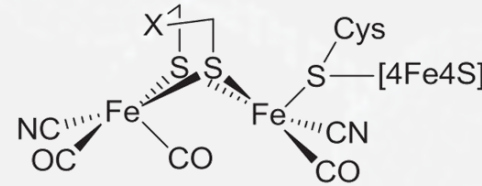
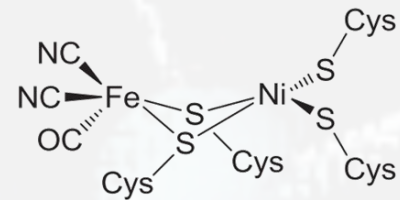
Três classes filogeneticamente distintas de hidrogenase são conhecidas hoje. Estas são as [NiFe]-hidrogenases (incluindo [Ni/Fe/Se]-hidrogenases), a forma mais comum, que contém um centro de níquel, além de grupos separados de ferro-enxofre, as [FeFe]-hidrogenases, estruturalmente semelhantes a as [NiFe]-hidrogenases e as chamadas [Fe]-hidrogenases, que contêm ferro mononuclear próximo a um cofator orgânico especial (mas nenhum aglomerado de ferro-enxofre).



E

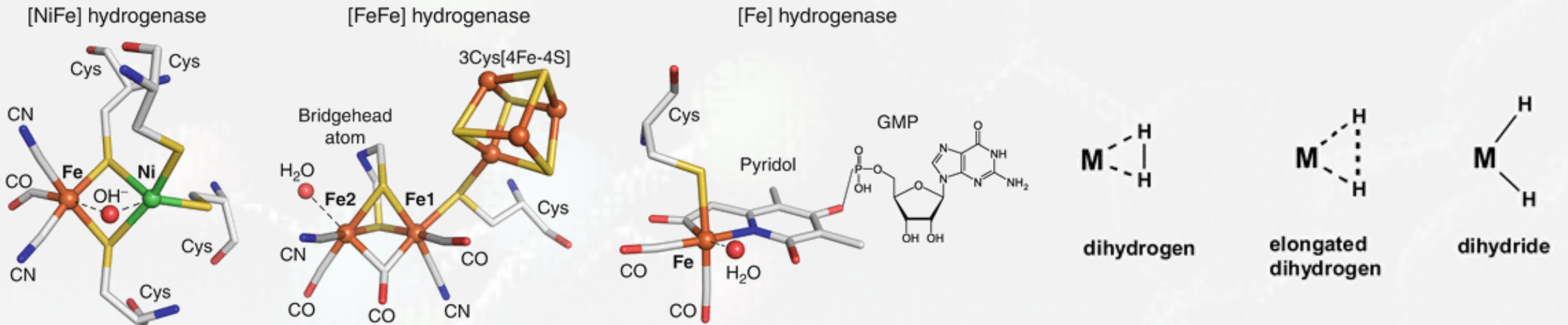
Hidrogenases

Três classes filogeneticamente distintas de hidrogenase são conhecidas hoje. Estas são as [NiFe]-hidrogenases (incluindo [Ni/Fe/Se]-hidrogenases), a forma mais comum, que contém um centro de níquel, além de grupos separados de ferro-enzofre, as [FeFe]-hidrogenases, estruturalmente semelhantes a as [NiFe]-hidrogenases e as chamadas [Fe]-hidrogenases, que contêm ferro mononuclear próximo a um cofator orgânico especial (mas nenhum aglomerado de ferro-enzofre).



Hidrogenases

Modelos correspondentes postulam a clivagem heterolítica de H_2 , onde o átomo de hidrogênio hidrídico (H^-) permanece no metal enquanto o componente prótico (H^+) se liga a um sulfeto coordenado por metal, a centros hidropéroxido ou, conforme a reação prossegue, para sítios básicos dentro da proteína.



A natureza da ligação entre o hidrogênio e o metal (Fe ou Ni) é de particular interesse. Mais do que as espécies de Fe-H, os hidretos de níquel são bem conhecidos da química organometálica. Para a abordagem primária e ligação de H_2 ao sítio ativo da enzima, a possibilidade de coordenação lateral de hidrogênio a Ni (ou Fe) é discutida, uma vez que este modo de ligação foi agora encontrado em muitos complexos.

CO Desidrogenase = CO Oxidoreductase = Acetil-CoA Sintase

Muitas bactérias metanogênicas e acetogênicas (produtoras de metano e ácido acético) contêm uma enzima "CODH" que catalisa a oxidação de CO a CO₂. Em bioquímica, a oxidação é freqüentemente equiparada à desidrogenação; no entanto, o CO não contém nenhum átomo de hidrogênio e o termo "CO-oxidoreductase" seria mais apropriado.

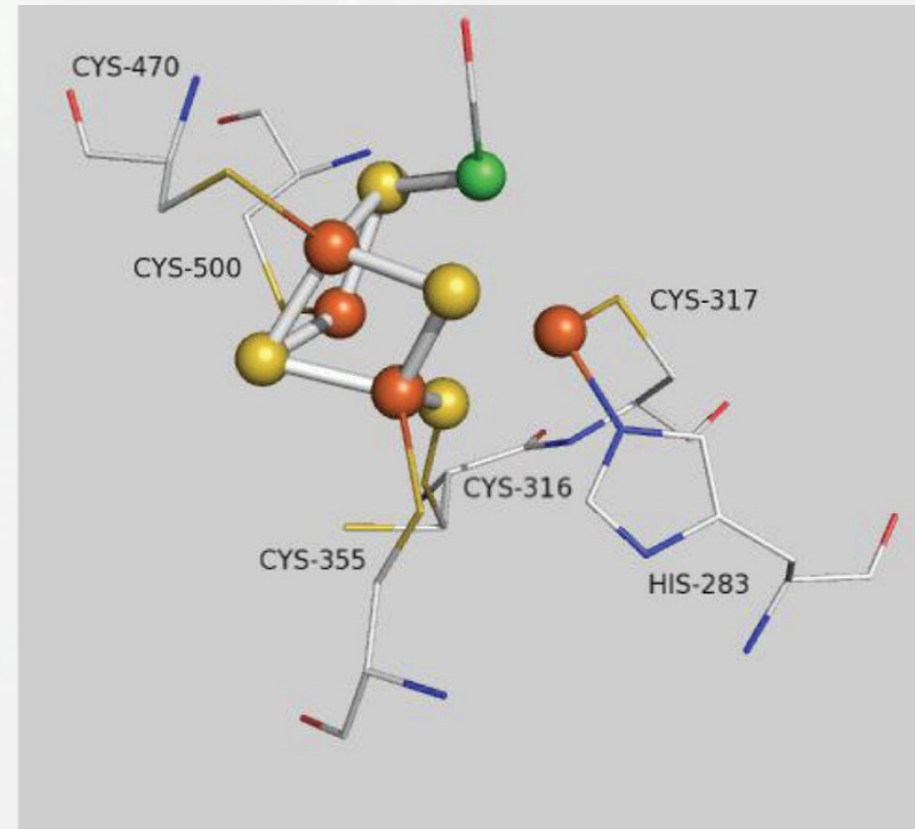
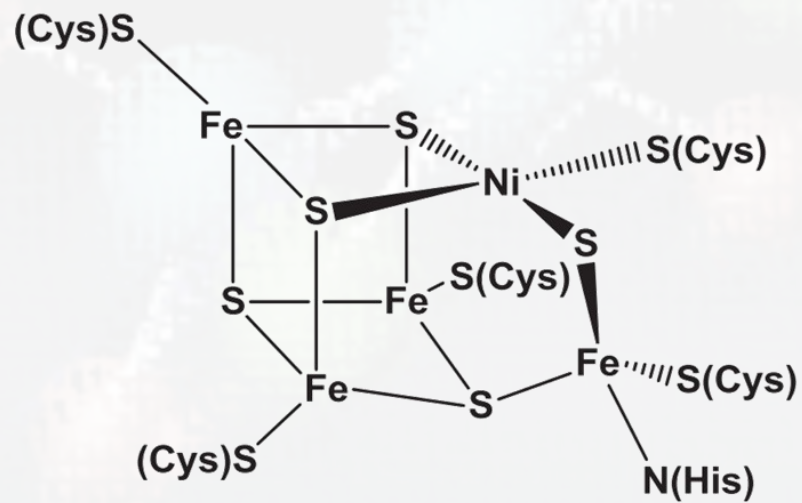


A reação é enzimaticamente reversível e pode, portanto, servir como um método alternativo de fixação de CO₂ por bactérias fotossintéticas. A outra função biológica da enzima é catalisar a formação reversível de acetil-CoA em combinação com o próprio CoA e uma fonte de metila. Proteínas corrinoídes com uma funcionalidade CH₃-[Co], uma metiltransferase e uma dissulfeto redutase contendo Fe/S também contribuem para essa reação.



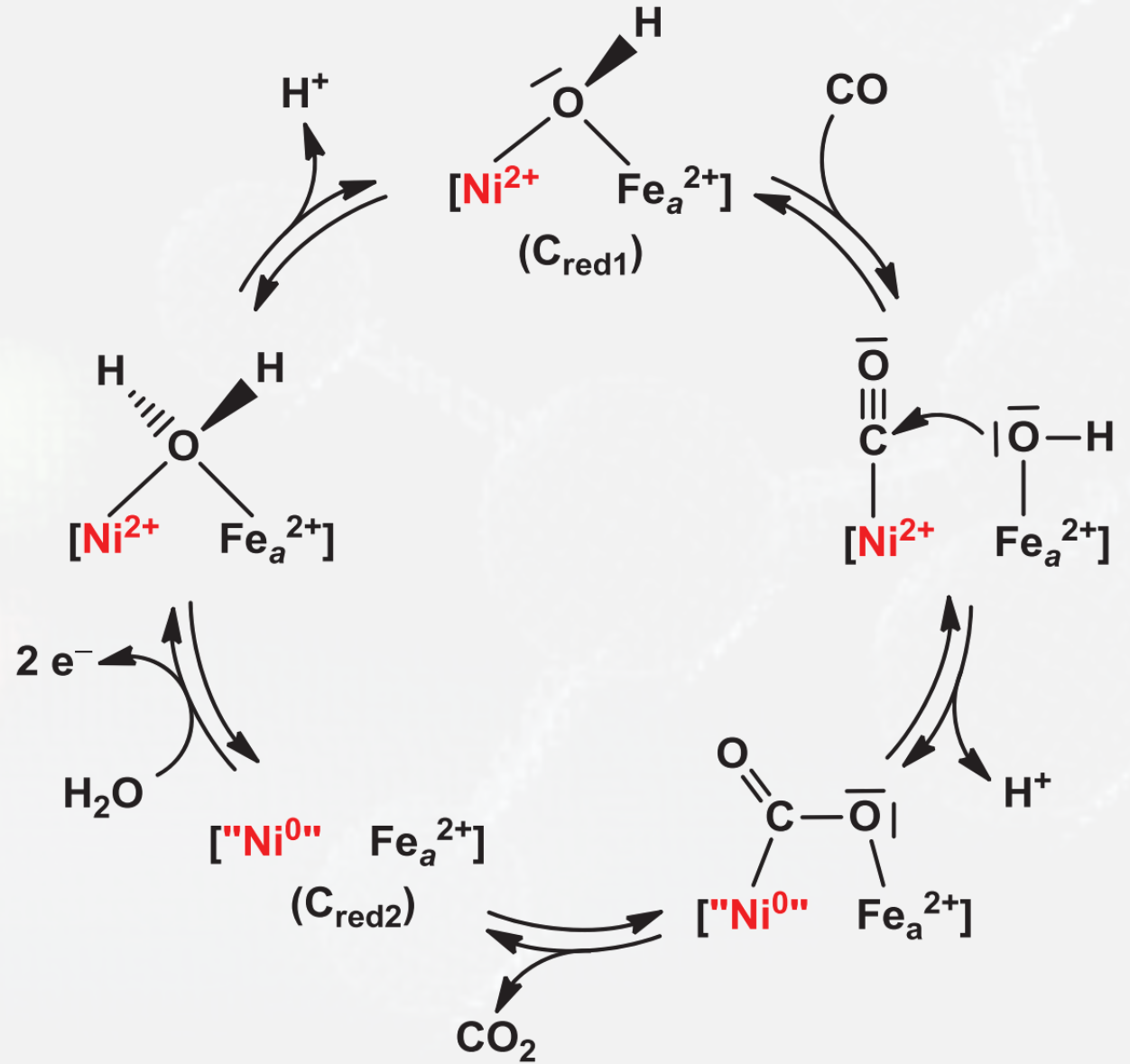
CO Desidrogenase = CO Oxidoreductase = Acetil-CoA Sintase

Foi demonstrado que o CODH de todas as bactérias anaeróbicas contém níquel, enquanto as espécies aeróbicas requerem molibdopterina. Várias estruturas de cristal foram obtidas, o que mostra que a enzima é um homodímero em forma de cogumelo contendo aglomerados de metal. O cluster “C” é um cluster [3Fe-4S] ligado a um sítio heterodinuclear [NiFe], o centro catalítico para a oxidação de CO. Os clusters B e D são clusters [4Fe-4S]^{2+/1+} que transferem elétrons entre o cluster C e as proteínas redox externas.



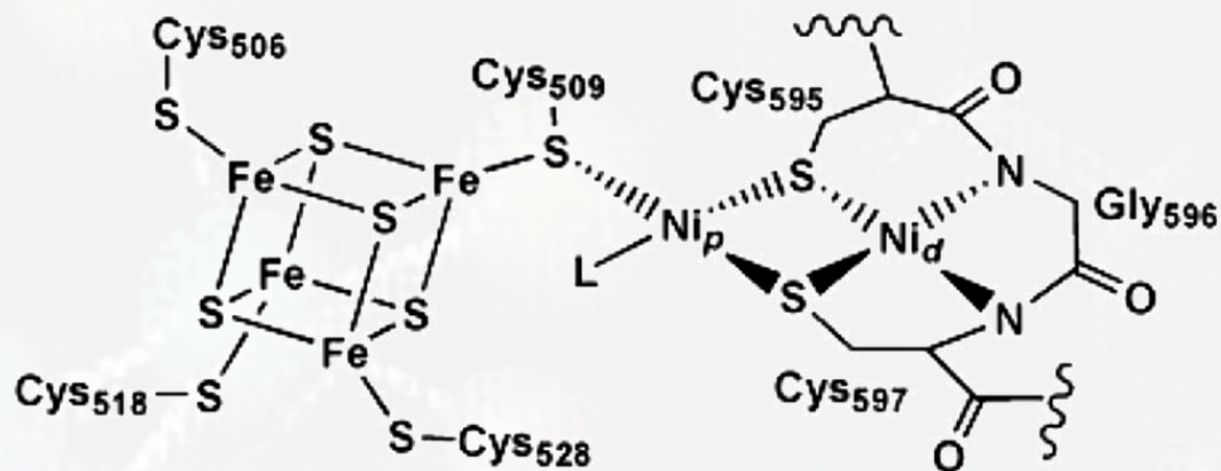
CO Desidrogenase = CO Oxidoreductase = Acetil-CoA Sintase

A partir desta estrutura e outras evidências espectroscópicas, o mecanismo para a oxidação do CO pode ser descrito: A H_2O está ligado ao cluster C na posição de ponte Fe...Ni, perdendo um próton (C_{red1}). Quando o CO está ligado (presumivelmente ao Ni), o OH^- ligado ao Fe é capaz de realizar um ataque nucleofílico ao CO. O intermediário Ni-CO (OH) é desprotonado e o CO_2 é formado, enquanto dois elétrons são transferidos no cluster C ($\text{C}_{\text{red1}} \rightarrow \text{C}_{\text{red2}}$). Os dois elétrons são posteriormente transferidos para o aglomerado B, depois para o aglomerado D e, finalmente, para aceitadores de elétrons externos.



CO Desidrogenase = CO Oxidoreductase = Acetil-CoA Sintase

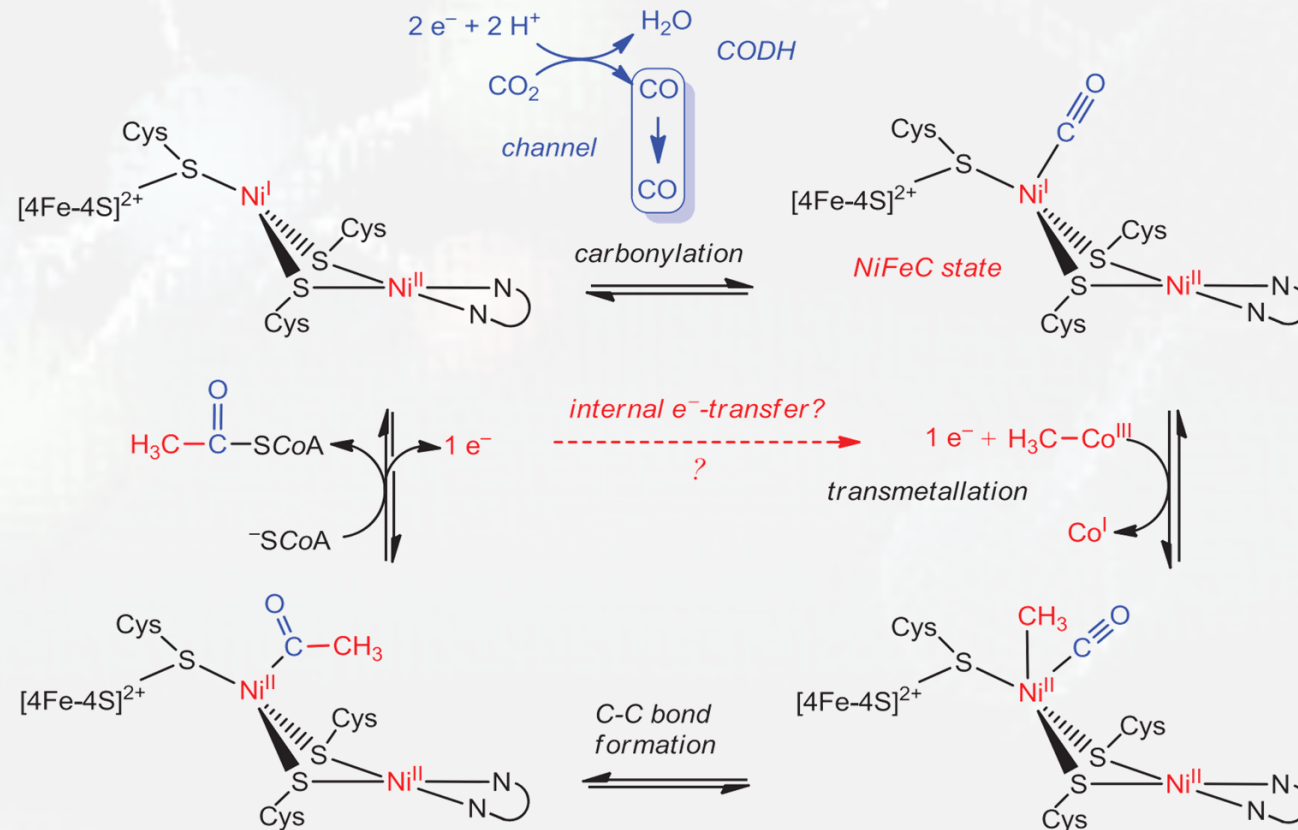
O sítio ativo ACS (o "cluster A") consiste em um agrupamento [4Fe-4S], que é ligado por ponte de tiolato ao chamado "íon Ni distal" (Nid), que tem um ambiente de coordenação N₂S₂. Existe uma semelhança entre este arranjo e as hidrogenases. A esfera de coordenação de Nip é completada por um ligante L exógeno de identidade até agora desconhecida.



Existem duas linhas principais de mecanismos propostos para ACS. Um descreve todas as etapas envolvendo apenas intermediários diamagnéticos e, portanto, precisa postular um estado Ni⁰ biologicamente bastante improvável, enquanto o outro compreende espécies paramagnéticas. O que é geralmente aceito é que as estruturas cristalinas de CODH / ACS revelam a presença de um canal hidrofóbico conectando o sítio ativo CODH (cluster C) ao cluster A de ACS. Este canal de gás se abre no metal proximal ao aglomerado [4Fe-4S], sugerindo que Nip é o local de ligação do CO. Em sua forma isolada, CODH / ACS é oxidado e silencioso com EPR, consistente com um cluster [4Fe-4S]²⁺ ligado a dois íons S = 0 Ni²⁺.

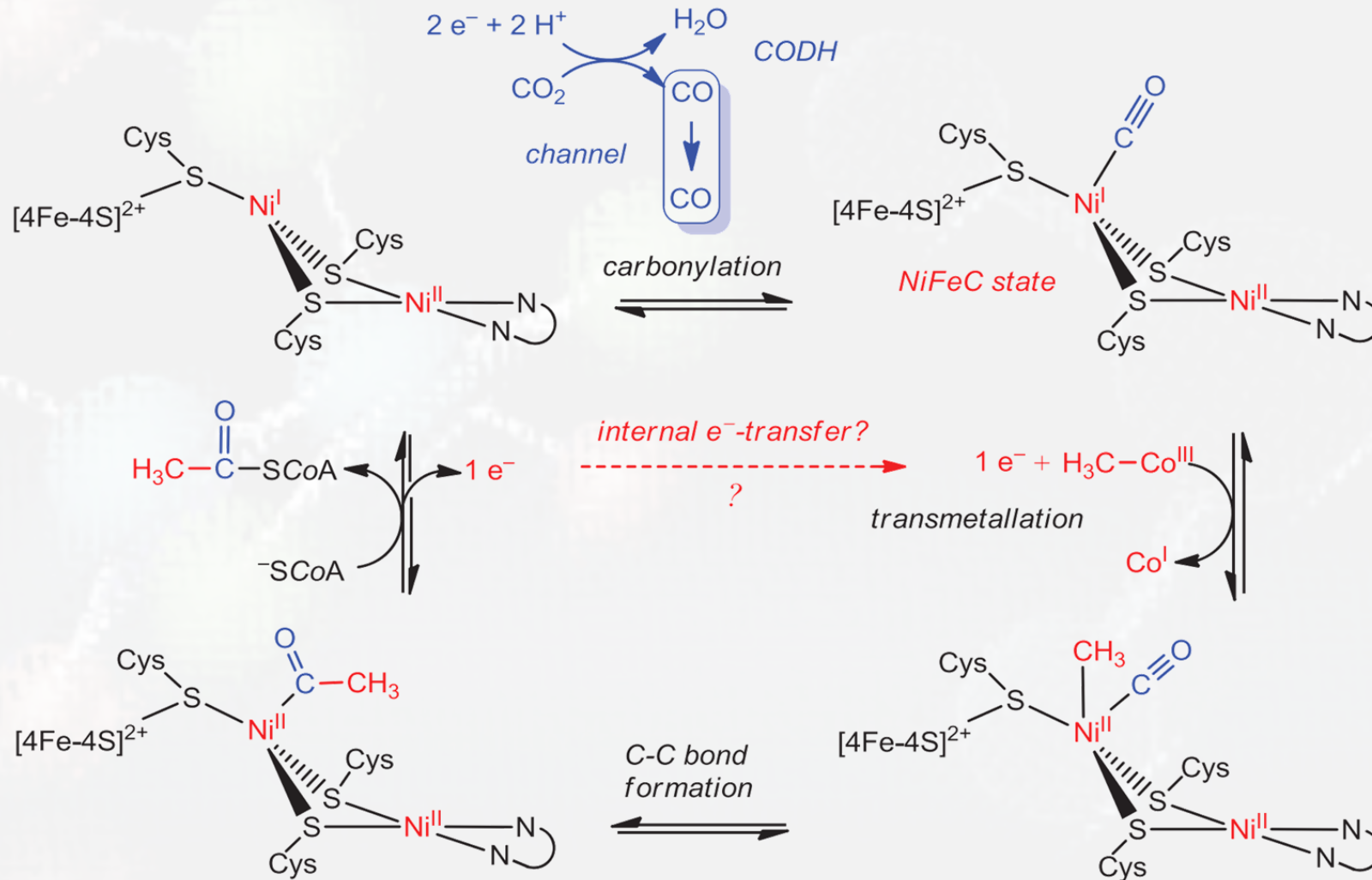
CO Desidrogenase = CO Oxidoreductase = Acetil-CoA Sintase

Existem duas linhas principais de mecanismos propostos para ACS. Um descreve todas as etapas envolvendo apenas intermediários diamagnéticos e, portanto, precisa postular um estado Ni^0 biologicamente bastante improvável, enquanto o outro compreende espécies paramagnéticas. O que é geralmente aceito é que as estruturas cristalinas de CODH/ACS revelam a presença de um canal hidrofóbico conectando o sítio ativo CODH (cluster C) ao cluster A de ACS. Este canal de gás se abre no metal proximal ao aglomerado $[\text{4Fe-4S}]$, sugerindo que Nip é o local de ligação do CO. Em sua forma isolada, CODH/ACS é oxidado e silencioso com EPR, consistente com um cluster $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ ligado a dois íons $\text{S} = 0 \text{ Ni}^{2+}$.



CO Desidrogenase = CO Oxidoreductase = Acetil-CoA Sintase

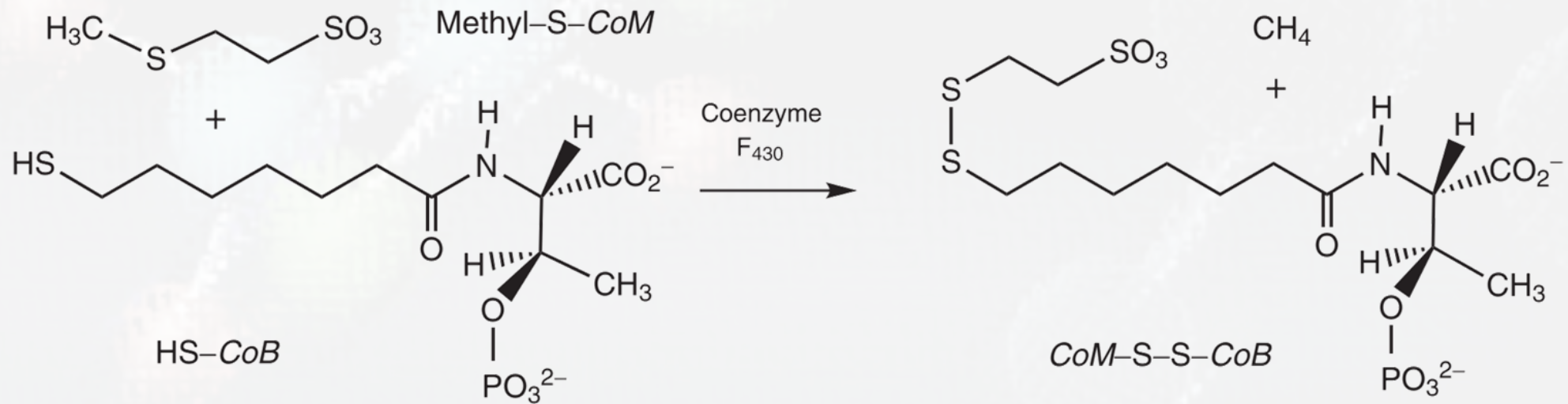
O uso de um centro de metal de baixa valência como um nucleófilo é raro em bioquímica e lembra as reações de metiltransferases dependentes de cobalamina, como a metionina sintase.



Metil-coenzima M Redutase (Cofator F430)

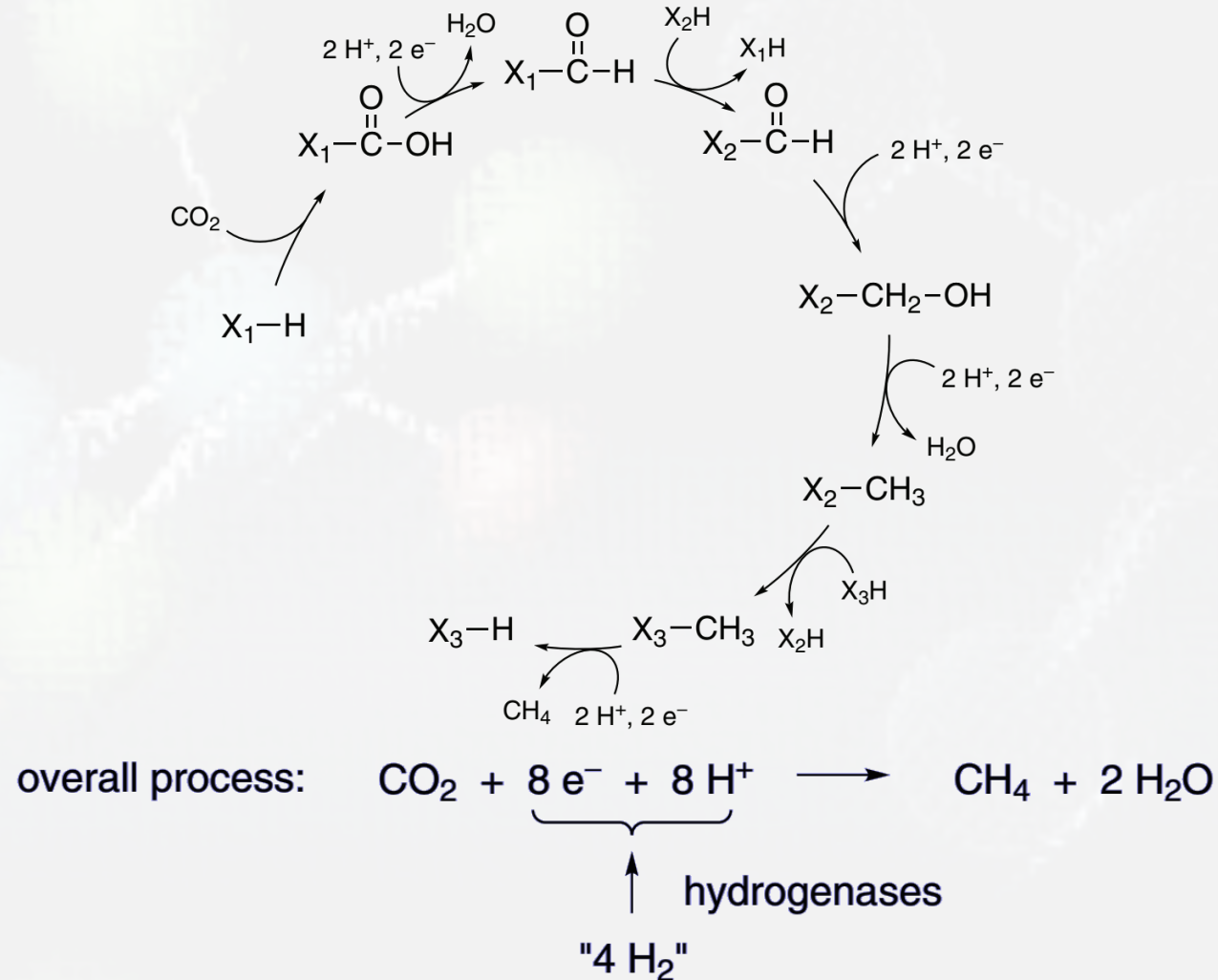
Metil-coenzima M redutase (MCR) atende bactérias metanogênicas na eventual formação e liberação de metano, catalisando a redução de metil-CoM (2-metiltioetanossulfonato)

A reação é a última etapa na síntese de produção de energia de CH_4 a partir de CO_2 por arqueobactérias autotróficas, como *Methanobacterium thermoautotrophicum*.



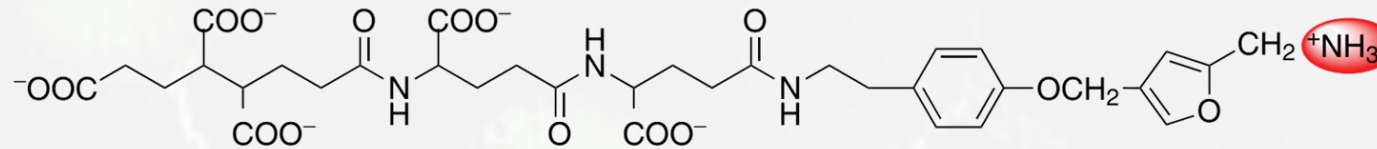
Metil-coenzima M Redutase (Cofator F430)

Várias coenzimas são essenciais para todo o processo de conversão de CO₂ em CH₄, que requer um total de oito elétrons. Os elétrons necessários para as várias etapas de redução são obtidos por meio da oxidação do hidrogênio molecular, que é catalisado por várias hidrogenases.

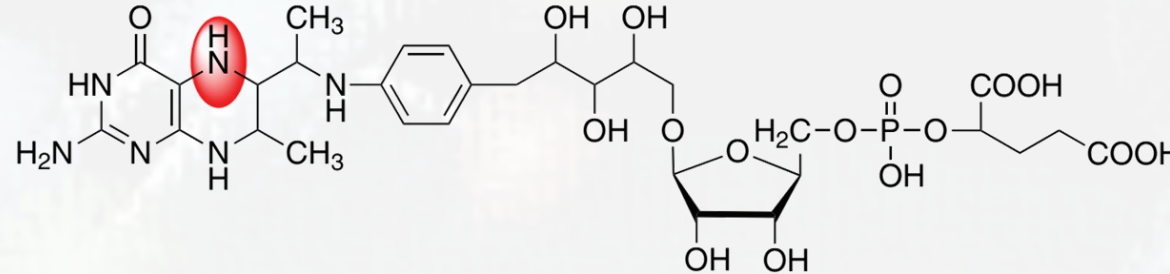


Metil-coenzima M Redutase (Cofator F430)

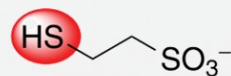
Várias coenzimas são essenciais para todo o processo de conversão de CO₂ em CH₄, que requer um total de oito elétrons. Os elétrons necessários para as várias etapas de redução são obtidos por meio da oxidação do hidrogênio molecular, que é catalisado por várias hidrogenases.




methanofuran, X₁H



tetrahydromethanopterin, X₂H



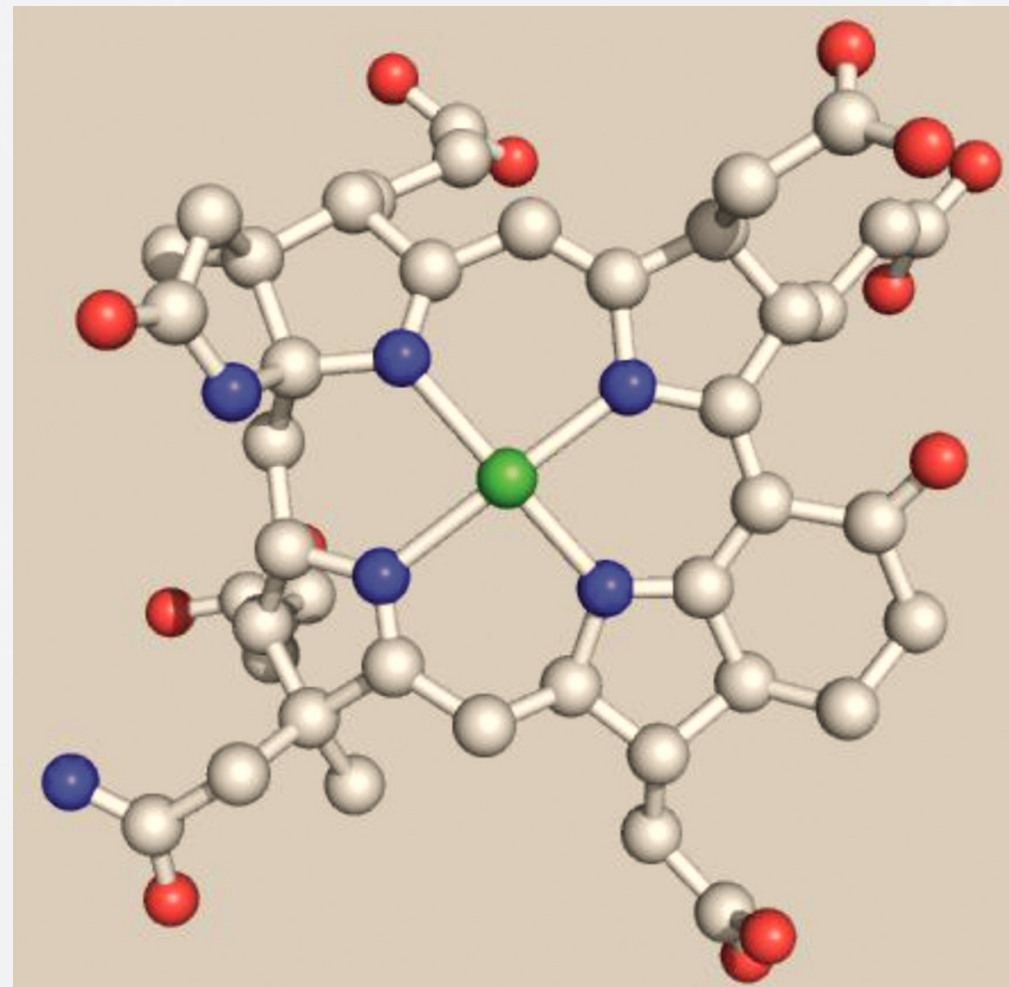
HS-CoM (coenzyme M), X₃H

 : substitution site for C₁ fragments

Metil-coenzima M Redutase (Cofator F430)

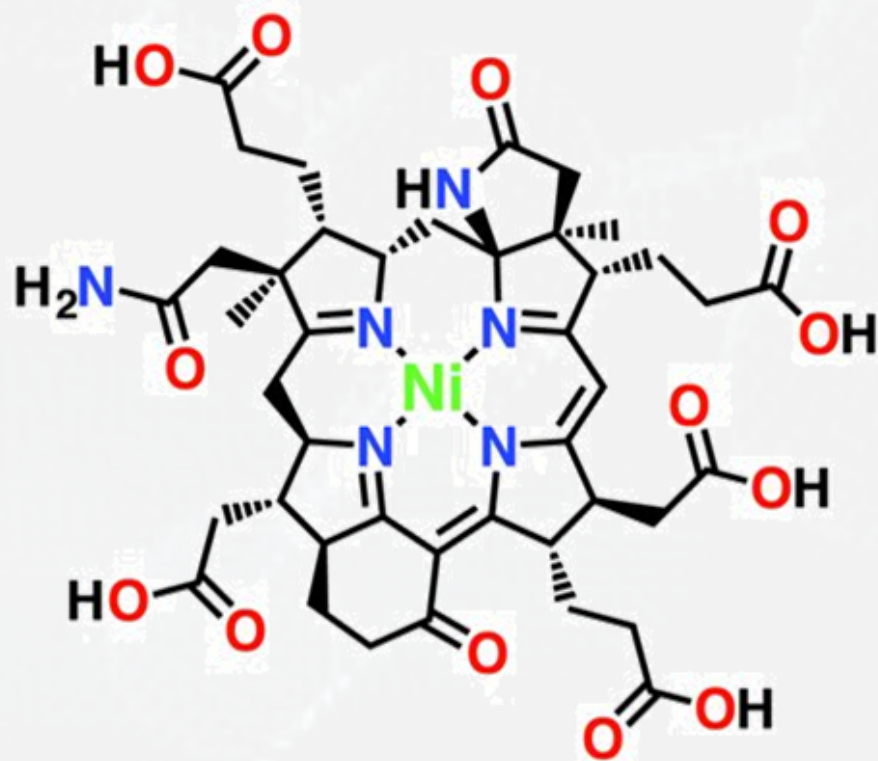
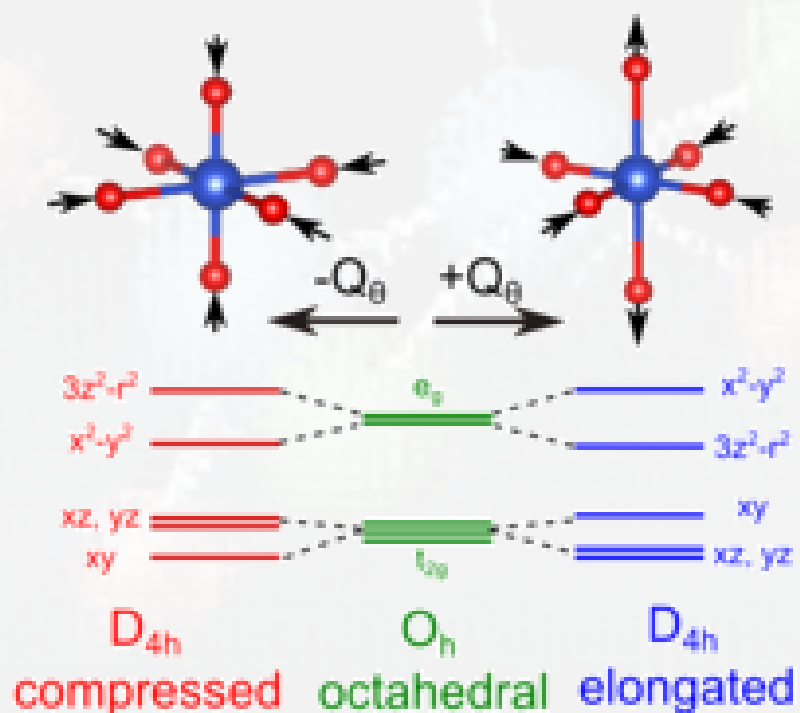
O MCR é uma enzima muito sensível e complexa. A proteína dimérica possui massa molecular de aproximadamente 300 kDa e é composta por três subunidades de 68, 47 e 38 kDa cada. Uma substância amarela de baixo peso molecular que contém níquel e mostra um máximo de absorção intensa a 430 nm foi isolada da enzima: o fator F430.

A identidade desta primeira coenzima níquel-tetrapirrol foi elucidada por extensa marcação bio sintética e métodos espectroscópicos (NMR) e difratometria de raios X. Apresenta um sistema de porfirina altamente hidrogenada com lactama anelada e anéis de ciclohexanona em que o cromóforo se estende apenas por três dos quatro átomos de nitrogênio. A estrutura do anel subjacente foi chamada de “hidrocofina” para destacar as relações com as porfirinas e as corrinas não ciclicamente conjugadas (F430 como “elo perdido” na evolução dos tetrapirróis).



Metil-coenzima M Redutase (Cofator F430)

O caráter parcialmente saturado do macrociclo e a condensação dos anéis saturados adicionais permitem uma flexibilidade estrutural, especialmente no que diz respeito a um dobramento do anel de tetra-pirrol na direção de uma distorção S_4 . Como uma consequência importante, tanto a inversão de spin para Ni^{II} spin baixo ($S = 0$) e a transição para o estado Ni^I configurado por d^9 são facilitados para o centro de Ni^{II} spin alto ($S = 1$).

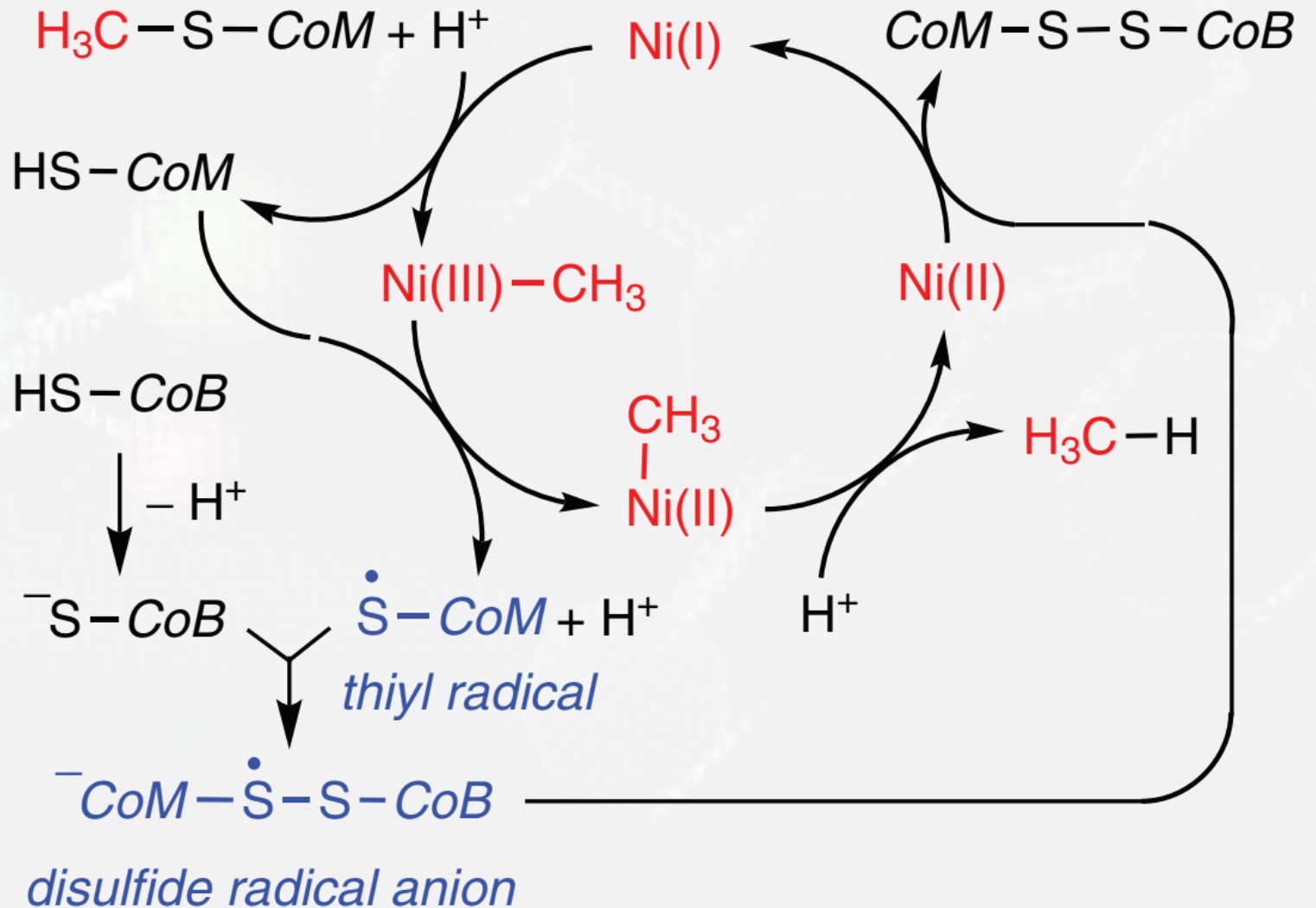


coenzyme F430

Metil-coenzima M Redutase (Cofator F430)

A análise da função mecanística do níquel no cofator F430 ligado à enzima está longe de ser completa, e dois mecanismos diferentes estão em discussão

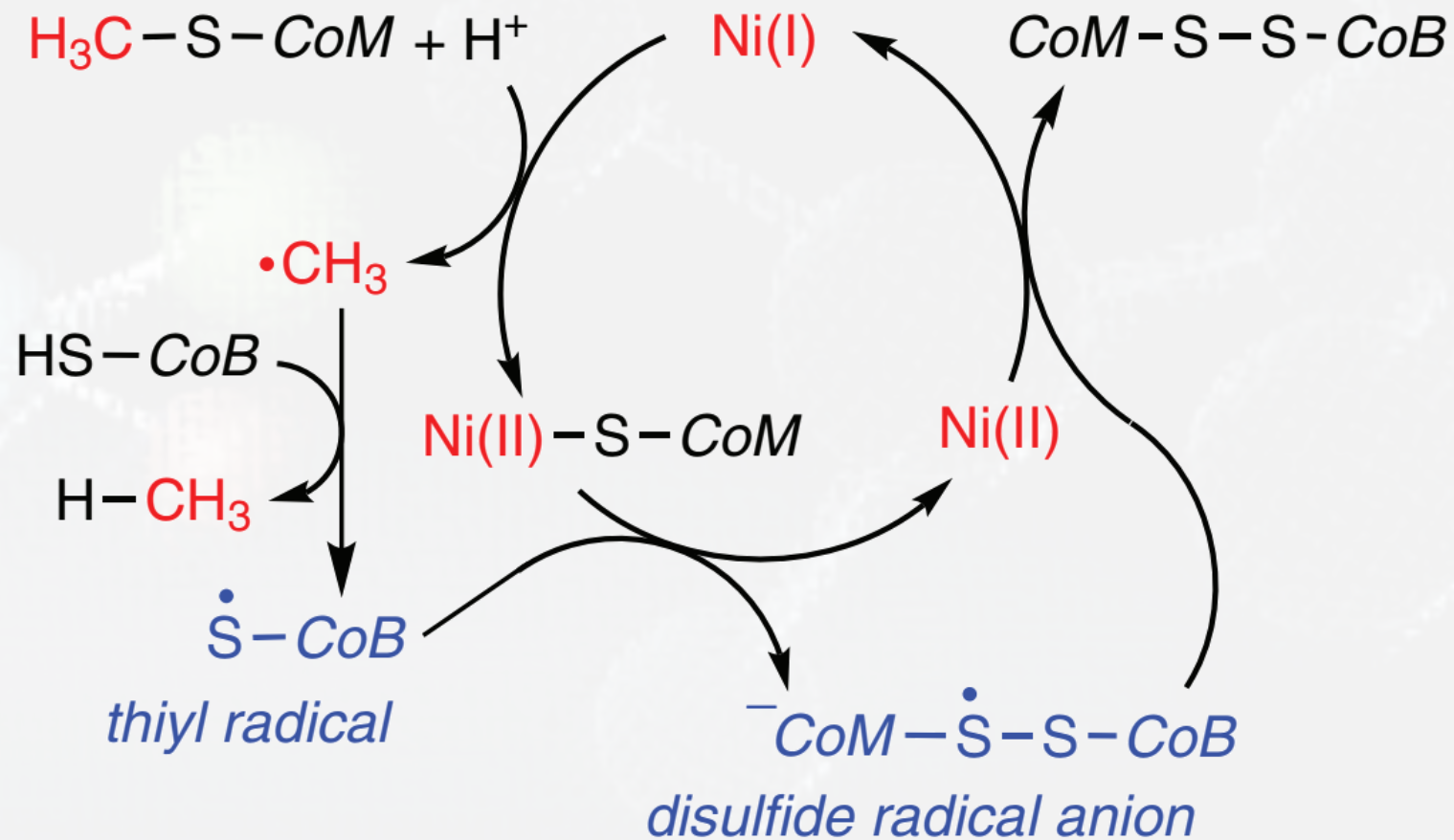
O mecanismo catalítico I postula como etapa chave um ataque nucleofílico do Ni^I de F430 no grupo metil de CH₃-SCoM. O estado assim gerado de CH₃-Ni^{III} (MCRMe) ainda não foi observado dentro do ciclo catalítico, embora uma espécie de CH₃-Ni^{III} gerada artificialmente pode ser detectada via difração de raios-x (XRD) e espectroscopia de absorção de raios-X (XAS).



Metil-coenzima M Redutase (Cofator F430)

A análise da função mecanística do níquel no cofator F430 ligado à enzima está longe de ser completa, e dois mecanismos diferentes estão em discussão

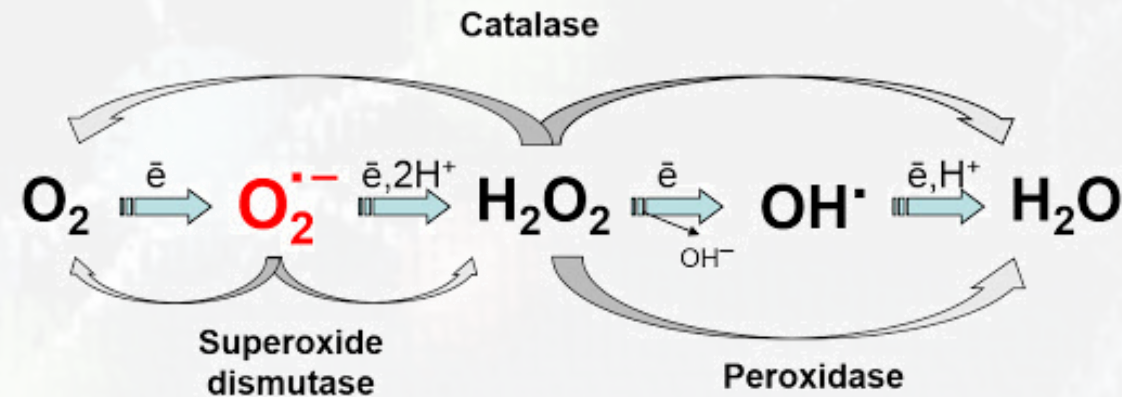
O mecanismo II inclui em sua etapa principal um ataque de Ni^I ao enxofre tioéter de CH₃-SCoM, gerando um radical metil livre, que é convertido em CH₄ pela retirada de um átomo de hidrogênio do grupo sulfidrila de HS-CoB. A forma do radical tioil do CoB assim produzida combina-se com o tiolato CoM para formar o radical heterodissulfeto ânion, enquanto o excesso de elétron é devolvido ao níquel.



Superoxido dismutase

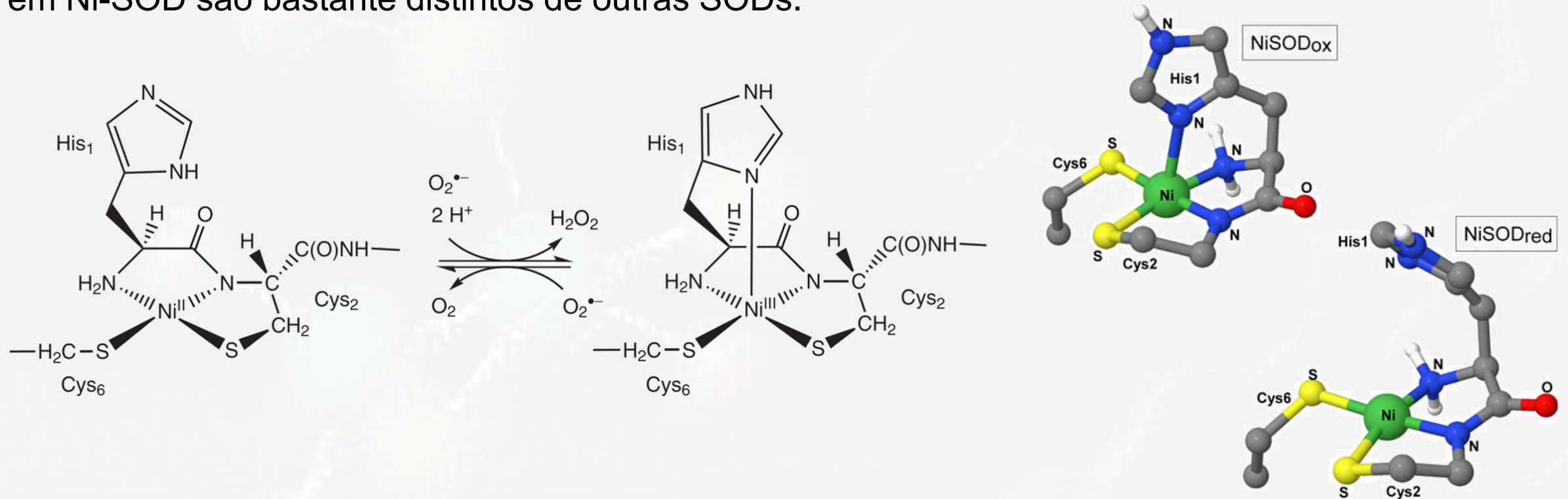
Os superóxidos (ROS) ($O_2^{\cdot-}$) é um subproduto citotóxico inevitável do metabolismo aeróbio e, se não for eliminado, pode levar a uma variedade de distúrbios de saúde.

Uma série de metaloenzimas conhecidas como superóxido dismutases (SODs) são capazes de catalisar a desproporção de $O_2^{\cdot-}$ metaestável em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 por meio da oxidação e redução alternadas dos centros metálicos presentes em seus sítios ativos.



Superoxido dismutase

Ni-SOD foi caracterizada há relativamente pouco tempo e não se sabe muito sobre o mecanismo. No entanto, a conformação geral da proteína, espectroscopia, ligantes e geometria de coordenação em Ni-SOD são bastante distintos de outras SODs.

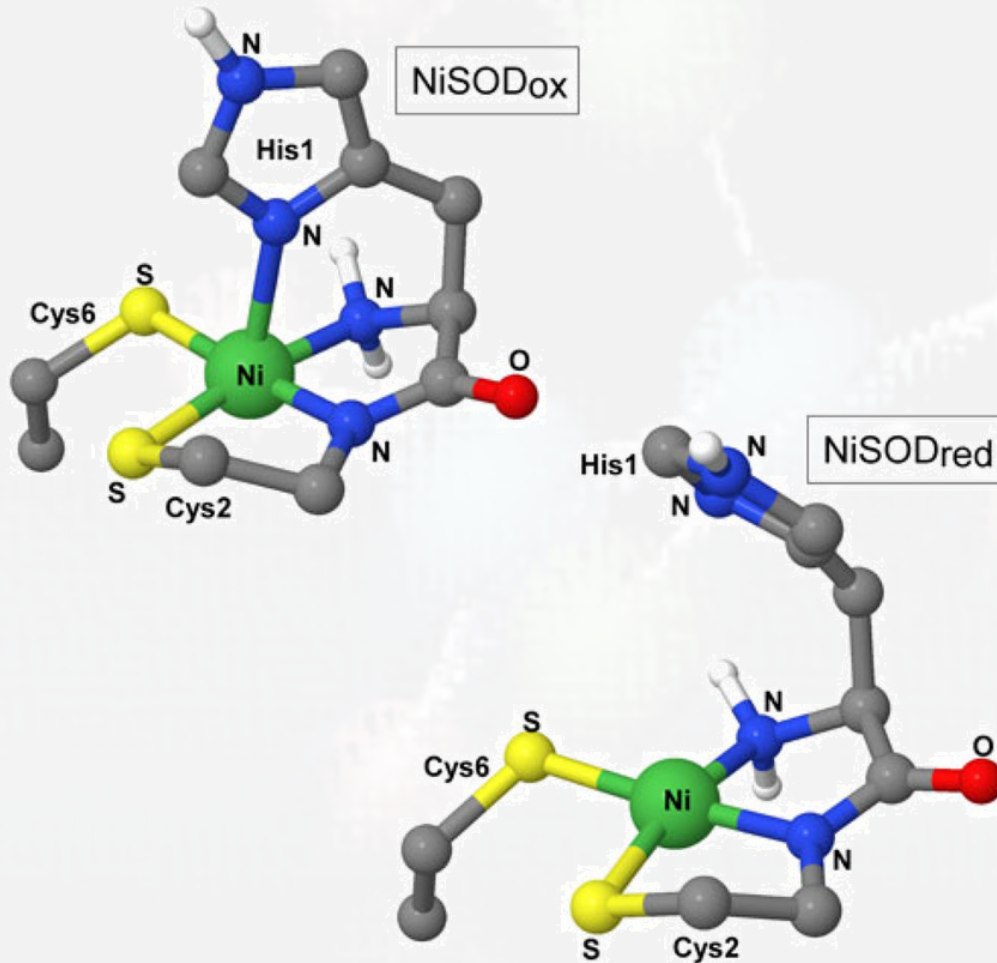


Ni-SOD em sua forma Ni^{II} (Ni-SOD_{red}) tem uma geometria N₂S₂ quadrada-planar.

A oxidação de Ni-SOD_{red} a Ni^{III} produz uma mudança estrutural em torno do centro do metal; o grupo da histidina N-terminal se coordena com o Ni^{III} na posição axial.

Superoxido dismutase

Outra característica marcante do Ni-SOD é a presença de dois tiolatos de cisteína coordenados, que são responsáveis pela modulação do par redox Ni^{2+/3+} para um valor adequado para a função fisiológica.



A fim de ser capaz de reduzir e oxidar $O_2^{\cdot -}$, o par redox Ni^{III/II} do centro ativo deve estar entre os de $O_2^{\cdot -} / O_2$ (-0,16 V) e $O_2^{\cdot -} / H_2O_2$ (0,89 V vs NHE).

Questões adicionais surgem sobre como: O modo de coordenação do superóxido, a fonte de prótons (semi-reação oxidação), e como isso se liga ao mecanismo catalítico geral de Ni-SOD.