



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

JOSIANE BEZERRA DA SILVA LOBÃO

**ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS E CROMATOGRÁFICOS DA PROTEÍNA
RECOMBINANTE DEVS DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

FORTALEZA

2018

JOSIANE BEZERRA DA SILVA LOBÃO

ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS E CROMATOGRÁFICOS DA PROTEÍNA
RECOMBINANTE DEVS DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L776e

Lobão, Josiane Bezerra da Silva Lobão.

Estudos espectroscópicos e cromatográficos da proteína recombinante DevS do *Mycobacterium tuberculosis* / Josiane Bezerra da Silva Lobão Lobão. – 2018.

74 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa.

1. Hemeoproteínas. 2. Transdução de sinal celular. 3. Tuberculose. I. Título.

CDD 540

JOSIANE BEZERRA DA SILVA LOBÃO

ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS E CROMATOGRÁFICOS DA PROTEÍNA
RECOMBINANTE DEVS DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Inorgânica.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Dávila de Souza Zampieri
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Idalina Maria Moreira de Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, marido, irmãos, amigos e
professores.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores, a todos e a cada um, meu obrigado.

Ao Orientador estimado Eduardo Henrique, extremamente dedicado.

Aos Simples funcionários, absolutamente necessários.

Aos Grandes amigos recentes e reencontrados.

Aos Recursos financeiros disponibilizados.

Às Ajudas, que foram muitas e de muitas partes, diretas e indiretas.

Aos Dias de trabalho, muitas vezes exaustivos, mas recompensados.

À União do grupo de pesquisa que nos mantém firmes o necessário.

Aos Artigos já publicados, e sem dúvida,

Aos Cientistas que vieram antes de nós.

Aos Aprendizados valorosos repassados.

Ao Onipotente que age por nós e apesar de nós, meu obrigado.

Ao Esforço que passa despercebido daqueles que estão a nossa volta.

Ao Marido e familiares esforçados, e que Graças a Deus, os tenho.

Aos Químicos que deixaram o legado de saber do qual usufruímos.

À Universidade Federal do Ceará, pela estrutura fornecida.

À Inteligência, grande bênção que nos foi concedida.

Aos Momentos de alegria que também existiram, afinal, estamos vivos.

À Inquietação e curiosidade que me fazem avançar.

Ao Curso de Química e aos brasileiros que o mantem com seu trabalho.

Aos Anos, agora passados, mais uma vez repito, obrigado.

“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses que-fazer-se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino, continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a novidade.”

FREIRE (1999, p. 32).

RESUMO

A heme proteína sensora DevS está diretamente envolvida no processo de dormência do *Mycobacterium tuberculosis*, o qual está associado a sua persistência na população. Entender o funcionamento desse sensor se mostra fundamental para o planejamento de novos agentes terapêuticos. Neste trabalho foi produzida e purificada a proteína DevS recombinante, tendo sido realizados estudos espectroscópicos e cromatográficos. Espectroscopia eletrônica no UV-vis foi empregada para avaliar a estabilidade do domínio heme frente a agentes desnaturantes, obtendo-se parâmetros físico-químicos que mostraram ser este domínio mais estável frente à ureia que a cloridrato de guanidínio, e ainda mais estável na forma oxi-DevS ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$), inativa, que na carboxi-DevS ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$), ativa. Estudos de fluorescência mostraram que há alteração do microambiente dos triptofanos quando alterou-se da forma inativa para ativa. Adicionalmente, com uso da sonda fluorescente bis-ANS foi possível medir de forma indireta a afinidade de metais divalentes como Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} , que tem papel importante para o funcionamento da atividade histidina quinase. Curiosamente, essas afinidades não se alteraram quando a enzima fora ativada, indicando o não envolvimento da afinidade aos metais na transdução de sinal. As medidas de dicroísmo circular (CD), mostraram similaridade de estruturas secundárias entre as formas ativa, Fe^{II} deoxi, e inativa, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$, composta majoritariamente, por α -hélices. Todavia, na região do UV próximo na forma oxi há alterações expressivas dos resíduos aromáticos em consistência com as medidas de fluorescência. O CD da região do grupo heme não mostrou alterações na orientação dos propionatos e vinilas entre as formas ativas e inativas, diferentemente do que fora observado para proteínas análogas como a FixL. Estudos cromatográficos, empregando filtração em gel analítica, mostraram a proteína DevS como dímero, tetrâmero e octâmero, não relatado para proteínas análogas. Surpreendentemente, as formas ativas desta proteína exibiram majoritariamente a forma octamérica, enquanto as inativas favorecem as tetraméricas e diméricas. Estas mudanças de oligomerização ocorrem rapidamente e reversivelmente, desvendando assim a forma de transdução de sinal deste sensor.

Palavras-chave: Heme proteína sensora. DevS. Transdução de sinal. Tuberculose.

ABSTRACT

DevS is a heme-based sensor protein directly involved in the dormancy process in *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). This phenomenon is associated to persistence of Mtb around the World. A better understanding of how this sensor works is key to the develop new therapeutic approaches. Here, recombinant DevS was expressed, purified and investigated by spectroscopic (UV-vis, fluorescence and CD) and chromatographic (gel filtration) techniques. Electronic spectroscopy was employed to evaluate the stability of the heme domain toward chemical denaturation. Guanidinium chloride was much more efficient than urea, whereas oxy-DevS (Fe^{II}-O₂), an inactive form, was also more stable than carboxy-DevS(Fe^{II}-CO), active form. That might be due to hydrogen bonding taking place with oxygen. Fluorescence studies showed tryptophans emission was sensitive to changes from active to inactive state. Interestingly, bis-ANS, used as a fluorescent probe, showed an indirect response to divalent metals enabling measurement of dissociation constants for Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ e Zn²⁺. These metals have key role in the histidine kinase activity, however, there was no change in their affinities either in active or inactive states suggesting their binding is not involved in signal transduction. Circular dichroism measurements for active, Fe^{II} deoxy, and inactive forms, Fe^{II}-O₂, showed no changes in the secondary structures, found mainly as α helix. However, CD in the near-UV for oxy-DevS showed significant changes at the aromatic residues in support to tryptophan fluorescence data. Nonetheless, CD of the heme in the visible showed there is no change in the conformation of propionate and vinyl, in contrast to the analogous heme-based sensor FixL. Analytical gel filtration data showed DevS is found as a mixture of octamer, tetramer and dimers, which was not reported before for any similar protein. Remarkably, all active forms of DevS favored octamers, while the inactive form to tetramers and dimers. This fast and reversible switch on the oligomerization states of DevS unraveled its mechanism of signal transduction, which might be employed also by other analogous systems.

Keywords: Heme-based sensor. DevS. Signal transduction. Tuberculosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estrutura geral de proteínas. 1 – estrutura primária (sequencia de aminoácidos), 2 – estrutura secundária, alfa hélice e folhas beta, 3 – estrutura terciária, 4 – estrutura quaternária..... 20
- Figura 2 – Esquema do funcionamento de um sistema de dois componentes. O sinal fisiológico é percebido pelo domínio sensor, ativando a atividade de histidina quinase, que por sua vez ativará o segundo componente, regulador de resposta, que então se ligará a uma sequencia específica do DNA e induzirá a expressão gênica..... 22
- Figura 3 – Grupo Heme b, ferro II, ligado a um resíduo de histidina na proximal e ao oxigênio gasoso na região distal..... 23
- Figura 4 – Modulação do sinal em heme proteínas sensoras. A ligação do ligante ao grupo ferro-protoporfirina ativa ou inativa uma cascata de sinalização..... 23
- Figura 5 – Representação esquemática da estrutura e tamanho dos domínios da DevS, indicando a quantidade de resíduos de aminoácidos de cada subunidade e a posição aproximada do grupo heme e do resíduo fosforilável de histidina..... 25
- Figura 6 – A: Perfil da purificação da proteína DevS, empregando-se SDS-PAGE 10%. 1 – Fração Solúvel (citossol), 2 – Precipitado com 40% SAS, 3 – Fenil-Sepharose, 4 – DEAE-Sepharose. B: Espectro eletrônico da proteína purificada DevS na sua forma ligada ao oxigênio molecular..... 37
- Figura 7 – Espectro eletrônico na região do UV-Vis para a proteína DevS nas formas ativas e inativas. A - Fe^{II} ligada a oxigênio, B - Fe^{III} ligada a água, C - Fe^{II} sem ligante distal e D - Fe^{II} ligado a monóxido de carbono..... 38
- Figura 8 – Desnaturação química monitorada por espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis induzida por ureia, 0 a 8 mol L⁻¹ incubada por 7h. A 41

- Espectro de absorção no UV-Vis para a forma oxi-DevS com a adição de ureia. B – Curva de máximo de absorção da banda *Soret* na presença de ureia em triplicata.....
- Figura 9 – Desnaturação química de 4 μM da proteína DevS ligada a oxigênio monitorada por espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis induzida por cloridrato de guanidina na concentração de zero a 5 mol L^{-1} incubada por 7h. A – Espectro de absorção no UV-vis para a adição de GndHCl a DevS oxi. B – Curva acompanhando os máximos de absorção da banda *Soret* na presença de GndHCl..... 41
- Figura 10 – Desnaturação química de 4 μM da proteína DevS ligada a CO monitorada por espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis induzida por cloridrato de guanidina na concentração de zero a 5 mol L^{-1} incubada por 8h. A – Espectro de absorção. B – Curva acompanhando os máximos de absorção da banda *Soret*..... 42
- Figura 11 – Representação esquemática da estrutura e tamanho dos domínios da DevS indicando a posição dos resíduos aromáticos de triptofanos..... 44
- Figura 12 – Espectro de emissão de fluorescência de 1 μM da proteína DevS nas formas oxi e carboxi em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8. Excitação: 295 nm. Emissão: 305-420 nm. Fendas de emissão e excitação 0,75 mm..... 45
- Figura 13 – Espectro de emissão de fluorescência de 1 μM da proteína DevS na forma oxi com adição de 0 a 1 mmol L^{-1} de cátions divalentes (Ca^{2+} ; Mg^{2+}), e máximos de intensidade de fluorescência a 334 e 337 nm. Adição de CaCl_2 : A e B (Oxi); E e F (carboxi). Adição de MgCl_2 : C e D (oxi); G e H (carboxi). Excitação: 295 nm, Emissão: 305 a 420 nm. Fenda de 0,75 mm..... 48
- Figura 14 – Espectro de emissão de fluorescência de 1 μM da proteína DevS. A e B – ligada a oxigênio, com a concentração de Bis-ANS variando 49

de zero a 24 μM . C e D – ligada a monóxido de carbono, com a concentração de Bis-ANS de zero a 16 μM . Constantes de dissociação utilizando uma equação para um sítio de ligação, $K_d = 9,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ na forma oxi e $K_d = 3,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$. $R^2 = 0,99$

Figura 15 – Medidas de Afinidade a Íons Divalentes. Curvas de titulação fluorimétricas de cátions divalentes a $1\mu\text{M}$ de proteína DevS, dados ajustados a equação de um sítio de ligação. A, C, E e G correspondem a DevS oxi, inativa. Em B, D, F e H a proteína está ligada a CO, ativa. ($R^2 > 0,98$ para todas as medidas) 51

Figura 16 – Espectro de emissão de fluorescência para a titulação de $1 \mu\text{M}$ de DevS oxi com Tris-HCl pH 8, de 10 mM a 100 mM, utilizando Bis-ANS como sonda a esquerda. Curva de saturação de Tris-HCl a proteína DevS na forma oxi ligada a $12 \mu\text{M}$ de Bis-ANS acompanhando os máximos de emissão de fluorescência em 480 nm. $K_d = 27,8 \text{ mM} \pm 0,7$ utilizando a equação de um sítio de ligação a direita. ($R^2 = 0,99$) Excitação: 350 nm. Emissão: 360 nm – 600 nm. Fenda: 0,75..... 52

Figura 17 – Espectro de emissão de fluorescência e curva de associação ao Mg^{2+} , 0 a 2 mmol L^{-1} M, da proteína DevS oxi utilizando Bis-ANS como sonda acompanhando o máximo de emissão de fluorescência em 485 nm, equação considerando um sítio de ligação. A – 50 mmol L^{-1} Tris pH 8. ($R^2 = 0,96$) B – 10 mmol L^{-1} Tris, 50 mmol L^{-1} NaCl pH 8. ($R^2 = 0,988$)..... 53

Figura 18 – Espectro de emissão de fluorescência e curva de saturação de ligantes a proteína DevS carboxi em Tris 10mM pH 8 acompanhando o máximo de emissão de fluorescência, considerando a equação para um sítio de ligação. A – Titulação com NaCl, 0 a 1 mmol L^{-1} . B – Titulação com MgCl_2 , zero a 2,6 mmol L^{-1} , após adição de 1 mmol L^{-1} de NaCl..... 54

Figura 19 – Absorção dos componentes da luz polarizadas a direita (R) e a 55

esquerda (L). Em A, as componentes são absorvidas por igual, gerando um plano circular. Em B, as componentes são absorvidas diferentemente, gerando uma resultante elíptica

- Figura 20 – Espectros de dicroísmo circular na região do UV distante de estruturas secundárias características de proteínas..... 56
- Figura 21 – Espectro de dicroísmo circular na região do UV distante para a proteína DevS em Tris-HCl 10 mM pH 8 a 25°C. A – 1,5 µM de DevS oxi e met. B – 1,25 µM de DevS deoxi e carboxi..... 57
- Figura 22 – Espectro de dicroísmo circular na região do UV próximo de 30 µM da proteína DevS em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8 a 25°C. A – DevS oxi e met. B – Deoxi e carboxi..... 58
- Figura 23 – Representação esquemática da estrutura e tamanho dos domínios da DevS, indicando a quantidade de resíduos de aminoácidos de cada subunidade e a posição aproximada do grupo heme e do resíduo fosforilável de histidina, além das 6 tirosinas presentes 83, 100, 148, 171, 206, 444. 59
- Figura 24 – Espectro de dicroísmo circular na região d UV/visível de 15 µM da proteína DevS em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8 a 25°C. A – DevS oxi e met. B – DevS deoxi e carboxi..... 60
- Figura 25 – Esquema de uma regulação alostérica. A ligação do ativador no sítio alostérico leva a mudanças de afinidade do sítio ativo..... 61
- Figura 26 – Cromatograma para a proteína DevS, na forma oxi, em coluna de filtração em gel analítica, empregando-se tampão tris-HCl pH 7,4 e NaCl 50 mM; e a curva de calibração de massa molar (log MM vs tempo) empregando-se as proteínas globulares: 670 kDa, tiroglobulina; 443 kDa, ferritina; 150 kDa, álcool desidrogenase; 44 kDa, ovalbumina; 17 kDa, mioglobina, com $R^2 = 0,98$ 62
- Figura 27 – Cromatogramas da proteína DevS 2 µM em Tris 50 mM, NaCl 50 mM pH 7.4 nos estados ativos e inativos. A – sobreposição das formas oxi (vermelho) e deoxi (azul). B – sobreposição das formas carboxi (cinza) e met (verde)..... 63

- Figura 28 – Cromatogramas de DevS met com o aumento da concentração de proteína (0,5; 1; 2; 4; 8; 10; 15 e 20 μM) em tampão tris 50 mM, NaCl 50mM, pH 8. Nos gráficos destacados pelas setas temos as variações das porcentagens dos estados oligoméricos com o aumento da concentração da proteína nos diferentes estados..... 64
- Figura 29 – Cromatograma da proteína oxi-DevS 20 μM em tris 50 mM, NaCl 50 mM pH 7.4, em coluna de filtração em gel, destacando nos quadros menores as reinjeções de cada um dos estados oligoméricos isolados: octâmero, tetrâmero e dímero, que foram reinjetados nos tempo de 5, 15 e 25 min após a coleta, respectivamente..... 66
- Figura 30 – Cromatograma das injeções da proteína met-DevS 1 μM , após preparo nos tempos de 5 min, 1h, 2h, 3h e 4h.. Em destaque ilustra-se as mudanças das porcentagens relativas dos estados octamérico, tetramérico e dimérico no tempo..... 66
- Figura 31 – Cromatogramas da oxi-DevS a 1 μM em coluna de filtração em gel, com variadas concentrações de NaCl: 0, 50, 100 e 150 mM, em tampão Tris 50 mM, pH 7.4. Em B mostra-se a variação das frações dos estados oligoméricos com o aumento da salinidade..... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do gel de poliacrilamida.....	32
Tabela 2 – Concentrações de proteína utilizadas nas diferentes faixas de varredura do espectro de dicroísmo circular.....	33
Tabela 3 – Bandas com máximos de absorção da proteína DevS nos estados ferroso e férrico em tampão Tris HCl 10 mM pH 8.....	39
Tabela 4 – Parâmetros de desnaturação por Ureia e GndHCl para oxi-DevS usando um modelo de desnaturação de dois estados monitorado por absorção eletrônica no UV-visível, na banda <i>Soret</i>	42
Tabela 5 – Valores de Kd (μM) para as adições de cátions divalentes das formas oxi e carboxi da proteína DevS.....	51
Tabela 6 – Composição da estrutura secundária de oxi DevS a partir da análise dos programas CONTINLL, CDSSTR e SELCON3.....	57
Tabela 7 – Atribuição dos estados oligoméricos da DevS na forma oxi, em tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,4, empregando-se a curva padrão de calibração obtida com proteínas globulares (log MM vs tempo).....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TB	Tuberculose
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NRP	Persistência não replicativa
OMS	Organização Mundial da Saúde
ATP	Adenosina trifosfato
Bis-ANS	4,4'-bis-1- anilinaftaleno-8-sulfonato
SEC	Cromatografia de exclusão por tamanho

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	A Tuberculose	18
1.2	Sistemas proteicos de sinalização bacteriana.....	19
1.3	A heme proteína sensora DevS do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
2	JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	26
3	METODOLOGIA.....	27
3.1	Produção da proteína recombinante DevS	27
3.1.1	<i>Transformação de Células Competentes e Enriquecimento Celular</i>	27
3.1.2	<i>Expressão</i>	28
3.1.3	<i>Purificação</i>	29
3.2	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	31
3.3	Preparo das Formas Ativas e Inativas da Proteína DevS	32
3.4	Dicroísmo Circular.....	33
3.5	Desnaturação por Ureia e Cloridrato de Guanidina	34
3.6	Espectroscopia de Fluorescência.....	34
3.7	Filtração em Gel Analítica.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	Caracterização da proteína DevS	37
4.2	Obtenção das formas ativas e inativas da DevS	38
4.3	Desnaturação por agentes caotrópicos – Ureia e Guanidina	39
4.4	Espectroscopia de Fluorescência da Proteína DevS	43
4.4.1	<i>Fluorescência Intrínseca da Proteína DevS</i>	43
4.4.2	<i>Estudos de Afinidade de Ligantes a Proteína DevS por Fluorescência</i>	45
4.5	Estudos estruturais empregando dicroísmo circular (CD)	54
4.5.1	<i>Determinação da Estrutura Secundária da DevS</i>	55
4.5.2	<i>Investigação da Estrutura Terciária da DevS</i>	57
4.5.3	<i>Investigação da região do cofator heme</i>	59
4.6	Investigação do Estado de Oligomerização por Filtração em Gel	60
4.6.1	<i>Comparação entre as formas ativas e inativas da proteína</i>	62
4.6.2	<i>Investigação do efeito da concentração da proteína na oligomerização</i>	64
4.6.3	<i>Isolamento dos estados oligoméricos</i>	65
4.6.4	<i>Monitoramento da reorganização dos estados oligoméricos no tempo</i>	66
4.6.5	<i>Investigação do efeito da força iônica nos estados de oligomerização</i>	67
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), também conhecido como bacilo de Kock por ter sido descoberto por Robert Kock em 1882. Do latim, *tuberculum*, significa pequena massa, inchaço, fazendo menção aos nódulos que a doença gera nos pulmões. Após o contágio inicial pelas vias respiratórias, em geral, o micro-organismo se instala nos pulmões induzindo uma resposta inflamatória local. O macrófago, célula de defesa humana, captura a bactéria e a confina em um fagossomo, sendo que esse enclausuramento pode evoluir para se criar estruturas celulares mais complexas, chamada de granulomas. Nos granulomas atribui-se baixas concentrações de oxigênio, o que deve levar a bactéria a um estado dormente, podendo ficar por décadas despercebida.¹ Wayne desenvolveu um modelo *in vitro* para recriar esse estado, ao qual chamou de estado não replicativo persistente (NRP), dormente ou latente, que surge quando a bactéria é submetida a redução gradual de oxigênio. Nesta situação ele descreveu dois estágios dependendo da faixa de concentração de oxigênio, NRP-1 e NRP-2, cujas alterações morfológicas são bem distintas.² Uma série de observações experimentais sugerem que a hipoxia, redução das taxas de oxigênio, é um fator essencial na indução da persistência não replicativa dos bacilos da tuberculose, tanto pela fisiologia dos macrófagos quanto pela natureza das lesões de tuberculose no homem e nos animais. Os modelos *in vitro* reforçam esta conclusão e fornecem ideias sobre os mecanismos que tornam o NRP possível. Há evidências de modelos *in vitro* que as estratégias empregadas pelos bacilos para permitir a entrada em NRP, sob condições de hipoxia, incluem restrição da atividade biossintética para conservar energia, indução de vias de energia alternativa e estabilização de componentes essenciais de células para diminuir a necessidade de reparação ou substituição, consistente com a expectativa de sobrevivência longa em estado dormente.³

Um detalhe importante da *M. tuberculosis* é sua capacidade de explorar e manipular o tráfego de cátions metálicos dentro de macrófagos infectados, para garantir a sua sobrevivência e replicação dentro do fagossomo. Descobriu-se recentemente que o sistema imunológico dos mamíferos responde a infecções provocadas pelo *Mtb* sobrecarregando o fagossomo com íons cobre e zinco, dois

metais que são nutrientes essenciais em pequenas quantidades, mas que são tóxicos em excesso⁴. A resposta do hospedeiro às infecções combina esta estratégia de envenenamento com mecanismos de imunidade nutricional que privam o patógeno de metais como ferro e manganês para prevenir a replicação bacteriana. Por outro lado, o *M. tuberculosis* desenvolveu mecanismos de resistência multifacetada para se proteger da toxicidade de metais, incluindo o controle da captação daqueles metais essenciais, sequestro dentro da célula, oxidação e efluxo.⁵

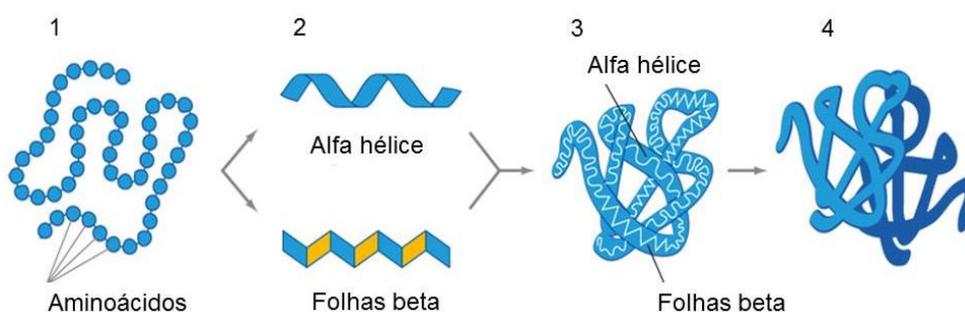
A Organização Mundial da Saúde (OMS) publica anualmente um relatório global da TB desde 1997 com o objetivo de fornecer uma avaliação atualizada da epidemia da tuberculose e do progresso na prevenção, diagnóstico e tratamento, a nível global, regional e nacional. Segundo a organização, a tuberculose está entre as dez principais causas de morte em todo o mundo. O relatório produzido em 2017 estimou um total de 10,4 milhões de pessoas doentes com TB e 1,7 milhões de mortes pela doença em 2016. Estima-se ainda que 53 milhões de vidas foram salvas através do diagnóstico e tratamento da tuberculose entre 2000 e 2016.⁶ O alarmante número de cepas multirresistentes e extensivamente resistentes tem sido uma preocupação adicional ao lado do número limitado de fármacos. O relatório também comenta que apesar de alguns progressos para novos diagnósticos, medicamentos e vacinas, a pesquisa e o desenvolvimento permanecem gravemente subfinanciados. Não menos preocupante, há dados indicando que cerca de um quarto da população mundial tem TB latente, o que significa que as pessoas foram infectadas por bactérias da TB, mas não estão (ainda) doentes e não podem transmiti-la. Entretanto, isso torna o micro-organismo de difícil eliminação seja pelo sistema imunológico ou por fármacos, inclusive deixando bastante longo o tempo de tratamento e dificultando qualquer perspectiva futura de erradicação da doença.⁷

1.2 Sistemas proteicos de sinalização bacteriana

As proteínas assumem uma estrutura espacial ótima para o desempenho de suas funções no organismo. A sequência de aminoácidos corresponde à estrutura primária de uma proteína e é fundamental para alcançar sua estrutura tridimensional, podendo ainda pode fornecer informações sobre sua possível função, localização celular e evolução. Interações intermoleculares envolvendo ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas na cadeia polipeptídica

estabilizam a estrutura da macromolécula em conformações locais, geralmente as mais comuns sendo do tipo alfa hélice e folhas beta, formando sua estrutura secundária. Seguindo-se ao enovelamento proteico, forma-se a estrutura terciária, completando a estrutura tridimensional do polipeptídeo. Algumas proteínas podem ainda possuir estrutura quaternária, sendo formadas por subunidades tridimensionais idênticas ou diferentes associadas, por exemplo, a hemoglobina que combina duas subunidades alfa com duas betas, originando um tetrâmero ⁸ (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura geral de proteínas. 1 – estrutura primária (sequência de aminoácidos), 2 – estrutura secundária, alfa hélice e folhas beta, 3 – estrutura terciária, 4 – estrutura quaternária.



Fonte: Proteins. <http://eng.thesaurus.rusnano.com/wiki/article561>. Acessado em 05 de maio de 2017.

A estrutura proteica pode funcionar em módulos, chamados domínios, que são originados do enovelamento independente de estruturas terciárias que compõem a proteína, podendo ter funcionalidades diferentes entre si, mantendo-se estáveis ainda que eventualmente separados do restante da proteína. ⁸ Esses domínios podem ser diretamente relacionados com as atividades do polipeptídeo, como por exemplo, um domínio histidina quinase (HisKA + HATPas_C) que promove a autofosforilação de um resíduo de histidina usando ATP, cujo grupo fosforila pode ser transferido para uma proteína receptora final. Em certos sistemas, esse domínio enzimático pode ser controlado por outro domínio sinalizador, ou sensor, que geralmente promove uma alteração conformacional da macromolécula para alcançar esse tipo de controle. Esse tipo de função é encontrada em várias proteínas sensoras, mais particularmente em bactéria. ⁹

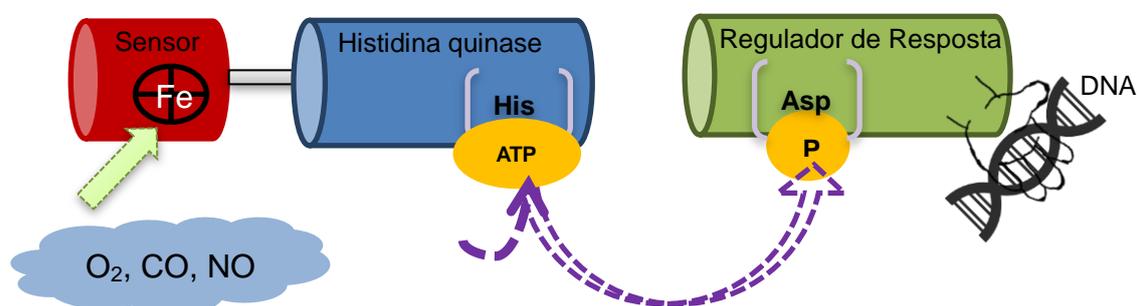
Surge desse tipo de sistema sensor a ideia de controle de resposta não diretamente no sítio de atividade enzimática, mas em local dedicado para essa regulação, que funciona como sensor e age fazendo uma transdução de sinal em que controla o sítio enzimático.

Recentemente, alguns estudos com proteínas sensoras relataram a possibilidade de controle do estado oligomérico, associado à estrutura quaternária da proteína, promovido pelo domínio sensor.^{10, 11} Burns *et al.* (2014), verificou que o estado oligomérico das proteínas *BpeGReg* e *PccGCS*, que apresentam atividade enzimática de diguanilato ciclase, afetam a taxa de dissociação de O₂ do domínio sensor. Adicionalmente, a ligação do O₂ nesse domínio provoca mudanças no estado de oligomerização de toda a proteína.¹² Esse não seria a única forma mecânica de controle provocada pelo sinal fisiológico, vários outros sistemas de heme proteínas sensoras vem indicando um mecanismo baseado em mudanças de interações inter-domínios, ex. guanilato ciclase solúvel (sGC) e FixL.

A sinalização molecular em bactérias ocorre, geralmente, empregando proteínas sinalizadoras através de sistemas de dois componentes. Esses sistemas reguladores são importantes mecanismos de sinalização que medeiam uma ampla gama de respostas aos estímulos do ambiente. Os dois componentes consistem em uma proteína sensora, a qual recebe um sinal, ativando-se e enviando uma sinalização para seu parceiro regulador de resposta, que, geralmente, é um fator de transcrição gênica que então ativado se liga a regiões específicas do DNA induzindo a expressão de genes necessários para adaptação bacteriana.

Assim, o primeiro componente deste sistema possui um domínio sensor que se liga a uma molécula alvo (sinal) e induz a uma resposta na forma de um processo de autofosforilação em um resíduo de histidina localizado em outro domínio da proteína. Este domínio histidina quinase por sua vez catalisa a transferência desse grupo fosforila do resíduo de histidina para um resíduo de aspartato em outra proteína, o segundo componente deste sistema, chamado de regulador de resposta. Ao ser fosforilado, esse regulador de resposta altera sua conformação e funciona, geralmente, induzindo alterações na expressão de genes para a adaptação do micro-organismo a mudanças no ambiente ⁸ (Figura 2).

Figura 2 - Esquema do funcionamento de um sistema de dois componentes. O sinal fisiológico é percebido pelo domínio sensor, ativando a atividade de histidina quinase, que por sua vez ativará o segundo componente, regulador de resposta, que então se ligará a uma sequência específica do DNA e induzirá a expressão gênica.



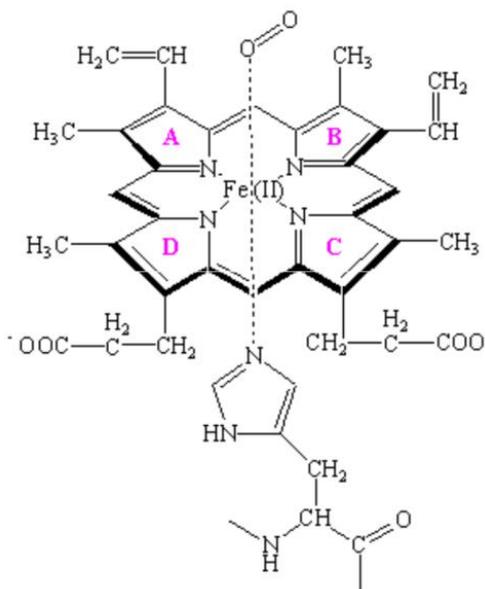
Fonte: Elaborada pela autora.

Para modular a transdução do sinal promovido por um ligante específico, muitas proteínas sensoras possuem, além de resíduos de aminoácidos específicos, uma parte não proteica, chamado de cofator ou grupo prostético. Este grupo é absolutamente necessário para a atividade de hemoproteínas sensoras.⁸ O complexo ferro-protoporfirina IX ou grupo heme, em sua forma mais abundante, heme b (Figura 3), é um dos cofatores mais importantes em sistemas biológicos devido a sua versatilidade e especificidade. O heme é composto por um ligante macrocíclico porfirina que na posição equatorial contem quatro anéis pirrólicos acoplados que se ligam pelo átomo de nitrogênio ao íon de ferro central, o qual, geralmente, pode apresentar o estado de oxidação +II ou +III. Na posição axial, o íon ferro está adicionalmente ligado a um resíduo de aminoácido proximal da cadeia protéica, e em vários casos, quando hexacoordenado, na posição distal, encontra-se reversivelmente associado a uma molécula do solvente ou gases como oxigênio, monóxido de carbono e óxido nítrico. Há ainda heme proteínas que podem ter outro resíduo de aminoácido da própria proteína como sexto ligante, como é o caso do citocromo c. As principais funções do grupo heme são de servir como sítio de ligação para gases, ex. o O₂, como na hemoglobina (transporte de O₂) e mioglobina (armazenamento de O₂), ou no transporte eletrônico ou de átomos, como o caso do citocromo c (transferência de elétrons na cadeia transportadora) e citocromo P450 (na incorporação de átomos de oxigênio em processos catalíticos oxidativos).¹³

Nas últimas décadas tem se estudado a capacidade moduladora do grupo heme na regulação de processos metabólicos, inclusive em processos relacionados

à patogenicidade de bactérias, tendo sido descoberto seu papel como sensor biológico, abrindo novos horizontes de pesquisa.¹⁴

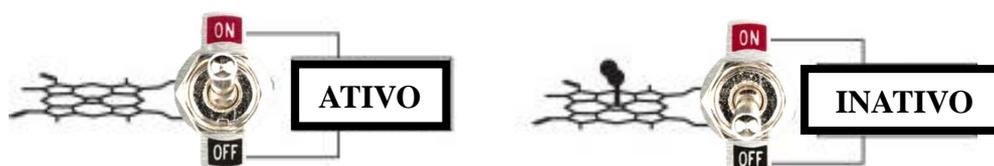
Figura 3 - Grupo Heme b, ferro II, ligado a um resíduo de histidina na proximal e ao oxigênio gasoso na região distal.



Fonte: The chemistry of hemoglobin and myoglobin. <http://chemed.chem.purdue.edu/genchem/topicreview/bp/1biochem/blood3.html> acessado em 08 de maio de 2017.

Em um sensor biológico que contém o grupo heme, este pertence ao domínio que atua na percepção e ligação direta à molécula sinalizadora. Inicialmente essas moléculas sinalizadoras se ligam ao centro metálico de ferro, provocando mudanças na conformação do complexo ferro-protoporfirina e ou em seus contatos com regiões da cadeia polipeptídica, que por sua vez transduz esse fenômeno iniciado pela molécula sinalizadora para o domínio funcional da proteína, promovendo ativação ou desativação de sua atividade. Este tipo de sistema funciona como uma ferramenta valiosa para que os micro-organismos percebam e se adaptem a alterações no ambiente.¹⁵ (Figura 4).

Figura 4 - Modulação do sinal em heme proteínas sensoras. A ligação do ligante ao grupo ferroprotoporfirina ativa ao inativa uma cascata de sinalização.



Fonte: Adaptado de Gonzalez (2008).

Em 1991, Gilles-Gonzalez descobriu a primeira heme proteína sensora de oxigênio, a proteína FixL da bactéria *Rhizobium meliloti*, a qual é responsável por orquestrar o processo de fixação de nitrogênio e manter respiração em concentrações microaeróbicas. Naquele momento foi demonstrado que o domínio que continha o grupo heme controlava a atividade enzimática de outro domínio, que apresentava a função de histidina quinase – catalisando a transferência de um grupo fosfato da ATP (adenosina trifosfato).¹⁶ A FixL é um protótipo de heme proteína sensora, fazendo também parte de um sistema de dois componentes, na qual o domínio heme sensor percebe o sinal e controla a atividade histidina quinase. Neste caso específico, quando o O₂ encontra-se ligado ao ferro do grupo heme a proteína torna-se inativa, todavia, a dissociação do oxigênio sob condições de anaerobiose, remove essa inibição, ativando a atividade histidina quinase e promovendo inicialmente a autofosforilação da FixL num resíduo de histidina, que posteriormente leva a transferência deste grupo fosfato para um resíduo aspartato no regulador de resposta, chamado de FixJ. Este regulador de resposta é na verdade um fator de transcrição gênica que após ser fosforilado pela FixL induz a expressão de genes envolvidos na respiração microaeróbica e fixação de nitrogênio.¹⁷

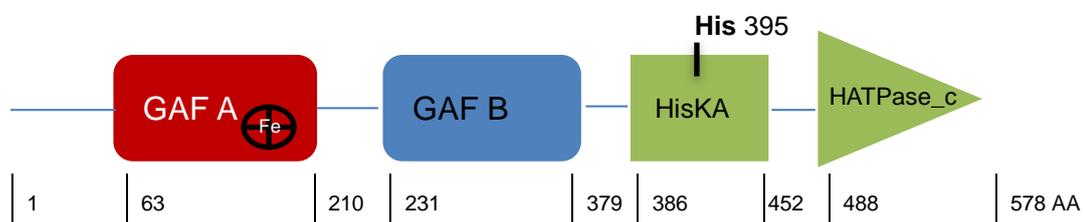
1.3 A heme proteína sensora DevS do *Mycobacterium tuberculosis*

Outro sistema de dois componentes com expressiva similaridade ao sistema FixL/FixJ foi encontrado na *Mycobacterium tuberculosis*, sendo composto pelas heme proteínas sensoras DevS e DosT e o regulador de resposta DevR. A proteína DevS foi originalmente assim batizada por ter sido identificada em estudos diferenciais com cepas virulentas e avirulentas da *Mtb*, o que do inglês surgiu a simbologia para “Differentially expressed in virulent strain Sensor”. Na literatura também é possível encontrar outra nomenclatura, como DosS originada de “Dormancy survival sensor”, que surgiu após a correlação deste sistema com a dormência observada nesta bactéria. Esse sistema tem um papel chave na adaptação desta bactéria a novos ambientes no organismo e na sua capacidade de entrar no estado não replicativo persistente (NRP) ou dormente da *Mtb*.¹⁸ Estudos genéticos apontaram para um grupo de proteínas responsáveis pela sinalização da entrada em latência da *Mtb*, sendo o fator de transcrição DevR, responsável pela expressão de cerca de 48 genes envolvidos na entrada em dormência da *Mtb*.¹⁹

O sensor DevS é composto por três domínios, dois domínios GAF, sendo

GAF A, no N-terminal, e onde se encontra o grupo heme, seguido por outro domínio GAF B, sem função definida, enquanto o outro domínio no C-terminal, formando por dois subdomínios (HisKA e ATPase_c), está envolvido na atividade enzimática de histidina quinase (Figura 5).²⁰ Atualmente, não se dispõe de estrutura cristalográfica para DevS na sua forma completa, bem como inexistem estudos sobre o estado de oligomerização desta proteína. Este sensor se trata de uma histidina quinase tal como FixL, que sob hipoxia, baixas concentrações de oxigênio, se autofosforila empregando ATP e transfere um grupo fosfato para seu parceiro regulador, o fator de transcrição gênica DevR, também chamado DosR, o qual promove a ativação de genes responsáveis pela entrada em latência da *Mtb*.

Figura 5 - Representação esquemática da estrutura e tamanho dos domínios da DevS, indicando a quantidade de resíduos de aminoácidos de cada subunidade e a posição aproximada do grupo heme e do resíduo fosforilável de histidina.



Fonte: Elaborada pela autora.

O domínio do sensor, GAF A, possui um grupo ferro-protoporfirina IX capaz de se ligar reversivelmente a O₂, CO e NO. De forma bastante seletiva, somente O₂ leva a inibição da atividade enzimática desta proteína, mesmo sendo CO e NO ligantes com maior afinidade, indicando assim ser um sensor seletivo para oxigênio.²¹

2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

As bactérias desenvolveram sistemas sofisticados para detectar e responder a mudanças em seu ambiente a fim de otimizar sua sobrevivência.¹² Uma classe de proteínas conhecida como heme proteínas sensoras, responsáveis por respostas adaptativas frente à variação de gases como O₂, NO e CO vem sendo estudadas.¹⁵ A proteína DevS é um sensor que em parceria com o fator de transcrição DevR, num sistema de dois componentes, regulam a expressão de genes responsáveis pela entrada em latência da *Mycobacterium tuberculosis*, tornando-a persistente. Essa expressão ocorre quando o grupo heme da DevS encontra-se em baixos níveis de oxigênio, de tal forma que o mesmo não esteja ligado ao O₂, sendo a proteína enzimaticamente ativa.²² O estudo desse sistema é importante para entender o processo de persistência da tuberculose em humanos, mas principalmente por contribuir para o entendimento de sistemas similares relacionados à adaptação em micro-organismos.

O objetivo geral deste trabalho é compreender alguns fenômenos relativos à heme proteínas sensoras, a partir do estudo da proteína DevS, quanto a estabilidade, afinidade a ligantes e mudanças conformacionais nos estados ativo e inativo. Para tal, pretende-se especificamente:

- Expressar e purificar a proteína recombinantes DevS em sua forma completa, preparando-a em estados enzimaticamente ativos e inativos;
- Verificar a estabilidade da proteína frente aos agentes desnaturantes ureia e cloridrato de guanidina por espectroscopia eletrônica no UV-Vis;
- Analisar as afinidades de cátions divalentes como Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ e Zn²⁺ por espectroscopia de fluorescência no estado estacionário, utilizando o marcador fluorescente Bis-ANS como sonda;
- Investigar a estrutura secundária da proteína determinando as porcentagens de alfa-hélice e folhas beta por espectroscopia de dicroísmo circular, bem como explorar a estrutura terciária no ambiente dos aminoácidos aromáticos e do cofator heme.
- Avaliar a organização da estrutura quaternária diante de mudanças no ligante heme, concentração de proteína e salinidade do meio por cromatografia de filtração em gel.

3 METODOLOGIA

3.1. Produção da proteína recombinante DevS

Nos procedimentos envolvendo soluções aquosas foi utilizada água ultrapurificada através de sistema de purificação MiliporeDirect Q® 3UV, resistividade > 18 MΩ.cm.

Os procedimentos que exigem condição estéril foram feitos nas proximidades da chama de um bico de Bunsen e utilizando-se reagentes e materiais esterilizados por aquecimento na temperatura de 121°C em autoclave ou estéreis por garantia do fabricante.

Nos procedimentos envolvendo crescimento celular empregou-se acompanhamento por meio da densidade ótica a 600 nm usando o espectrofotômetro Cary 5000 UV-Vis-NIR (Agilent, Australia).

3.1.1. Transformação de Células Competentes e Enriquecimento Celular

Todos os processos de manipulação bacteriana foram feitos em ambiente, materiais e solução estéreis.

Neste estudo empregou-se o plasmídeo pDevS31, contendo o gene completo da *devS* do *M. tuberculosis* clonado no plasmídeo pGGNKT (derivado do pUC19), sob controle do promotor *tac*, contendo gene de resistência a ampicilina para seleção em *Escherichia coli* (*E. Coli*), tal como descrito na literatura por Sousa *et al.* (2007).

As células de *E. coli*, cepa MC1061, foram crescidas em 50mL de LB (Miller) (FISHER SCIENTIFIC), a 225 rpm e 37°C, até atingir densidade ótica a 600 nm, OD₆₀₀, de cerca de 0,5, partindo-se de um pré-inóculo previamente preparado sob crescimento *overnight*. Em seguida, as células foram centrifugadas a 4 °C (Novatecnica, NT 810) e 5000 rpm por 10 min a 4°C, descartado o sobrenadante e ressuspendido o *pellet* em 15 mL de tampão de transformação (50 mM CaCl₂ em 10 mM Tris-HCl pH 7.0 estéril), o qual foi mantido em gelo por 15 min, sendo posteriormente repetido o procedimento de centrifugação e descartado novamente o sobrenadante. A seguir as células foram ressuspendidas em 4mL de tampão de transformação e armazenadas em gelo. Este processo tornou as células competentes para a inserção do plasmídeo pDevS31. Na etapa de transformação, 2 µL da solução contendo o plasmídeo foram misturados gentilmente com 198 µL de

solução contendo células competentes de *E. coli* MC1061, sendo mantidas em gelo por 30 min. A mistura foi aquecida em banho de água a exatamente 42 °C e por exatamente 2 min, sendo em seguida imediatamente resfriada em gelo. Adicionou-se 800 µL do meio de cultura LB (na temperatura ambiente ~ 26°C) e incubou-se a 37°C, com agitação no Shaker (~225 rpm), por 1h. Após esse período, centrifugou-se a mistura por 2500 rpm; descartou-se o sobrenadante, e as células foram gentilmente ressuspendidas com 100 µL LB contendo 100 µg mL⁻¹ (1X) de ampicilina sódica (SIGMA®). Para finalizar a transformação foram utilizados 10 e 100 µL deste crescimento bacteriano para plaquear em meio de cultura sólido LB Agar (MO BIOinc.), contendo ampicilina na concentração de 100 µg mL⁻¹. Posteriormente, as placas de Petri foram incubadas por cerca de 16 horas, a 37°C, em estufa para cultura e bacteriologia (ETHIK TECHNOLOGY).

O enriquecimento celular partiu de uma colônia de bactéria isolada da placa de Petri e feito procedimento de *restreak* em nova placa contendo ampicilina. Esta placa foi mantida novamente por cerca de 16h a 37°C e uma colônia isolada removida com alça de inoculação e transferida para 5 mL de meio de cultura líquido contendo ampicilina na concentração de 100 µg mL⁻¹. Ao passar cerca de 16 horas sob agitação e a 37°C em *shaker* orbital, foram utilizados 5µL desse crescimento para inocular 50 mL de novo meio de cultura contendo ampicilina na concentração de 400 µg mL⁻¹ (AMP 4X). Logo após, foram feitos 5 crescimentos seguidos, utilizando sempre 5µL de crescimento anterior para inocular 50 mL de meio de cultura fresco com ampicilina (AMP 4X). Cada crescimento demorava cerca de 8 horas, cuja densidade ótica a 600 nm encontrava-se aproximadamente 0,1. Depois do quinto crescimento, centrifugou-se o meio de cultura à 5000 rpm por 15 minutos em centrífuga (Hettich EBA 3S), descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* celular em LB juntamente com 15% glicerol, após, aliquotou-se e armazenou-se as células transformadas à -84°C.

3.1.2. Expressão

O crescimento das bactérias foi realizado em *shaker*, sob agitação constante e controle de temperatura. Partindo-se de um pré-inóculo (a 5mL de meio de cultura LB contendo 100 µg mL⁻¹ de ampicilina, mergulhou-se uma alça de platina estéril contendo células transformadas e seguiu-se 16 h de agitação a 200 rpm, 37°C). Seguiu-se o crescimento das células em 4 erlenmeyers de 2L contendo cada

um 1L de LB estéril com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina, adicionando-se 1mL do pré-inóculo, mantendo-se agitação a 200 rpm e temperatura a 37°C até as células atingirem uma densidade ótica a 600 nm, $\text{OD}_{600\text{nm}}$, em torno de 0,7. Em seguida baixou-se a temperatura para 30°C , mantendo-se a agitação a 200 rpm, seguindo-se a expressão da proteína de interesse por 24h. Após permanecerem 30 minutos sob gelo, as células foram centrifugadas em tubos de falcon de 50 mL, a 3500 rpm por 15 min a 4°C , o sobrenadante foi descartado e os *pellets* imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -84°C .

3.1.3. Purificação

Para a purificação da proteína foram preparadas as seguintes soluções:

- 2 mol L^{-1} NaCl (SERVA);
- $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ KCl (AMRESCO®);
- 1 mol L^{-1} Tris-HCl - Hidrocloro de Trisaminometano (SIGMA®) pH 8,0
- $0,175 \text{ mol L}^{-1}$ EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico, (REAGEN);
- 4 mol L^{-1} NH_4SO_4 (SERVA), 10mM Tris pH 8,0, 1mM EDTA;
- 2 mol L^{-1} NaOH (CROMOLINE®);
- 10% Etilenoglicol (EMSURE®)
- 2-mercaptoetanol, min 98% (SIGMA®);
- Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (AMRESCO®);
- Lisozima de ovo branco de galinha (SIGMA®);
- Fenil Sepharose™ 6 fast flow (high sub) (GE HEALTHCARE);
- DEAE Sepharose™ fast flow;

O *pellet* celular congelado foi ressuspensão em tampão de lise: 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 8; 137 mmol L^{-1} NaCl; 5 mmol L^{-1} KCl; 5% Glicerol; 1 mmol L^{-1} Ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico (EDTA); 10 mmol L^{-1} 2-mercaptoetanol; $0,17 \text{ mg L}^{-1}$ fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ lisozima, na proporção de 5 mL para cada 2 gramas de *pellet*, à temperatura ambiente. Após total ressuspensão, a mistura foi sonicada, sob agitação suave a 4°C , com sonicador de sonda Vibracell™ SONICS (U.S.A.) durante 1 hora em 40% da amplitude máxima com ciclos alternados de 20 segundos de pulso e 60 segundos em repouso, sendo a temperatura checada periodicamente evitando que ultrapassasse 10°C . O material sonicado foi centrifugado a cerca de 19000 rpm, aproximadamente $40.000 \times g$,

durante 40 minutos, a 4 °C, em centrífuga 3-30K SIGMA® (Alemanha). O sobrenadante de coloração vermelha foi reservado para a precipitação com sulfato de amônio e o *pellet* remanescente foi descartado.

3.1.3.1. *Precipitação da fração protéica contendo DevS*

Ao sobrenadante citosólico coletado foi adicionado solução saturada de sulfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (4 mol L^{-1}) até alcançar 40% da concentração de saturação, provocando a precipitação. Logo após a precipitação a mistura foi centrifugada por volta de $40.000 \times g$ durante 40 minutos, a 4 °C, sendo então descartado o sobrenadante e o precipitado congelado a -84 °C para posteriores etapas de purificação.

3.1.3.2. *Coluna Fenil-sepharose*

Todas as etapas da purificação posteriores à precipitação com sulfato de amônio foram feitas a 4 °C, em refrigerador panorâmico.

O precipitado de sulfato de amônio foi ressuspenso em tampão 10 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 8,0 totalizando um volume de 100 mL para aproximadamente 15 gramas de precipitado, originando uma mistura avermelhada e translúcida. Essa mistura foi centrifugada a cerca de $40.000 \times g$ durante 15 minutos, sendo o precipitado remanescente descartado, enquanto a fração solúvel foi aplicada na coluna de fenil sefarose (fenil-Sepharose™, $d= 2,8 \text{ cm}$; $h=15 \text{ cm}$), previamente equilibrada com 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ da solução saturada (concentração = $0,4 \text{ mol L}^{-1}$). Após a proteína interagir totalmente com a coluna foram realizadas lavagens com 4 volumes de coluna de 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$) e 6 volumes de coluna de 5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$), e em seguida feita eluição com Tris-HCl 10 mmol L^{-1} pH 8.

Espectros eletrônicos no UV-Vis foram medidos com as frações eluídas da coluna, sendo checadas as razões entre os máximos em 280 nm e 414 nm a fim de estimar a pureza de cada fração. Isso é possível devido ao fato da proteína que se deseja obter pura possuir grupo heme; logo, apresenta banda *Soret*. As frações com razão Rz inferiores a 1,1 foram combinadas numa única fração, enquanto as demais foram descartadas. A fração combinada foi dialisada em membrana de diálise contra 3L de tampão 10 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 8,0 durante 16 horas para retirada de sais remanescentes.

3.1.3.3. Coluna de Troca Aniônica (DEAE)

A coluna DEAE Sepharose® (fast-flow, d=3,2 cm; h=14 cm) foi equilibrada com tampão 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 8,0. A mostra dialisada foi injetada na coluna, e após sua interação com a resina foi iniciado etapas de lavagem em passos de eluição isocrática usando 0 a 250 mmol L⁻¹ de NaCl em 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 8,0, cuja concentração máxima promoveu a eluição da proteína de interesse. Durante as etapas de lavagem e eluição foram mantidos o fluxo de 2,0 mL min⁻¹; tendo sido efetuados 5 etapas isocráticas a 0, 125, 150, 200 e 250 mmol L⁻¹ de NaCl. O fluxo e as concentrações das etapas isocráticas foram controladas por um cromatógrafo de baixa pressão FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) BIO-RAD (USA). A eluição da proteína foi acompanhada por meio de cromatograma gerado pelo FPLC monitorando absorvância em 280 nm. Espectros eletrônicos UV-VIS foram obtidos para as frações eluídas e analisadas as razões Abs_{280nm}/Abs_{414nm} (Rz) tal como anteriormente descrito. As frações foram combinadas formando uma única com Rz de 0,52.

3.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Para conferir a pureza final da amostra de proteína foi realizado eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), sendo utilizado gel de 10%, acrilamida/bis-acrilamida, 30:0,8 (SIGMA®). A descrição dos géis utilizados na eletroforese está descrita na tabela 1, na qual utiliza gel de alinhamento (stacking gel) e gel de separação (resolving gel).

Para a preparação do gel, utilizou-se um suporte de montagem de gel de acrilamida BIO-RAD, placas com 1,0 mm de espaçamento, uma cuba de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® Tetra System BIO-RAD e fonte para eletroforese FB300 FISHER SCIENTIFIC. O tampão de amostra foi preparado com os seguintes reagentes: 0,125 mol L⁻¹ Tris-HCl pH 6,8; 4% Dodecil sulfato de sódio (SDS); 700 mmol L⁻¹ 2-mercaptoetanol; 10% glicerol e 0,2 mg mL⁻¹ azul de bromofenol.

Tabela 1 – Composição do gel de poliacrilamida.

Composição dos géis	Volume (μL)	
	Stacking gel	Resolving gel
Resolution gel buffer (0,375mol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8,8)	---	750
Stacking gel buffer (0,125mol L⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8)	450	---
Acrilamida/Bis-acrilamida, 30:0,8	300	1670
10% Dodecil sulfato de sódio (SDS)	18	50
H₂O	1020	2490
10% Persulfato de amônio	13,5	38
TEMED (tetrametiletilenodiamina)	2	2,5

Fonte: Elaborada pela autora.

Em seguida adicionou-se 7 μL do tampão descrito acima na amostra de proteína, aqueceu-a em banho-maria a 100 °C durante 3 minutos. Utilizou-se o marcador molecular de referência *Protein Ladder* (New England BioLabs), o qual contém 12 proteínas com massa molecular entre 10 e 250 kDa. Após corrida eletroforética, posteriormente corou-se o gel por 40 minutos com uma solução corante preparada com 45% metanol (v/v); 7,5 % ácido acético glacial (v/v) e 5 g L⁻¹ azul de *Coomassie*. Em seguida utilizou-se uma solução descorante composta por 45% metanol (v/v) e 7,5% ácido acético glacial (v/v) por 24h sob leve agitação.

3.3. Preparo das Formas Ativas e Inativas da Proteína DevS

Para verificar as formas ativa e inativas da proteína DevS, foram capturados espectros eletrônicos na região do ultravioleta e visível utilizando o espectrofotômetro Cary 5000 UV-Vis-NIR (Agilent, Australia) em tampão Tris HCl 10 mM pH 8, acompanhando principalmente o perfil da banda solet e das bandas Q's (α e β).

Os estados inativos foram obtidos da seguinte maneira: DevS oxi, Fe^{II} ligada a oxigênio molecular, foi obtida ao final da purificação da proteína; DevS férrica, Fe^{III} ligada a água, foi obtida com a incubação de 20 min em ferricianeto de potássio, K₃Fe(CN)₆ (SIGMA®), 4x em excesso estequiométrico.

Os estados ativos foram obtidos como se segue: DevS deoxi, Fe^{II} pentacoordenado, foi conseguido em câmara anaeróbica (*COY laboratory*) adicionando ditionito de sódio, Na₂S₂O₄ (SIGMA®) 4x em excesso estequiométrico, em tampão previamente deaerado com argônio por 24h; a DevS carboxi, Fe^{II} ligado a CO foi conseguida com a diluição da proteína em tampão saturado com monóxido de carbono. Para as formas deoxi e carboxi as amostras de proteína foram seladas para evitar a ligação ou competição com o oxigênio atmosférico.

3.4. Dicroísmo Circular

Utilizou-se espectrofotômetro J-815 CD JASCO (Japão) para realizar as medidas de dicroísmo circular. O tampão utilizado para todas as medidas foi Tris 10 mmol L⁻¹ pH 8. Para a região do ultravioleta distante (far-UV) acompanhou-se os espectros na faixa de comprimento de onda de 190 a 240 nm, utilizou-se cubeta de quartzo com caminho ótico de 0,1 cm. Para a região do ultravioleta próximo (near-UV) e do visível foram adquiridos espectros nas faixas de 255 a 340 nm e de 300 a 500 nm, bem como utilizou-se cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm. As medidas na região do far-UV foram obtidas nas seguintes condições experimentais otimizadas *data pitch* de 0,5 nm; D.I.T. de 1 segundo; bandwidth de 1 nm; velocidade de varredura de 50 nm min⁻¹; 3 acumulações. Para as medidas nas regiões do near-UV e do visível utilizaram-se as mesmas condições experimentais otimizadas anteriores, diferindo apenas no número de acumulações, 10 acumulações de espectros. Todas as medidas foram feitas a 25 °C. Para as formas deoxi-DevS e met-DevS foi utilizada uma mini coluna cromatográfica, HiTrap® *Desalting Columns* GE Healthcare, equilibrada em Tris 10 mM pH 8, para remoção do ditionito e do ferricianeto, respectivamente. As concentrações de proteína otimizadas para os experimentos estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 – Concentrações de proteína utilizadas nas diferentes faixas de varredura do espectro de dicroísmo circular.

Forma	Far-UV, μM	Near-UV, μM	Visível, μM
Oxi	1,5	30	15
Férrica	1,5	30	15
Deoxi	1,25	30	15
Carboxi	1,25	15	7,5

Fonte: elaborada pela autora.

3.5. Desnaturação por Ureia e Cloridrato de Guanidina

Empregou-se o espectrofotômetro Hewlett-Packard, modelo 8453 Diode-Array, para realizar medidas de espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis. Acompanhou-se o espectro eletrônico na faixa de 200 a 700 nm durante 7h após adição de agente desnaturante em várias concentrações, 0 a 7,5 mol L⁻¹ para a ureia e 0 a 6,5 mol L⁻¹ para a guanidina em 4 µM de proteína DevS na forma ligada a oxigênio e a monóxido de carbono em tampão Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8. A DevS carboxi foi obtida pela diluição da proteína no tampão saturado com CO mantendo-se a cubeta vedada durante o tempo de experimento. Os ensaios foram realizados a temperatura ambiente utilizando-se cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico.

3.6. Espectroscopia de Fluorescência

Utilizou-se o espectrofotômetro de fluorescência PTI Quanta-Master QM-40 para realizar as medidas de fluorescência no estado estacionário em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico, fenda utilizada de 0,5 mm, 1 µM de proteína DevS nas formas oxi e carboxi. A DevS carboxi foi obtida pela diluição da proteína no tampão saturado com CO mantendo-se a cubeta vedada com um septo de borracha durante o experimento para permitir a adição de substâncias com uso de seringa. Para os ensaios de fluorescência intrínseca, utilizou-se o comprimento de onda de excitação de 280 nm e 295 nm e a faixa de emissão em 290 nm/305 nm a 420 nm em tampão Tris 10 mM pH 8,0. Nos experimentos utilizando o marcador fluorescente extrínseco Bis-ANS (4,4'-Dianilino-1,1'-binaftil-5,5'-ácido disulfônico), a excitação deu-se em 350 nm e a faixa de emissão entre 360 nm e 600 nm. Verificaram-se possíveis alterações de afinidade entre a proteína e o Bis-ANS com adições sucessivas de 1 µM do marcador fluorescente até a saturação às formas ativa e inativa da proteína em Tris-HCl 10 mM pH 8 e Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM pH 8, e ainda com a adição de 0,5 mM de Mg²⁺ e 100 µM de ATP. Averiguou-se também a afinidade de cátions divalentes como Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ e Zn²⁺ a oxi e carboxi-DevS em Tris-HCl 10 mM pH 8 utilizando 12 µM de Bis-ANS como sonda, adicionando, gradativamente, soluções de cloreto dos metais até a saturação do sinal. Tendo sido inclusive verificada a interferência da adição de íons nesta afinidade aos metais titulando-se a proteína com NaCl.

3.7. Filtração em Gel Analítica

Os estados oligoméricos da DevS foram detectados através de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) usando uma coluna TSKgel GFC-300 (7,8 mm x 150 mm, TOSOH) acoplada a uma HPLC usando um detector de arranjo de diodo. A fase móvel usada para todos os experimentos consistiu de um tampão Tris-HCl 50 mM a pH 7,4 contendo cloreto de sódio 50 mM, a não ser que seja indicado diferentemente. Os espectros eletrônicos foram coletados para cada pico durante a corrida de filtração em gel, permitindo-nos confirmar o estado do grupo heme, se ligado ao oxigênio (oxi-DevS), monóxido de carbono (carboxi-DevS) ou reduzido em condições anaeróbicas (deoxi-DevS) ou oxidado (met-DevS). Esta proteína foi originalmente isolada e armazenada no estado DevS reduzido ligada a O₂. A forma férrica de DevS (met) foi obtida por incubação da amostra de proteínas por 20 minutos com um pequeno excesso de ferricianeto de sódio, logo antes das injeções. Seguimos o procedimento conforme relatado em Burns *et al.* (2016), com pequenas mudanças para preparar proteína DevS anaeróbica, deoxi-DevS. Resumidamente, a fase móvel foi desaerada com argônio em uma câmara anaeróbica (*COY laboratory*) por pelo menos 24h para garantir que todo O₂ foi completamente removido. Ditionito de sódio a 1 mM foi adicionado na fase móvel desaerada. Uma vez que fase móvel desaerada foi removida da câmara e instalada no HPLC, manteve-se uma pressão de argônio positiva para minimizar qualquer difusão de O₂ no mesmo. Em seguida, a coluna de filtração em gel foi equilibrada com essa fase móvel. O *loop* da amostra também foi rapidamente desoxigenado por injeção de tampão anaeróbio contendo 500 µM de ditionito. Adicionalmente, o oxigênio foi removido da amostra de proteína preparando-se na fase móvel contendo 500 µM de ditionito dentro da câmara anaeróbica. O tubo contendo a proteína foi selado com um septo e removido da câmara imediatamente antes de ser injetado no HPLC. Tentamos minimizar tanto quanto possível o tempo entre a adição de ditionito à amostra de proteína e a sua injeção no HPLC. A forma ligada ao CO foi obtida por um suave borbulhamento de monóxido de carbono à proteína previamente reduzida na câmara anaeróbia.

Acompanharam-se possíveis variações entre os estados oligoméricos de oxi- e met-DevS injetando-se a mesma amostra nos tempos de 10, 30, 60, 120 e 240 min. As possíveis mudanças nos estados oligoméricos de DevS causados pelo

aumento da salinidade foram também investigadas. A salinidade foi aumentada de 0, 50, 100, 150 e 200 mM de NaCl, sendo incluído essas quantidades no tampão de corrida, bem como na mistura de proteínas. Em todos estes casos, investigamos as amostras de proteínas nos estados ativos e inativos, tendo esses componentes adicionados à proteína e também pré-equilibrando a coluna.

Os estados oligoméricos de oxi-DevS (dímero, tetrâmero e octâmero) foram isolados em cada pico usando a cromatografia analítica de filtração em gel. Cada uma dessas espécies foi reintroduzida após 10, 30, 60, 120 e 240 min após o seu isolamento.

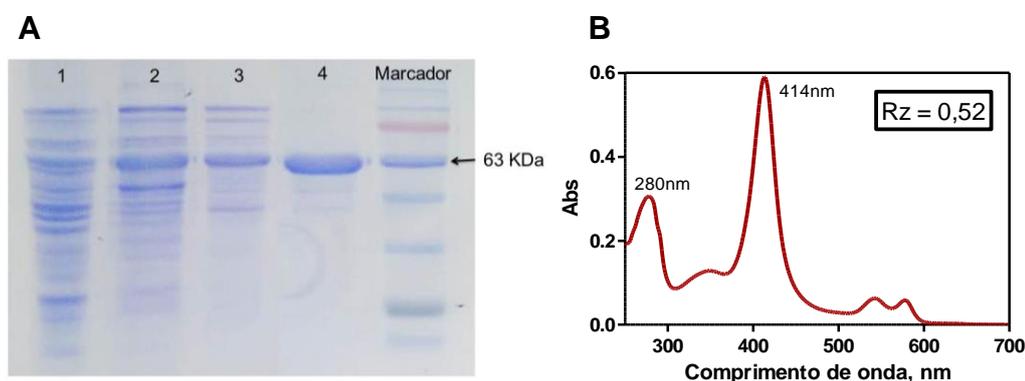
As proteínas globulares (Sigma-Aldrich) consistindo em tireoglobulina (669 kDa), ferritina (443 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), ovalbumina (44 kDa) e mioglobina (17 kDa) foram utilizadas como padrões de peso molecular para a obtenção da curva de calibração da filtração em gel. O tempo de retenção em relação ao log de peso molecular proporcionou uma curva linear, cujo ajuste de regressão (R^2) foi pelo menos de 0,98.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da proteína DevS

Verificamos a eficácia das etapas de purificação empregando eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, Figura 6A, bem como a integridade da proteína purificada devido a correspondência da massa molecular com a esperada para a proteína DevS, a qual é descrita na literatura (62,24 KDa).¹⁸

Figura 6 – A: Perfil da purificação da proteína DevS, empregando-se SDS-PAGE 10%. 1 – Fração Solúvel (citosol), 2 – Precipitado com 40% SAS, 3 – Fenil-sepharose, 4 – DEAE-Sepharose. B: Espectro eletrônico da proteína purificada DevS na sua forma ligada ao oxigênio molecular.



Fonte: Elaborado pela autora.

A proteína DevS foi obtida na última etapa de purificação na forma oxi (ligada ao oxigênio molecular) e teve uma razão de pureza (A_{280nm}/A_{414nm}), correspondente a razão de absorvância das bandas no Ultravioleta/Soret de 0,52, Figura 1B. Perfil bastante similar ao espectro eletrônico descrito para DevS, anteriormente relatado por SOUSA *et al.* (2007). A razão (Rz – do alemão *Reinheitszahl*, significa índice de pureza) relaciona a concentração de proteínas totais em relação à concentração de hemoproteínas, no trabalho anteriormente citado o Rz obtido para a proteína DosT, uma heme proteína similar a DevS, foi de 0,6, desta forma o valor da razão obtido para a DevS indica um grau de pureza bastante elevado para a heme proteína. Esse resultado em conjunto com o gel desnaturante ilustram a pureza e integridade da proteína empregada neste trabalho.

4.2. Obtenção das formas ativas e inativas da DevS

Após eluição da proteína da coluna cromatográfica DEAE, a mesma encontrava-se na sua forma reduzida, Fe^{II} , hexacoordenada, ligada ao oxigênio molecular, cuja forma é enzimaticamente inativa, bem como sua forma met, Fe^{III} ligada a uma molécula de água, obtida pela incubação da proteína purificada com ferricianeto de potássio em excesso. Todavia, com a diluição da proteína em tampão previamente desaerado com argônio, a DevS foi obtida na forma deoxi, Fe^{II} , pentacoordenada, e, após a saturação do tampão com CO, obtivemos a sua forma $\text{Fe}^{\text{II}} - \text{CO}$ ou carboxi, ambas enzimaticamente ativas. Essas mudanças de ligante podem ser evidenciadas pelos diferentes perfis espectroscópicos, conforme se pode comparar no deslocamento da banda *Soret* de 414 nm (oxi) para 406 nm (met), 422 nm (carboxi) e 430 nm (deoxi), Figura 7 e Tabela 3, cujos máximos de absorção foram descritos por Sousa *et al.* (2007).

Figura 7 – Espectro eletrônico na região do UV-Vis para a proteína DevS nas formas ativas e inativas. A - Fe^{II} ligada a oxigênio, B - Fe^{III} ligada a água, C - Fe^{II} sem ligante distal e D - Fe^{II} ligado a monóxido de carbono.

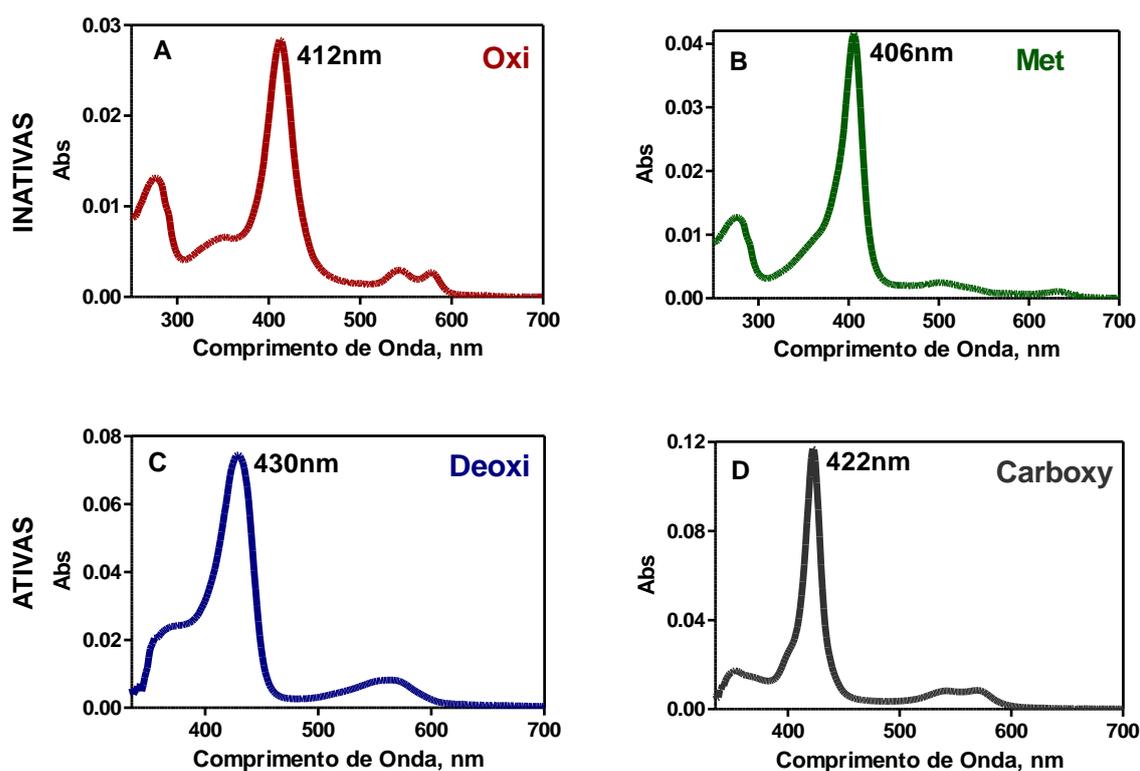


Tabela 3 – Bandas com máximos de absorção da proteína DevS nos estados ferroso e férrico em tampão Tris HCl 10 mM pH 8.

	Soret, nm	ϵ, L.mol⁻¹.cm⁻¹	β, nm	α, nm
Fe^{II} – O₂	414	135000	542	578
Fe^{III} – H₂O	406	124000	500	630
Fe^{II} – CO	422	193000	540	567
Fe^{II}	430	123000	560	

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3. Desnaturação por agentes caotrópicos – Ureia e Cloridrato de Guanidina

Uma forma de se estudar a estabilidade termodinâmica de uma proteína em sua forma nativa (N) é através de perturbações que desloquem o equilíbrio para o estado desenovelado, ou *unfolded* (U), como por exemplo, com a adição de agentes caotrópicos como ureia e cloridrato de guanidina (GndHCl), bastante utilizados na literatura. Esse fenômeno pode ocorrer, geralmente, em 2 estados: (U \rightleftharpoons N), ou ainda, com a formação de intermediário (I), em 3 estados, (U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N). Durante o enovelamento de uma proteína ocorre a "competição" de dois fenômenos termodinâmicos: o primeiro se trata da entropia com alto valor negativo neste sistema, visto que a formação de uma estrutura globular compacta é altamente desfavorável em termos de entropia; o segundo, se trata da entalpia com alto valor negativo devido a formação de uma grande número de interações favoráveis como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e forças de Van Der Waals. Considerando uma desnaturação em 2 estados, o ponto de partida para analisar a energia livre é a equação 1:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln \frac{U}{N}$$

Equação 1

Sendo que: ΔG° é a energia livre padrão de Gibbs; R é a constante universal dos gases em J. K⁻¹.mol⁻¹; T é a temperatura em Kelvin; U é a fração da proteína desnaturada e N é a fração da proteína na forma nativa. Em termos de energia livre,

experimentalmente, pode-se encontrar uma relação linear entre o valor de ΔG° e a concentração do agente desnaturante, levando-nos ao $\Delta G^{(H_2O)}$ do *fold* (enovelamento) sob as condições nativas, onde a concentração do agente caotrópico é zero. Conforme a equação 2: ²³

$$\Delta G^\circ = \Delta G^{H_2O} - m[\text{desnaturante}]$$

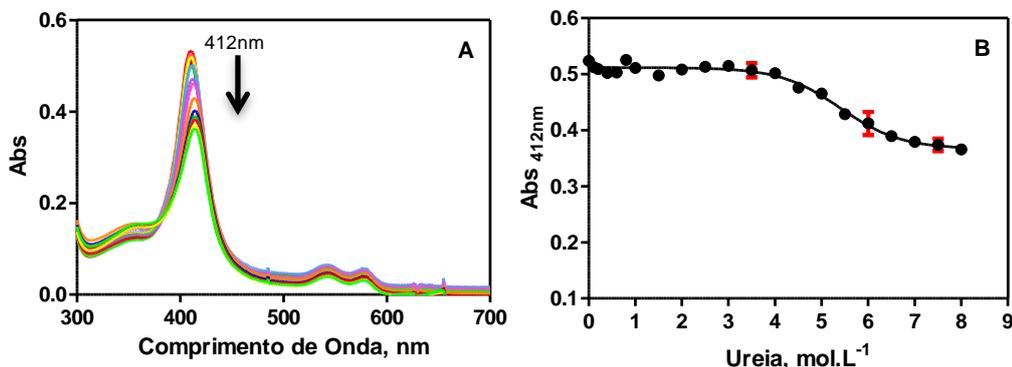
Equação 2

Sendo que m está relacionado à superfície de proteína exposta ao solvente no estado desenovelado (U).

O efeito desses agentes químicos na estrutura proteica pode ser analisado por técnicas espectroscópicas, como a absorção eletrônica no UV-vis, fluorescência e dicroísmo circular. No caso da espectroscopia eletrônica no UV-vis, estaremos basicamente investigando as transições eletrônicas que envolvem o grupo prostético da proteína (heme), o qual se encontra no primeiro domínio, GAF-A.

Para a DevS, em sua forma ligada ao oxigênio, temos o ferro(II) hexacoordenado e descrito como baixo spin, sendo observado uma significativa resistência a desnaturação na presença de ureia, mesmo em altas concentrações, 8 mol L⁻¹, não sendo observada desnaturação completa da proteína acompanhada no tempo por até 30 h. O perfil da curva de absorção mostra uma transição de desnaturação entre 4,5 mol L⁻¹ e 6,5 mol L⁻¹ de ureia (Figura 8). Resultado semelhante foi visto por Gadelha et. al. (2017) em seu trabalho com a proteína FixL híbrida, ReFixL, uma heme proteína sensora responsável pela fixação de nitrogênio em bactérias do gênero *Rhizobium*. Essa proteína quando na forma hexacoordenada, ligada ao cianeto (CN⁻), forma mimética ao oxigênio, apresentou uma variação da banda *Soret* entre 4 mol L⁻¹ e 6 mol L⁻¹ sendo mais resistente a desnaturação em relação a sua forma met, Fe^{III}, pentacoordenada, em que foi observado efeito significativo da ureia em concentrações entre 1,5 mol L⁻¹ e 3,5 mol L⁻¹. ²⁴

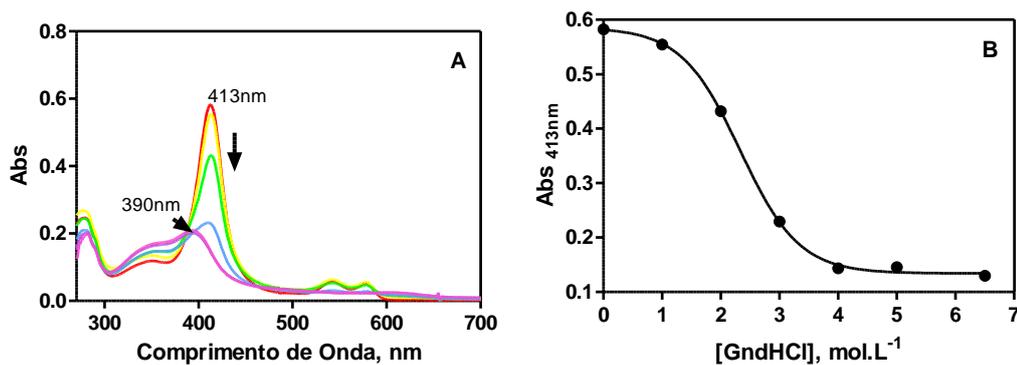
Figura 8 – Desnaturação química monitorada por espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis induzida por ureia, 0 a 8 mol L⁻¹ incubada por 8h. A – Espectro de absorção no UV-Vis para a forma oxí-DevS com a adição de ureia. B – Curva de máximo de absorção da banda Soret na presença de ureia, em triplicata, ajustados a equação de desnaturação em dois estados.



Os parâmetros de desnaturação encontrados para a DevS Fe^{II}-O₂ segundo um modelo de dois estados foram $\Delta G^{(H_2O)} = 20,6 \pm 2,4 \text{ kJ.mol}^{-1}$, o valor de $m = 3,8 \pm 0,4$, sendo a concentração que causa a metade da desnaturação da proteína, $[D]_{1/2} = 5,4 \text{ mol L}^{-1}$, Tabela 4.

Curiosamente, verificou-se que frente ao agente químico cloridrato de guanidina, GndHCl, a desnaturação total foi obtida, baseando-se no perfil espectral. O espectro eletrônico revela uma desnaturação completa da proteína com o deslocamento da banda Soret, em 413 nm para um máximo em 390 nm, além do desaparecimento das bandas Q (Figura 9).

Figura 9 – Desnaturação química de 4 μM da proteína DevS ligada a oxigênio monitorada por espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis induzida por cloridrato de guanidina na concentração de zero a 5 mol L⁻¹ incubada por cerca de 7h. A – Espectro de absorção no UV-vis para a adição de GndHCl a DevS oxí. B – Curva acompanhando os máximos de absorção da banda Soret na presença de GndHCl.



Não se sabe ao certo como acontece a interação entre a superfície da proteína e as moléculas dos agentes caotrópicos. Alguns estudos afirmam que as moléculas do desnaturante tem acesso aos grupos polares presentes na cadeia polipeptídica e rompem as suas ligações intermoleculares – ligações eletrostáticas e de hidrogênio – melhorando a solvatação da proteína.²⁵ A força iônica da solução media os efeitos eletrostáticos, e como o cloridrato de guanidina é um sal, isso pode interferir na desnaturação de proteínas. Um estudo sobre a desnaturação de proteínas pelos agentes desnaturantes ureia e GndHCl realizado em 1995 por Jeffrey K. Myers *et. al.* indicou que a GndHCl é duas vezes mais efetiva como agente desnaturante do que a ureia acompanhando 45 tipos diferentes de proteínas, inclusive heme proteínas, cujas estruturas cristalográficas já foram desvendadas.²⁶

A curva de desnaturação empregando GndHCl mostra uma transição de desnaturação nas concentrações 1,5 mol L⁻¹ e 3 mol L⁻¹ (Figura 9), revelando uma maior efetividade desse agente caotrópico em relação a ureia para desnaturar a DevS na forma oxi, conforme mostram os parâmetros de desnaturação para um modelo em dois estados frente a GndHCl com $\Delta G^{(H_2O)} = 11,5 \pm 0,7 \text{ kJ mol}^{-1}$, o valor de $m = 4,9 \pm 0,3$ e $[D]_{1/2} = 2,3 \text{ mol L}^{-1}$. Tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros de desnaturação por Ureia e GndHCl para oxi-DevS usando um modelo de desnaturação de dois estados monitorado por absorção eletrônica no UV-visível, na banda *Soret*.

	$\Delta G_{H_2O} (\text{kJ mol}^{-1})$	$m (\text{kJ mol}^{-1})$	$[D]_{1/2} (\text{mol L}^{-1})$
Ureia*	20,6 ± 2,4	3,8 ± 0,4	5,4
GndHCl	11,5 ± 0,7	4,9 ± 0,3	2,3

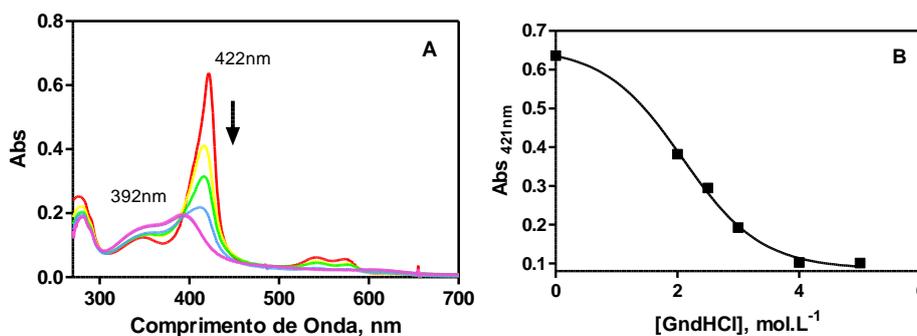
*desnaturação parcial

Fonte: Elaborada pela autora.

Analizou-se também a desnatura o da proteína, na forma carboxi, empregando GndHCl. Foi observada a diminui o da banda *Soret* em 422 nm, característica da DevS ligada a CO, entre 2 mol L⁻¹ e 4 mol L⁻¹ de GndHCl, com um perfil de desnatura o semelhante ao visto para a DevS na forma oxi no mesmo agente caotrópico. A desnatura o total   indicada pelo desaparecimento das bandas *Soret* e Q's e um surgimento de uma banda em cerca de 390 nm. Verificou-se um valor de $\Delta G^{(H_2O)}$ um pouco menor em rela o ao encontrado para a forma oxi da proteína no mesmo agente desnaturante, sugerindo uma estabilidade um pouco

menor para a carboxi-DevS do que para a forma oxi frente a GndHCl. $\Delta G^{(H_2O)} = 8,0 \pm 1,4 \text{ kJ mol}^{-1}$, o valor de $m = 3,8 \pm 0,6$ e $[D]_{1/2} = 2,1 \text{ mol L}^{-1}$, Figura 10. Uma possível causa para essa pequena mudança de estabilidade pode ser devido a uma alteração na rede de ligação de hidrogênio que estabiliza o ligante distal no *pocket* do heme.²⁷

Figura 10 - Desnaturação química de 4 μM da proteína DevS ligada a CO monitorada por espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis induzida por cloridrato de guanidina na concentração de zero a 5 mol L^{-1} incubada por 8h. A – Espectro de absorção. B – Curva acompanhando os máximos de absorção da banda *Soret*.



Para a proteína *CooA*, heme sensora de monóxido de carbono, no estado ferroso hexacoordenado ligada ao CO, observou-se processo de desnaturação frente a GndHCl somente a partir de uma concentração de 4 mol L^{-1} do agente desnaturante, apresentando um $\Delta G^{(H_2O)}$ de 29 kJ mol^{-1} .²⁸ Sugerindo uma menor estabilidade da DevS no mesmo agente desnaturante. No entanto, é importante relatar que este mesmo trabalho investigou a *CooA* no estado pentacoordenado, Fe^{III} , cuja transição de desnaturação frente a GndHCl ocorreu entre 3 mol L^{-1} e 4 mol L^{-1} , em concordância com o que foi visto por Gadelha *et al.* (2017) utilizando ureia e FixL. Estes resultados sugerem uma maior resistência à desnaturação do domínio que contém o grupo heme quando este se encontra hexacoordenado, tanto em GndHCl quanto em ureia, sendo importante verificar posteriormente essa tendência para a DevS no estado pentacoordenado.

4.4. Espectroscopia de Fluorescência da Proteína DevS

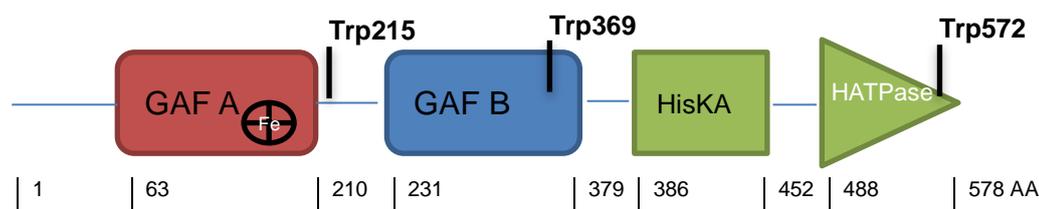
4.4.1. Fluorescência Intrínseca da Proteína DevS

A fluorescência é um processo fotoluminescente em que moléculas ou átomos absorvem radiação e, ao relaxarem ao estado fundamental, liberam seu excesso de energia como fótons em um curto intervalo de tempo (nanosegundo). Esse fenômeno ocorre tipicamente em moléculas ou grupos aromáticos que

possuem certa rigidez em sua estrutura, conhecidos como fluoróforos.²⁹ Em bioquímica, proteínas e cofatores enzimáticos possuem fluorescência intrínseca devido, primariamente, a presença dos aminoácidos aromáticos tirosina (Y), fenilalanina (F) e triptofano (W ou Trp), em especial este último.²³ Uma ferramenta valiosa da fluorescência intrínseca em proteínas é a alta sensibilidade dos triptofanos ao microambiente, causando mudanças no espectro de emissão em resposta a desnaturação, mudanças conformacionais, associação de subunidades ou ligação de um substrato a proteína. A fluorescência dos Trp pode ser observada através de excitação entre 295 nm – 305 nm. Neste trabalho selecionou-se a excitação em 295 nm em conformidade com o trabalho de diversos autores.³⁰

A proteína DevS possui três triptofanos (Trp): um próximo ao primeiro domínio, GAF-A, o segundo no domínio GAF-B e o terceiro no final do domínio enzimático, como podemos ver na figura 11.

Figura 11 - Representação esquemática da estrutura e tamanho dos domínios da DevS indicando a posição dos resíduos aromáticos de triptofanos.



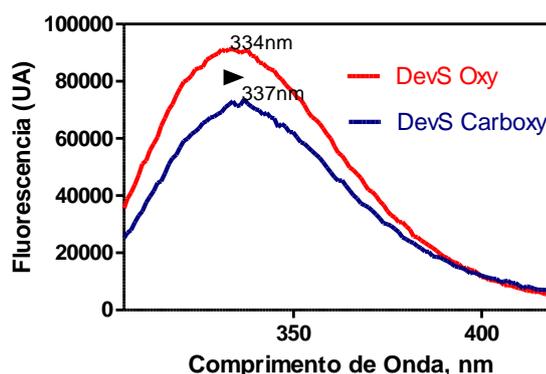
Fonte: elaborada pela autora.

O espectro de emissão dos triptofanos é fortemente dependente da polaridade do solvente ou do microambiente, a medida que os resíduos de Trp são expostos a água, sua emissão fluorescente desloca para maiores comprimentos de onda bem como menores intensidades de emissão são observada devido a maior supressão da água.³⁰ Um dos fatores que determina a emissão dos resíduos de triptofanos é a transferência de energia fluorescente ressonante, sendo um dos processos pelo qual a supressão de fluorescência de fluoróforo pode também ocorrer. A transferência de energia ocorre quando há sobreposição dos espectros de emissão da molécula doadora no estado excitado e o espectro de absorção da molécula receptora no estado fundamental. Para as hemoproteínas, os triptofanos próximos ao heme seriam caracterizados como os doadores, emissão na faixa de

305 nm-420 nm, e o grupo heme como o receptor, no caso, para a DevS, absorção em 414 nm na forma oxi e 422 nm na forma carboxi.³¹

Em nossos estudos foi observado um leve deslocamento do máximo de intensidade de fluorescência da proteína DevS de 334 nm, quando na forma oxi (DevS-O₂), para 337 nm, na forma carboxi (DevS-CO), sugerindo uma possível mudança estrutural na proteína entre o estado ativo e inativo, de modo que, quando ligada ao CO, os resíduos de W estão levemente mais expostos ao solvente, Figura 12. Adicionalmente, observa-se uma leve diminuição na intensidade da banda de emissão que reforça essa atribuição. Apesar de que a transferência de energia do triptofano para grupo heme ser bem descrita, e geralmente pode responder por redução na emissão de triptofanos próximos ao grupo heme, esse fenômeno não provoca alteração do máximo de emissão, o que supomos não estar envolvido aqui, visto que, quando ligada a CO, o máximo de absorção da proteína desloca-se para 422nm, implicando numa menor sobreposição para a transferência de energia.

Figura 12 – Espectro de emissão de fluorescência de 1 µM da proteína DevS nas formas oxi (vermelho) e carboxi (azul) em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8. Excitação: 295 nm. Emissão: 305-420 nm. Fendas de emissão e excitação 0,75 mm.



4.4.2. Estudos de Afinidade de Ligantes a Proteína DevS por Fluorescência

A fluorescência, em geral, é bem mais sensível a mudanças no ambiente que a absorbância, por isso é o método mais utilizado para estudar interações proteína-ligante.²³

A associação de ligantes a proteínas pode ser descrita quantitativamente empregando-se equações de equilíbrio químico. De maneira geral a ligação de uma proteína (P) a um ligante (L), pode ser descrito conforme a expressão de equilíbrio:



Em bioquímica esse equilíbrio geralmente é apresentado invertido, de forma que se descreve comumente como um K_d , constante de dissociação, ao invés da K_a , constante de afinidade. Desta forma, a expressão da constante de equilíbrio para a liberação do ligante define-se como:

$$Kd = \frac{[P] \cdot [L]}{[PL]}$$

Equação 3

Essa forma de descrição se torna útil, pois quando metade dos sítios estão ocupados, a concentração de ligante L, [L], será igual ao valor de K_d , assim, a constante de dissociação corresponde a concentração molar do ligante em que metade dos sítios de ligação do ligante disponíveis na proteína estão ocupados.

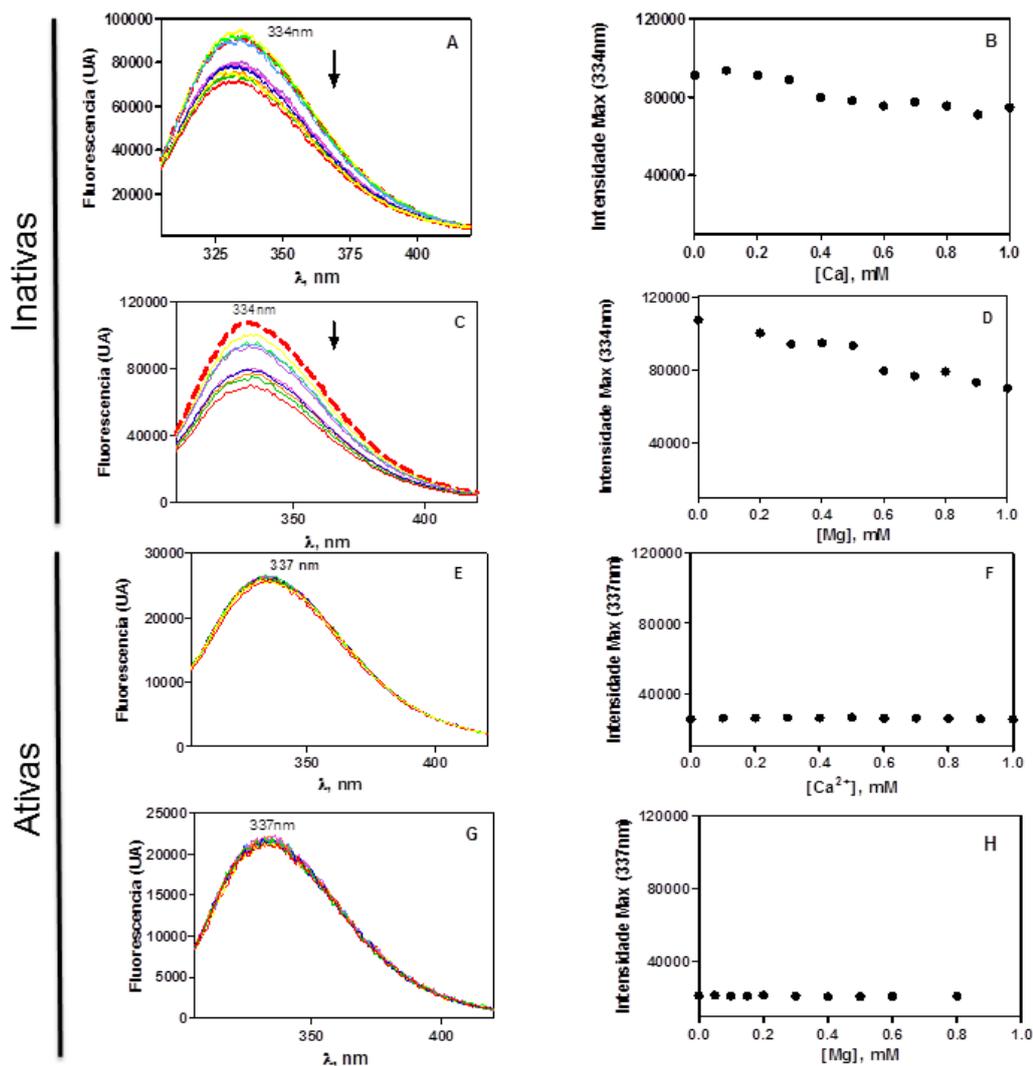
Alguns íons metálicos, quando ligados a proteínas podem catalisar reações e realizar funções fisiológicas específicas. Proteínas histidina quinases, em geral, requerem cátions divalentes para sua atividade de fosforilação sendo o Mg^{2+} o preferido para a atividade catalítica da DevS, todavia Mn^{2+} tem ainda expressiva atividade.¹⁸ Sousa *et al.* (2007), verificou uma inibição da atividade quinase da proteína DevS quando empregado Ca^{2+} . O Mg^{2+} , em geral, liga-se entre o β e o γ -fosfato do ATP e do ADP, neutralizando a densidade de cargas negativas e facilitando a ligação do nucleotídeo fosfatado com a enzima substrato.³² Examinando a cinética de transferência do grupo fosforil no sistema de dois componentes FixL/FixJ, Gilles-Gonzalez e Gonzalez, 1993, verificaram que a presença de Mn^{2+} acelera a autofosforilação da proteína FixL, uma proteína heme sensora.³³ Adicionalmente, observou-se que um íon zinco(II) encontra-se na estrutura cristalográfica do domínio de ligação a ATP da DevS, coordenado em uma geometria tetraédrica aparentemente estabilizando o sítio de ligação do ATP através da interação Zn^{2+} com o resíduo de glutamato (Glu537).³⁴ Apesar dessas observações não houve ainda nenhuma medida quantitativa destas interações e sua possível influência estrutural.

Uma característica da tuberculose pulmonar (TB) é a formação de granulomas, o que requer comentar brevemente sobre a importância de metais para a virulência da *Mtb*. A calprotectina é uma proteína presente em grande quantidade na fração citosólica de neutrófilos, membro da família S100 de proteínas de ligação a cálcio e zinco, sendo liberada pela ativação de leucócitos em resposta a uma doença inflamatória.³⁵ Curiosamente, as proteínas S100, como a calprotectina, são

proteínas dominantes produzidas por neutrófilos em granulomas pulmonares de pacientes com TB. Não surpreendentemente, o sistema imune do hospedeiro tenta restringir a disponibilidade de manganês e zinco em resposta a infecções bacterianas usando a proteína quelante calprotectina.⁴ Os metais de transição são constituintes essenciais de todos os organismos vivos, desempenhando papéis estruturais e catalíticos cruciais em muitas enzimas e fatores de transcrição. O número de proteínas que contém zinco identificadas em micobactérias aumentou significativamente à medida que mais estruturas de proteínas são resolvidas. Nos macrófagos, mostrou-se que o zinco se acumula nos fagossomas que contêm *M. tuberculosis* e que as cepas bacterianas sem resistência ao zinco, Δ CtpC, são prejudicadas na sobrevivência intracelular.³⁶ Um exemplo que revela isto são as enzimas P1B-ATPases, as quais são responsáveis pelo efluxo de metal citoplasmático e desempenham papel importante na limitação das concentrações de metal citosólico ou na maturação de metaloproteínas secretadas. A P1B-ATPase, CtpC, necessária para a sobrevivência de *Mycobacterium tuberculosis*, também é uma ATPase de transporte de Mn^{+2} necessária para a homeostase e a organização estrutural de metaloproteínas secretadas em *Mycobacterium*.³⁷ Devido a isso, e a ausência de medidas das afinidades de ligação aos metais Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} frente a proteína DevS, realizou-se esse estudo de forma preliminar.

Inicialmente, verificou-se a fluorescência intrínseca da DevS com a adição de Mg^{2+} e Ca^{2+} . Para a oxi-DevS, a adição de Mg^{2+} e Ca^{2+} , 0 a 1 mM, levou a uma supressão de fluorescência, porém, sem variação significativa no espectro e sem deslocamento do máximo de emissão em 334 nm. Para a forma carboxi da proteína, com a adição de Mg^{2+} , 0 a 0,8 mM, não foi observado mudança no sinal de emissão de fluorescência, Figura 13. As variações de fluorescência não originaram um comportamento compatível com análise por um modelo de interação para a associação a um ou múltiplos sítios do ligante à proteína.

Figura 13 – Espectro de emissão de fluorescência de 1 μ M da proteína DevS na forma oxi com adição de 0 a 1 mmol L^{-1} de cátions divalentes (Ca^{2+} ; Mg^{2+}), e máximos de intensidade de fluorescência a 334 e 337 nm. Adição de $CaCl_2$: A e B (Oxi); E e F (carboxi). Adição de $MgCl_2$: C e D (oxi); G e H (carboxi). Excitação: 295 nm, Emissão: 305 a 420 nm. Fenda de 0,75 nm.



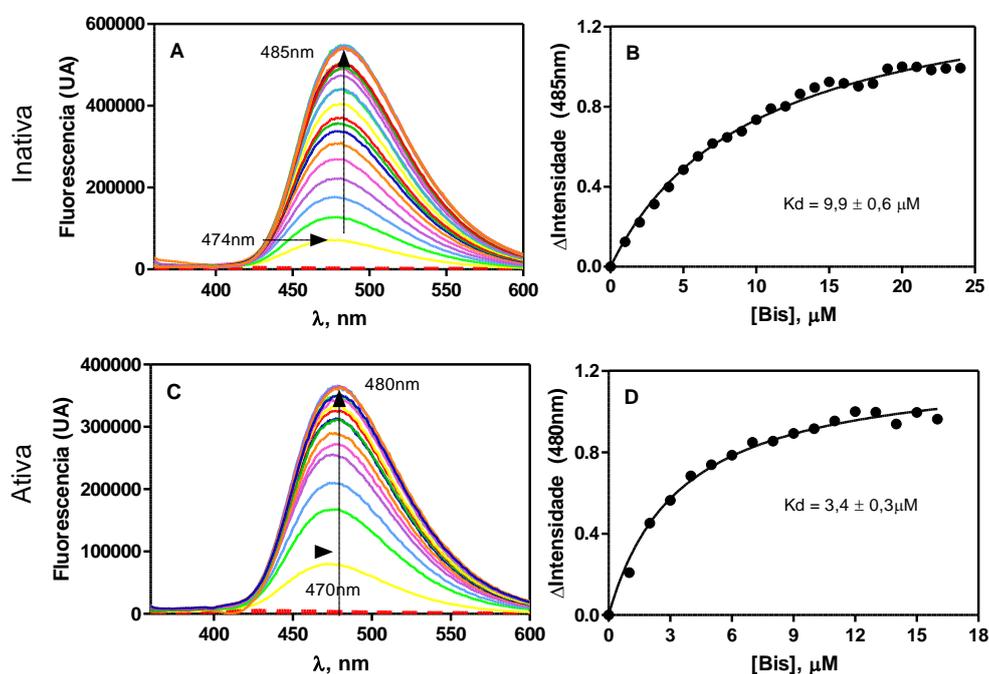
4.4.2.1. Estudo de Afinidade a Cátions Divalentes Utilizando Bis-ANS como Sonda Fluorescente

Outra estratégia metodológica usada em fluorescência para o estudo de proteínas se dá com o uso de fluoróforos extrínsecos, ou seja, agentes fluorescentes não pertencentes a proteína. Há uma série de interessantes agentes fluorescentes extrínsecos que apresentam uma forte emissão fluorescente quando ligados a estruturas hidrofóbicas. Destaca-se, nessa classe de compostos, o 4,4'-bis-1-anilinaftaleno-8-sulfonato (Bis-ANS), primeiramente descrito por Rosen and Weber em 1969, o qual interage não covalentemente com os sítios hidrofóbicos de proteínas, sendo largamente utilizado como sonda para investigar alterações nesses microambientes. O Bis-ANS se liga a superfícies hidrofóbicas de proteínas com alta

afinidade. A fluorescência desse corante aumenta dramaticamente, e o máximo de emissão sofre um deslocamento para o azul considerável quando o microambiente muda de água para outro de menor polaridade, tal como um sítio de ligação numa proteína.³⁸ Desta forma, investigou-se a interação do Bis-ANS com a proteína DevS nas formas inativa, ligada ao oxigênio molecular, e ativa, ligada ao CO. Curiosamente, observou-se uma maior afinidade do marcador fluorescente pela proteína DevS quando esta encontrava-se na forma carboxi, que é enzimaticamente ativa. O tratamento dos dados empregando-se uma equação de associação a um único sítio de ligação resultou em K_d 's para a forma oxi de $9,2 \pm 0,5 \mu\text{M}$, enquanto para a forma carboxi de $3,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$. Esse resultado indicou uma afinidade de quase três vezes maior para a proteína na sua forma ativa, Figura 14.

É interessante perceber as diferenças encontradas para os máximos comprimento de onda de emissão para a titulação com Bis-ANS da proteína na forma ativa e inativa, 485 nm para a DevS oxi e 480nm para a DevS carboxi. Estes dados sugerem um ambiente mais hidrofóbico para esta última, possivelmente, sendo a razão de um menor valor de K_d do Bis-ANS na forma ligada a CO.

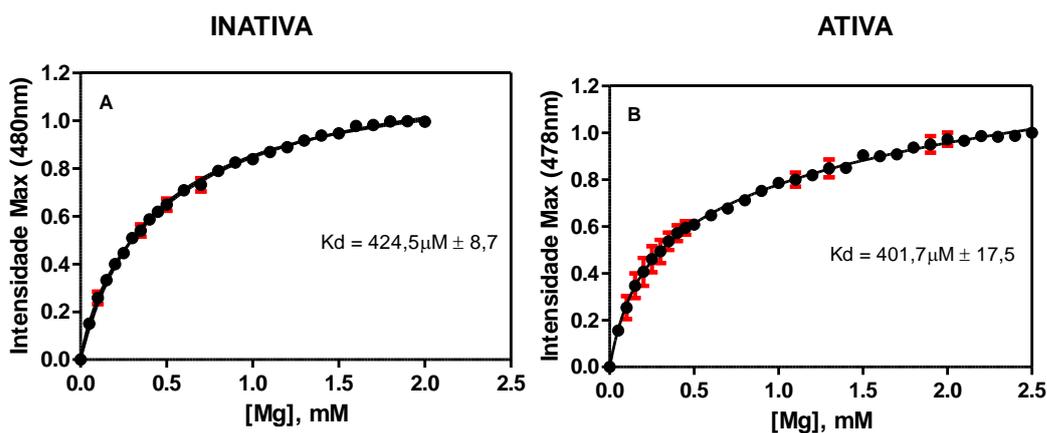
Figura 14 – Espectro de emissão de fluorescência de $1 \mu\text{M}$ da proteína DevS em Tris 10 mM pH 8. A e B – ligada a oxigênio, com a concentração de Bis-ANS variando de zero a $24 \mu\text{M}$. C e D – ligada a monóxido de carbono, com a concentração de Bis-ANS de zero a $16 \mu\text{M}$. Constantes de dissociação utilizando uma equação para um sítio de ligação, $K_d = 9,9 \pm 0,6 \mu\text{M}$ na forma oxi e $K_d = 3,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$; $R^2 = 0,99$.



A ligação de íons metálicos aos resíduos de aminoácidos, em geral, segue as regras gerais da química de coordenação – ácidos (aceptores de elétrons) e bases (doadores de elétrons), cujo conceito de Pearson de espécies duras e macios podem ser empregados, desta forma ácidos e bases macios se ligam entre si, sendo geralmente espécies grandes e facilmente polarizáveis; enquanto que ácidos e bases duros tem maior afinidade um pelo outro, sendo em geral espécies pequenas e pouco polarizáveis. Por exemplo, o oxigênio se comporta como uma base dura e se liga, preferencialmente, a íons metálicos duros como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} que funcionam como ácidos duros. O Zn^{2+} está na fronteira entre macio e duro e assim se liga bem tanto ao oxigênio quanto ao enxofre, que é uma base macia, e ainda ao nitrogênio, que é um doador eletrônico intermediário entre o oxigênio e o enxofre.³⁹

Desta forma, em nossos estudos, verificou-se a afinidade de cátions divalentes a proteína DevS nas formas ativa, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$, e inativa, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$, revelando uma interessante tendência de aumento de afinidade nesta ordem: $\text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Zn}^{2+}$ conforme podemos ver na figura 15 e tabela 5. Nota-se ainda uma leve variação nos máximos de emissão, em que, para Mg^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} , há um leve deslocamento de 2 nm entre as formas ativas e inativas, o que não ocorre com o Ca^{2+} . Coincidindo, para a forma ativa, em 478 nm o máximo para a adição de Mg^{2+} e Zn^{2+} e, em 480 nm, para a adição de Ca^{2+} e Mg^{2+} .

Figura 15 – Medidas de Afinidade a Íons Divalentes. Curvas de titulação fluorimétricas de cátions divalentes a $1\mu\text{M}$ de proteína DevS, dados ajustados a equação de um sítio de ligação. A, C, E e G correspondem a DevS oxi, inativa. Em B, D, F e H a proteína está ligada a CO, ativa. ($R^2 > 0,98$ para todas as medidas)



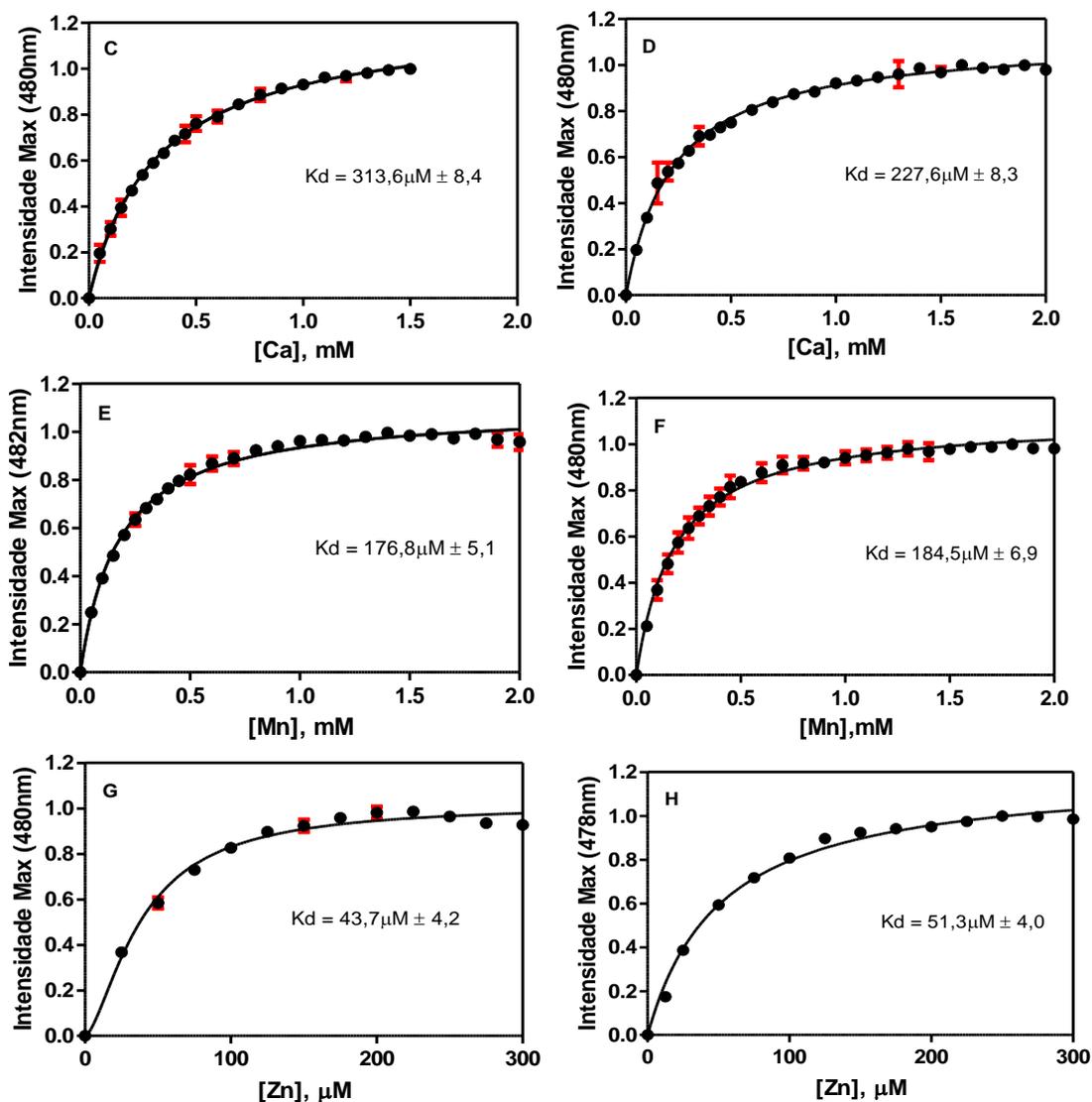


Tabela 5 – Valores de K_d (μM) para as adições de cátions divalentes das formas oxí e carboxi da proteína DevS.

	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Mn^{2+}	Zn^{2+}
$\text{Fe}^{\text{II}} - \text{O}_2$	$424,5 \pm 8,7$	$313,6 \pm 8,4$	$176,8 \pm 5,0$	$43,7 \pm 4,2$
$\text{Fe}^{\text{II}} - \text{CO}$	$401,7 \pm 17,5$	$227,6 \pm 8,3$	$184,5 \pm 6,9$	$51,3 \pm 4,0$

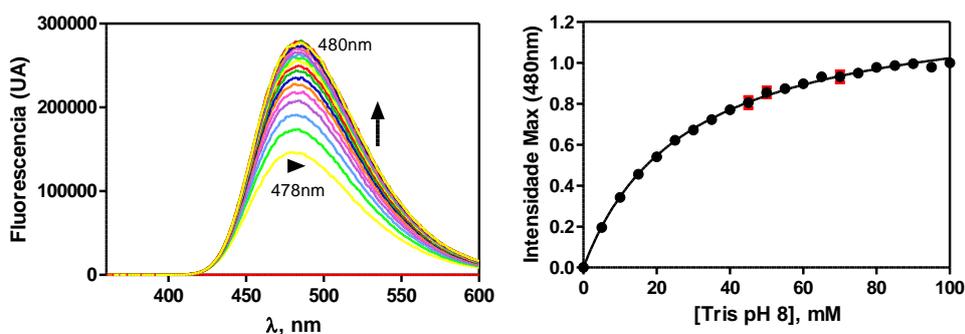
Fonte: Elaborada pela autora.

Sugere-se, com a tendência observada, do Mg^{2+} ao Zn^{2+} , que a afinidade aos cátions metálicos é mais eficiente quanto mais macio ele for, possibilitando mais pontos de interação com os resíduos de aminoácidos da proteína.

4.4.2.2. Afinidade de Ligantes a Proteína DevS Utilizando Bis-ANS como Sonda em Tampão Salino

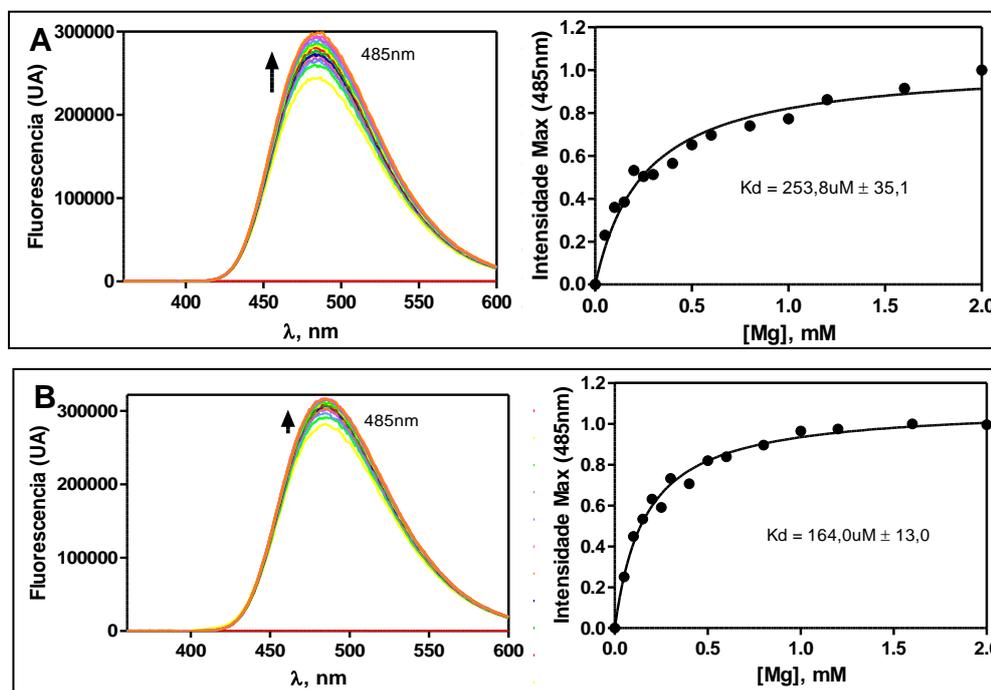
Com o aumento da concentração de Tris-HCl na solução de Bis-ANS ligado a proteína verificou-se um aumento sucessivo da intensidade de fluorescência até a saturação, em 100 mM, indicando um aparente $K_d = 27,8 \pm 0,7$ mM, e ainda percebeu-se um leve deslocamento para o vermelho, possivelmente insignificante, também visto por Huiran Yin et. al., 2007, em seu estudo das regiões hidrofóbicas das proteínas morfogenéticas do osso utilizando Bis-ANS. A Figura 16 sugere que a salinidade do tampão pode influenciar na variação de fluorescência.

Figura 16 – Espectro de emissão de fluorescência para a titulação de 1 μ M de DevS oxi com Tris-HCl pH 8, de 10 mM a 100 mM, utilizando Bis-ANS como sonda a esquerda. Curva de saturação de Tris-HCl a proteína DevS na forma oxi ligada a 12 μ M de Bis-ANS acompanhando os máximos de emissão de fluorescência em 480 nm. $K_d = 27,8$ mM \pm 0,7 utilizando a equação de um sítio de ligação a direita. ($R^2 = 0,99$) Excitação: 350nm. Emissão: 360 nm – 600 nm. Fenda: 0,75 mm.



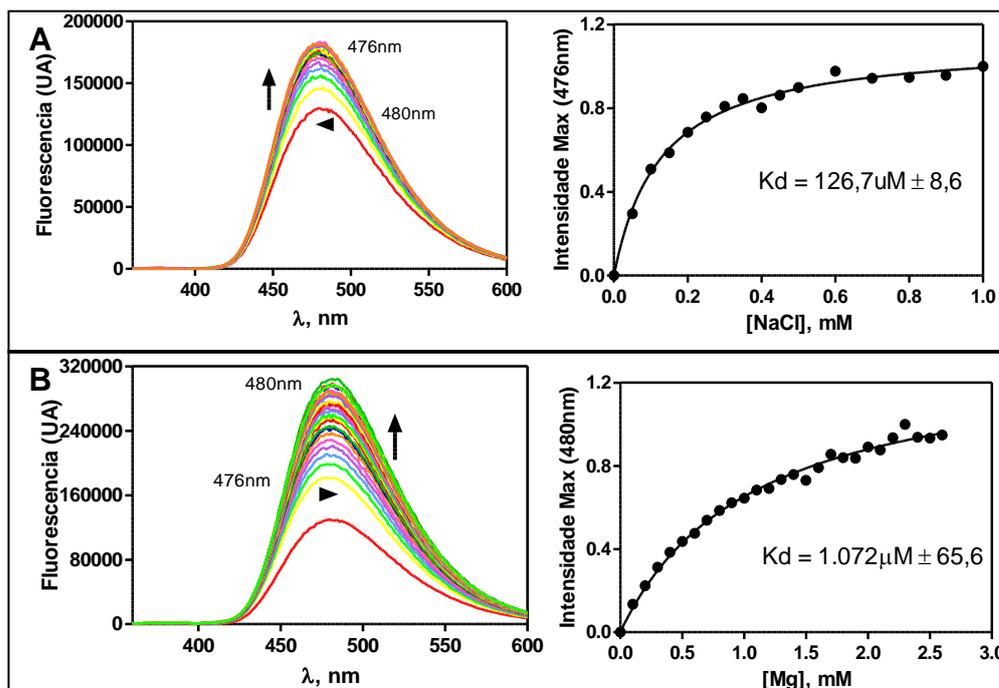
Com base na observação anterior, realizou-se titulações de 1 μ M de proteína DevS na forma oxi com 12 μ M de Bis-ANS empregando-se Mg^{2+} , agora em tampões mais salinos diferentes dos empregados na figura 15A. Curiosamente, foi observado uma maior afinidade do metal pela proteína, evidenciado pelo menor valor de K_d , tanto para um tampão com 50mM Tris-HCl quanto para outro contendo adicionalmente também 50 mM NaCl. No tampão Tris-HCl 10 mM o K_d para o Mg^{2+} foi de 424 ± 9 μ M, Figura 17A, enquanto que em Tris-HCl 50 mM foi 254 ± 35 μ M; já em tampão Tris-HCl 10mM contendo NaCl 50 mM, o K_d foi ainda menor, $164,0 \pm 13,0$ μ M, Figura 17B.

Figura 17 – Espectro de emissão de fluorescência e curva de associação ao Mg^{2+} , 0 a 2 $mmol L^{-1}$ M, da proteína DevS oxi utilizando Bis-ANS como sonda acompanhando o máximo de emissão de fluorescência em 485 nm, equação considerando um sítio de ligação. A – 50 $mmol L^{-1}$ Tris pH 8. ($R^2 = 0,96$) B – 10 $mmol L^{-1}$ Tris, 50 $mmol L^{-1}$ NaCl pH 8. ($R^2 = 0,988$)



Para a forma carboxi foi verificado também um aumento de fluorescência até a saturação com a adição de NaCl de 0 a 1 $mmol L^{-1}$, a 1 μM de DevS carboxi utilizando Bis-ANS como sonda, observando-se $K_d = 126,7 \pm 8,6 \mu M$. ($R^2 = 0,99$). Diferentemente do que se observou para a forma oxi, após a adição de NaCl, titulou-se com Mg^{2+} e foi observada uma expressiva menor afinidade do Mg^{2+} pela DevS carboxi, K_d de $1072 \pm 66 \mu M$, Figura 18, em relação ao resultado apresentado na figura 15B, sendo em Tris-HCl 10 mM o K_d de $402 \pm 18 \mu M$.

Figura 18 – Espectro de emissão de fluorescência e curva de saturação de ligantes a proteína DevS carboxi em Tris 10 mM pH 8 acompanhando o máximo de emissão de fluorescência, considerando a equação para um sítio de ligação. A – Titulação com NaCl, 0 a 1 $mmol L^{-1}$. B – Titulação com $MgCl_2$, zero a 2,6 $mmol L^{-1}$, após adição de 1 $mmol L^{-1}$ de NaCl.



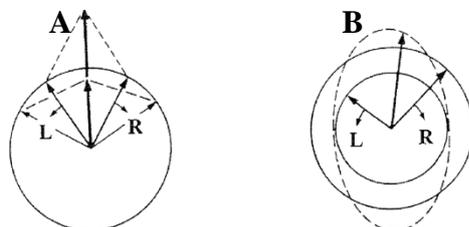
É interessante notar que com o aumento da concentração de NaCl ocorre um certo deslocamento para maiores comprimentos de onda do máximo de emissão na titulação com Mg^{2+} tanto para a forma oxi quanto para a carboxi. Sendo que em Tris-HCl o máximo para a forma oxi é 480 nm, Figura 15A, e em 50 mM NaCl, o máximo ocorre em 485 nm, Figura 18. Para a forma carboxi, em Tris-HCl o máximo foi observado em 478 nm, Figura 15B, e, com a adição de 1 mM de NaCl, foi em 480 nm, Figura 18B. Essas alterações possivelmente se devem a mudanças nas formas oligoméricas, como posteriormente será discutido.

4.5. Estudos estruturais empregando dicroísmo circular (CD)

Cada vez mais a técnica do dicroísmo circular (CD) tem sido utilizada como uma ferramenta valiosa para o estudo de proteínas em solução. O fenômeno do CD baseia-se numa propriedade que algumas substâncias possuem de absorver diferentemente a luz circularmente polarizada a direita e a esquerda. Para tal, a molécula deve ser quiral, não apresentando plano de simetria ou gerar um componente estrutural quiral ou ainda conferir um ambiente quiral mesmo a uma molécula aquiral, que originará sinal no CD. Num material quiral, após a passagem da luz pelo material, que apresenta sinal de CD, as componentes da luz polarizada a direita (R) e a esquerda (L) são diferentemente absorvidas, logo a radiação apresentará resultante elíptica, Figura 19. Os instrumentos de CD medem a

diferença de absorvância entre os componentes L e R polarizados circularmente, ($\Delta A = A_L - A_R$), mas geralmente relatam isso em termos de elipticidade (θ) em graus.

Figura 19 – Absorção dos componentes da luz polarizadas a direita (R) e a esquerda (L). Em A, as componentes são absorvidas por igual, gerando um plano circular. Em B, as componentes são absorvidas diferentemente, gerando uma resultante elíptica.



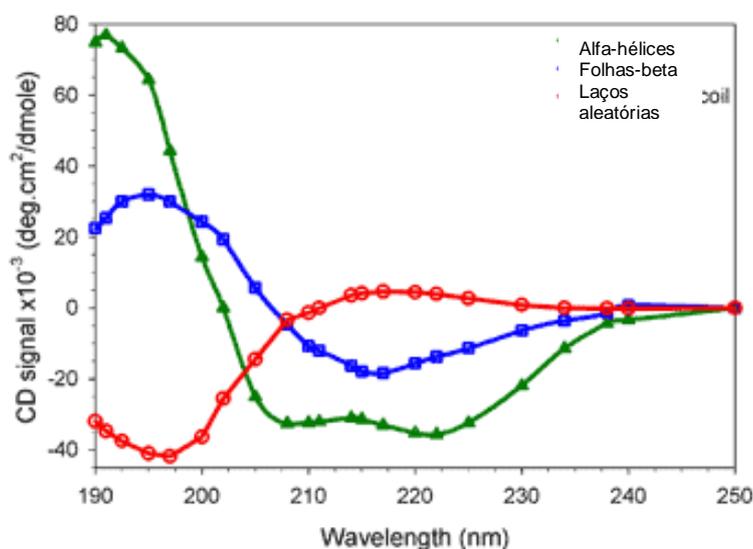
Fonte: KELLY, S. M.; JESS; PRICE (2005).

No caso das proteínas, os principais grupos opticamente ativos são as ligações peptídicas e as cadeias laterais de aminoácidos aromáticos. A região do ultravioleta distante (*Far-UV* de 190 nm a 240 nm), em que as ligações amida absorvem, revelam os diferentes tipos de padrão de estruturas secundárias regulares como alfa-hélice e folhas beta. A região do ultravioleta próximo (*Near-UV*, de 260 nm a 320 nm) é a faixa de absorção dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, os quais podem ser usados para inferir alterações conformacionais envolvendo tais grupos. Os cofatores proteicos também absorvem no CD, no caso de heme proteínas, o grupo heme pode ser investigado na região do visível (300 nm – 500 nm).⁴⁰ Importante mencionar que o grupo heme livre não apresenta sinal de CD, somente ao se ligar a proteína é que se observa quiralidade conferida pelo ambiente.

4.5.1. Determinação da Estrutura Secundária da DevS

Para determinar a estrutura secundária de uma proteína desconhecida métodos de predição podem ser utilizados a partir de estruturas de proteínas similares conhecidas.²³ A figura 20 mostra as características espectrais de estruturas secundárias regulares como alfa hélices, que apresentam dois mínimos negativos em 208 nm e 222 nm e um máximo positivo em 193 nm; folhas beta, com um sinal negativo mínimo em torno de 215 nm e um máximo positivo em 196 nm; e os laços aleatórios, com um pequeno mínimo negativo em torno de 198 nm.

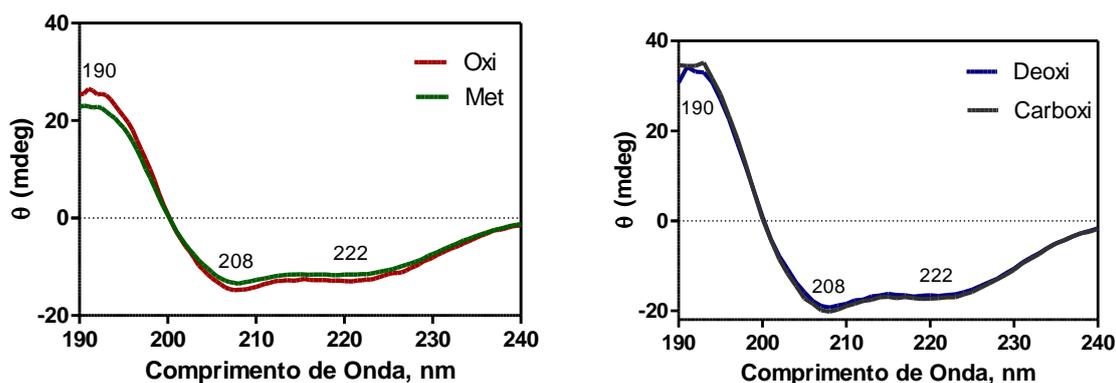
Figura 20 – Espectros de dicroísmo circular na região do UV distante de estruturas secundárias características de proteínas.



Fonte: <http://www.fbs.leeds.ac.uk/facilities/cd/> acessado em 01 de agosto de 2017.

Na região do UV distante observamos, tanto para as formas inativas (oxi DevS ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$) e met DevS ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-H}_2\text{O}$)) quanto para ativas (deoxi (Fe^{II}) e carboxi ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$)), a presença de um máximo positivo na região de 190 nm e dois mínimos negativos na região de 208 nm e 222 nm, caracterizando uma proteína cuja estrutura secundária é majoritariamente composta por alfa-hélices, Figura 21. As duas transições que dominam o fenômeno do CD na região do UV distante, abaixo de 240 nm, são a transição $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ que é essencialmente responsável pelo máximo positivo em aproximadamente 190 nm, e a transição $n \rightarrow \pi^*$, pelo mínimo na região de 220 nm para as alfa-hélices.⁴⁰ Hennessey et. al., 1981, estudou a estrutura secundária de diversas proteínas por meio de CD, encontrando, para as heme proteínas citocromo c, 42% de alfa-hélices e 3% de folhas beta; hemoglobina, 68% de alfa-hélices e 1% de folhas beta; e mioglobina, 83% alfa-hélices e zero folhas beta, valores bem próximos aos das estruturas de raios-X obtidas para essas proteínas.⁴¹

Figura 21 – Espectro de dicroísmo circular na região do UV distante para a proteína DevS em Tris-HCl 10 mM pH 8 a 25°C. A – 1,5 μM de DevS nas formas oxi e met. B – 1,25 μM de DevS nas formas deoxi e carboxi.



Para a obtenção das porcentagens de alfa-hélices e folhas-beta da DevS foi utilizado o programa *Dichroweb*, o qual inclui uma gama de banco de dados e parâmetros variados para se determinar a estrutura secundária de proteínas, contendo, entre outros, os programas CONTINLL, CDSSTR e SELCON3, a fim de se calcular uma média dos resultados obtidos para obtermos dados médios mais confiáveis da estrutura secundária da DevS, Tabela 6.⁴³ A análise dos três programas revela as médias das alfa hélices, 41%, e das folhas beta, 16%, bem como apresenta estruturas não identificadas neste outro programa como as “random coils” e parte da estrutura desorganizada. A convergência dos dados para os três programas fornece um maior grau de confiança nos resultados da Tabela 6. Adicionalmente, convém mencionar que não houve diferenças significativas entre as outras formas da DevS (deoxi, carboxi ou met). Esses resultados nos informam também que as formas ativas e inativas não sofrem alteração de estrutura secundária.

Tabela 6 – Composição da estrutura secundária de oxi DevS a partir da análise dos programas CONTINLL, CDSSTR e SELCON3.

	α Helices	Folhas β	<i>Random coils</i>	Não-organizada	Total
Selcon 3	0,400	0,176	0,125	0,307	1,008
Contin	0,408	0,164	0,121	0,308	1,001
CDSSTR	0,430	0,150	0,120	0,300	1,000
Média (%)	41	16	12	31	100

Fonte: dados gerados pelo colaborador Dr. Geancarlo Zanatta, professor/pesquisador no Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará (UFC).

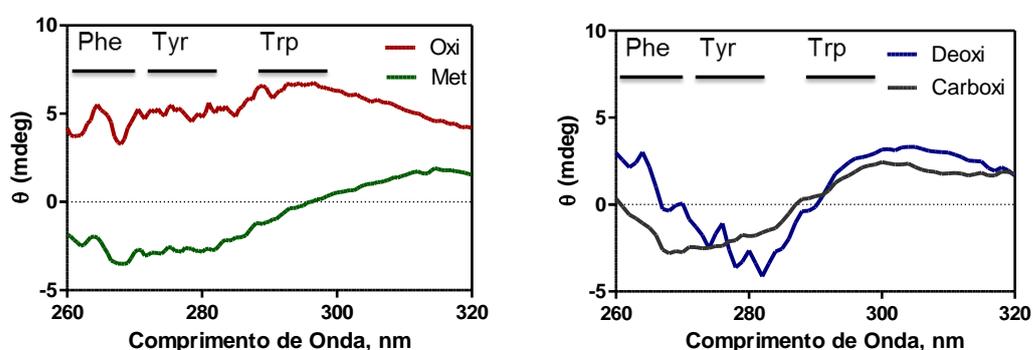
4.5.2. Investigação da Estrutura Terciária da DevS

A região do espectro de CD entre 260 nm a 320 nm corresponde ao UV próximo, sendo a faixa entre 255 nm a 270 nm atribuída à absorção da fenilalanina,

a de 275 a 282 nm a tirosina e entre 290 a 305 nm correspondente ao triptofano. As bandas nessas regiões surgem de transições vibrônicas em que estão envolvidos diferentes níveis vibracionais do estado excitado. A forma e a magnitude do espectro da região do UV próximo dependerá da natureza dos aminoácidos aromáticos presentes na proteína, do ambiente em que eles se encontram, da mobilidade e de sua disposição espacial no polipeptídeo. Apesar dos estudos dessa região espectral não fornecerem, ainda, informações precisas sobre a estrutura terciária da proteína, utiliza-se o UV próximo como uma espécie de impressão digital da proteína, sendo possível avaliar mudanças estruturais através de estudos comparativos entre proteínas selvagens e mutantes, nas suas formas ativa e inativa, alterando o ambiente com variação de pH, salinidade, entre outros.⁴⁰

A figura 22 mostra o espectro de UV próximo da proteína DevS nas formas oxi/met e deoxi/carboxi, inativas e ativas, respectivamente. Pode-se observar que há uma brusca mudança na região dos aminoácidos aromáticos entre as formas oxi e met, apesar de ambas serem referentes a formas inativas. Por outro lado, para as formas deoxi e carboxi há uma certa convergência, as quais se referem a formas ativas da proteína. Se compararmos as formas carboxi e met que tem atividades opostas ainda assim observa-se expressiva similaridade. Claramente somente o ligante O₂, na forma oxi, provocou mais distinta alteração do sinal de CD, enquanto todos os outros mostraram-se bastante análogos em certa extensão.

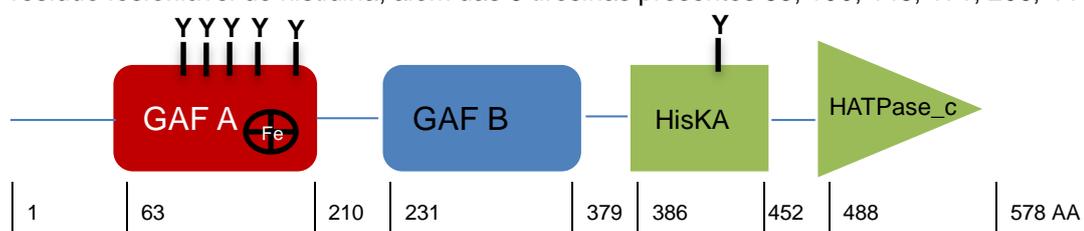
Figura 22 – Espectro de dicroísmo circular na região do UV próximo de 30μM da proteína DevS em tampão Tris-HCl 10mM pH 8 a 25°C. A – DevS oxi e met. B – Deoxi e carboxi.



Nos estudos realizados por Basudhar *et. al.* (2016), os autores indicam a importância do resíduo de tirosina 171, presente no domínio heme, funcionando na estabilização da rede de ligação de hidrogênio entre alguns resíduos da cadeia lateral da proteína que se dispõem distais ao heme. Há indícios de que este resíduo

seja importante para a comunicação do sinal para o domínio quinase, segundo Yuki *et al.* (2008), visto que a perda do resíduo em questão comprometeu a atividade quinase do domínio enzimático.⁴⁴ Devido a seu papel aparentemente crítico e sua participação também na interação ao oxigênio, parece razoável supor que esteja envolvido nos sinais diferenciais de CD observados para a forma oxi-DevS. Contudo tais resultados devem ser encarados de forma qualitativa, uma vez que há 4 outras tirosinas localizadas no GAF A e outra tirosina no domínio histidina quinase, conforme pode-se observar na figura 23.

Figura 23 - Representação esquemática da estrutura e tamanho dos domínios da DevS, indicando a quantidade de resíduos de aminoácidos de cada subunidade e a posição aproximada do grupo heme e do resíduo fosforilável de histidina, além das 6 tirosinas presentes 83, 100, 148, 171, 206, 444.

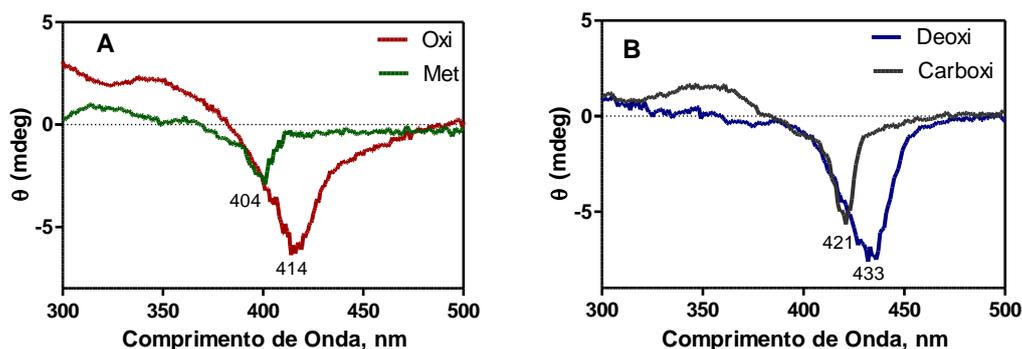


Ainda há poucos estudos a respeito da região do ultravioleta próximo por dicroísmo circular, o que limita maiores conclusões sobre alterações estruturais.

4.5.3. Investigação da região do cofator heme

Algumas proteínas contêm cofatores que absorvem na região do UV/visível. A proteína DevS contém um grupo heme no primeiro domínio GAF, o qual controla a atividade enzimática da proteína. O grupo heme sozinho não possui atividade óptica, mas torna-se opticamente ativo quando incorporado à proteína.⁴⁵ A figura 24 mostra o espectro de CD da DevS na região do visível para as formas inativas e ativas, ligada ao oxigênio molecular/oxidada e não ligada ao O₂/ligada ao CO, respectivamente, apresentando um mínimo em torno de 414 nm para a forma oxi, em 404 nm para a met, em 421 nm para carboxi e em 433 nm para a forma deoxi, coincidindo aproximadamente com os máximos de absorbância para a banda *Soret* da proteína nesses estados, o que nem sempre ocorre.

Figura 24 – Espectro de dicroísmo circular na região do UV/visível de 15 μ M da proteína DevS em tampão Tris-HCl 10mM pH 8 a 20°C. A – DevS oxi e met. B – DevS deoxi e carboxi.



No trabalho realizado por Nagay *et al.* (2014), por CD da mioglobina (Mb) e da hemoglobina (Hb), concluiu-se que a atividade óptica do grupo heme na Mb e Hb decorrem da interação de cadeias laterais do heme com a estrutura globina. Tal conclusão se baseou no fato de que carboxi-Hb com o grupo heme reverso, que não contém o grupo vinil/propionatos, exibiu espectros de CD com um mínimo negativo na região da banda *Soret*, enquanto que a carboxi-Hb nativa apresentou um máximo positivo da banda *Soret*. Desta forma, é possível sugerir que para a DevS, tanto na forma ativa quanto inativa, a contribuição desses grupos laterais do heme para o sinal de CD ocorre de forma semelhante. Esse resultado difere marcadamente do que se observou para a hemeproteína sensora de oxigênio FixL. Nesta proteína o mecanismo de ativação/inativação iniciada pelo grupo heme provoca expressivas mudanças na orientação dos propionatos, bem como deformação do anel porfirínico. Neste caso observou-se alterações claras nos sinais de CD na região do grupo heme, inclusive inversões do sinal de CD segundo a dissertação de Wellinson Gadêlha Guimarães em 2016, intitulada FixL Híbrida da Bactéria *Rhizobium etli*: Estudos Conformacionais e de Estabilidade. Esses resultados para DevS sugerem que tais grupos laterais, propionato/vinil, não devem sofrer alteração estrutural significativa. Assim, o resultado de CD são fortalecidos pelas estruturas de raios-X em que não são observadas mudanças significativas no grupo heme, seja nas formas ativas ou inativas.⁴⁶

4.6. Investigação do Estado de Oligomerização por Filtração em Gel

Um importante avanço conceitual sobre a transdução de sinal entre o receptor e o local de ativação em uma proteína foi a proposta de que esse

mecanismo seja alostérico. Esse tipo de sinalização a “distancia” ocorre através de mudanças conformacionais reversíveis e geralmente discretas que mediam a comunicação entre os locais de ligação ao sinal e resposta na estrutura proteica. Um modulador alostérico, portanto, trata-se de um sistema, pode ser uma enzima, em que um sinal é percebido por um sensor (receptor), causando pequenas alterações conformacionais na proteína que poderão acarretar em mudanças de afinidade do sítio ativo, por exemplo, Figura 25. No modelo proposto por Monod-Wyman-Changeux (MWC) sobre a natureza das transições alostéricas, esse tipo de sistema seria formado por proteínas compostas por subunidades idênticas, chamadas de oligômeros, contendo, no mínimo, dois estados oligoméricos que se encontram em equilíbrio e que sejam reversivelmente acessíveis, havendo uma distinção da conformação mais favorável para a ligação do ligante. Assim, o mecanismo de modulação alostérico funcionaria por pequenas mudanças cooperativas de estrutura quaternária envolvendo a estabilização de um estado oligomérico ideal para a molécula alvo.^{47, 48}

Figura 25 – Esquema de uma regulação alostérica. A ligação do ativador no sítio alostérico leva a mudanças de afinidade do sítio ativo.



Fonte: elaborada pela autora.

A estrutura quaternária das proteínas é essencialmente importante para a sua função. Investigando a estrutura da DevS por filtração em gel, observou-se múltiplos picos que indicam ser octâmeros, tetrameros e dímeros, visto que a DevS na sua forma monomérica apresenta massa molecular 62,24 kDa. Os estados oligoméricos foram atribuídos conforme mostra a curva de calibração utilizando padrões de proteínas globulares na figura 26 e Tabela 7. Convém mencionar que a injeção de dextrana azul (MM = 2.000 kDa) resultou num pico em cerca de 2,75 min, que se refere ao tempo de exclusão da coluna, indicando que as espécies investigadas foram eficientemente separadas na coluna.

Figura 26 – Cromatograma para a proteína DevS, na forma oxi, em coluna de filtração em gel analítica, empregando-se tampão tris-HCl pH 7,4 e NaCl 50 mM; e a curva de calibração de massa molar (log MM vs tempo) empregando-se as proteínas globulares: 670 kDa, tiroglobulina; 443 kDa, ferritina; 150 kDa, álcool desidrogenase; 44 kDa, ovalbumina; 17 kDa, mioglobina, com $R^2 = 0,98$.

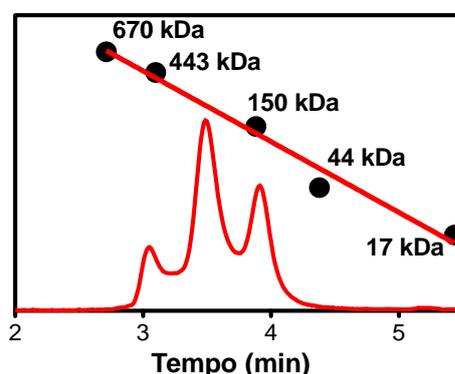


Tabela 7 – Atribuição dos estados oligoméricos da DevS na forma oxi, em tris 50mM, NaCl 50mM, pH 7,4, empregando-se a curva padrão de calibração obtida com proteínas globulares usando suas massas molares (MM) (log MM vs tempo).

Estado oligomérico	Tempo de retenção	MM Experimental	MM real
Octâmero	3,040	507,46	497,92
Tetrâmero	3,467	250,82	248,96
Dímero	3,870	128,41	124,48

Fonte: Elaborada pela autora.

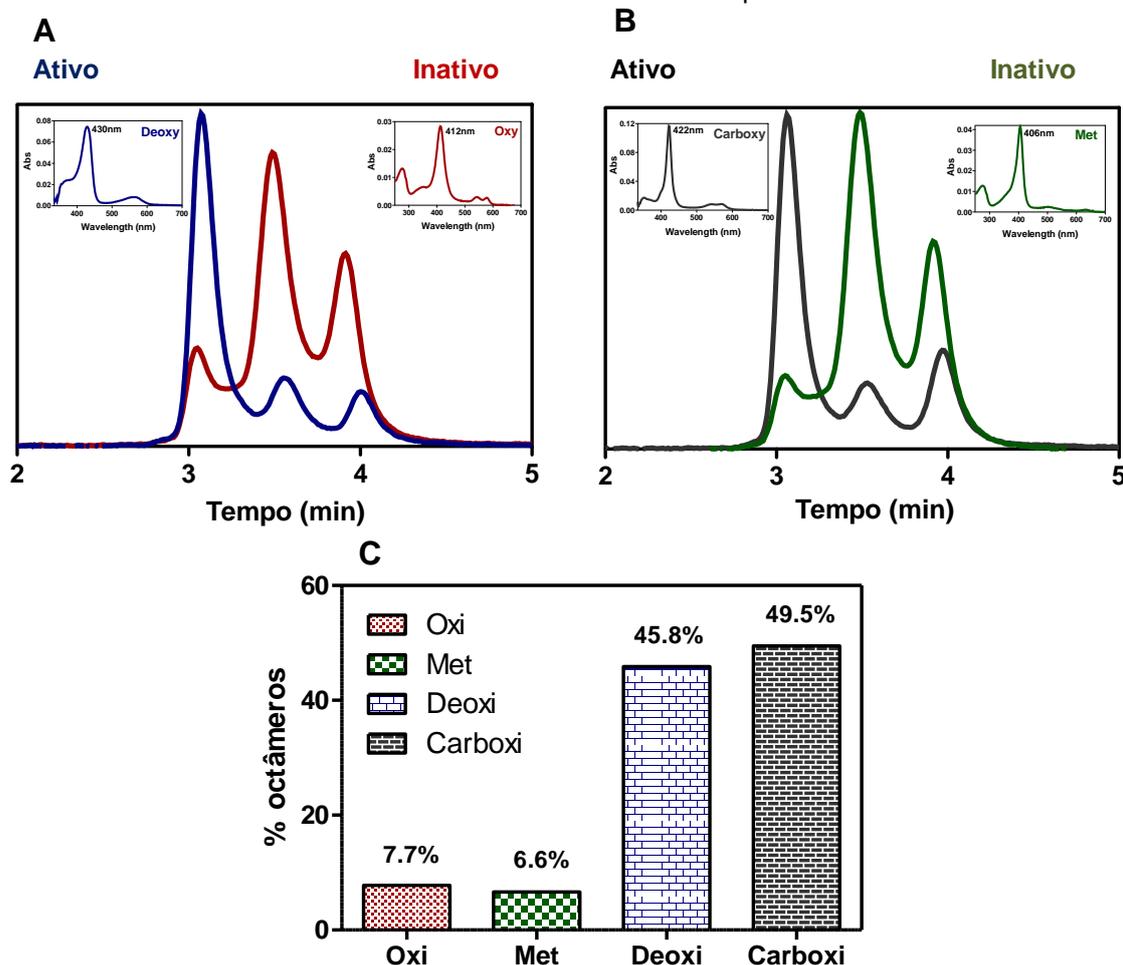
O resultado obtido para a DevS, que demonstra ser uma proteína multimérica, é bastante curioso, tendo em vista que a FixL, uma heme sensora bastante análoga mostra-se como dímero em sua forma nativa. Além disso não foi observado qualquer mudanças no seu equilíbrio oligomérico da forma dimérica com a presença de ligantes do grupo heme.¹⁵

4.6.1. Comparação entre as formas ativas e inativas da proteína

No trabalho realizado por Burns *et al.* (2014) verificou-se que os estados oligoméricos de duas heme proteínas em estudo afetavam tanto a taxa de dissociação de O_2 quanto a atividade enzimática.⁴⁹ Naquele estudo mostrou-se também que o ligante sinalizador, oxigênio, induzia alteração na proporção dos oligômeros, apesar de que tais estados se reorganizavam de forma bem lenta. Para a DevS, foi também observado uma mudança nas frações dos estados oligoméricos decorrente dos tipos de ligantes hêmicos. Os ligantes que mantinham a proteína enzimaticamente ativa, DevS nas formas deoxi e carboxi, favoreciam a uma maior

fração da forma octamérica, enquanto que os estados inativos, DevS nas formas oxi e met, a forma tetramérica e dimérica eram predominantes, Figura 27. Devido a mudança imediata na oligomerização frente a alteração do ligante heme distal, e ainda percebendo-se a semelhança para as formas ativas e inativas, sugere-se um mecanismo regulador em que o ligante hémico modularia o estado de oligomerização da proteína. Isso deve certamente afetar a interação da DevS com seu parceiro regulador, a proteína DevR. É interessante comentar um estudo realizado por Wisedchaisri *et al.* (2005) em que a estrutura cristalográfica da DevR foi resolvida e verificou-se a proteína como sendo tetramérica, sendo esta uma estrutura peculiar quando comparada com os outros fatores de transcrição da mesma família com estruturas cristalográficas conhecidas, GerE, NarL e TraR, verificadas como diméricas.⁵⁰

Figura 27 – Cromatogramas da proteína DevS 2 μ M em Tris 50 mM, NaCl 50 mM pH 7.4 nos estados ativos e inativos. A – sobreposição das formas oxi (vermelho) e deoxi (azul). B – sobreposição das formas carboxi (cinza) e met (verde). Em C verifica-se as porcentagens relativas dos picos deconvoluídos das diferentes formas da DevS com erro menor que 10%.

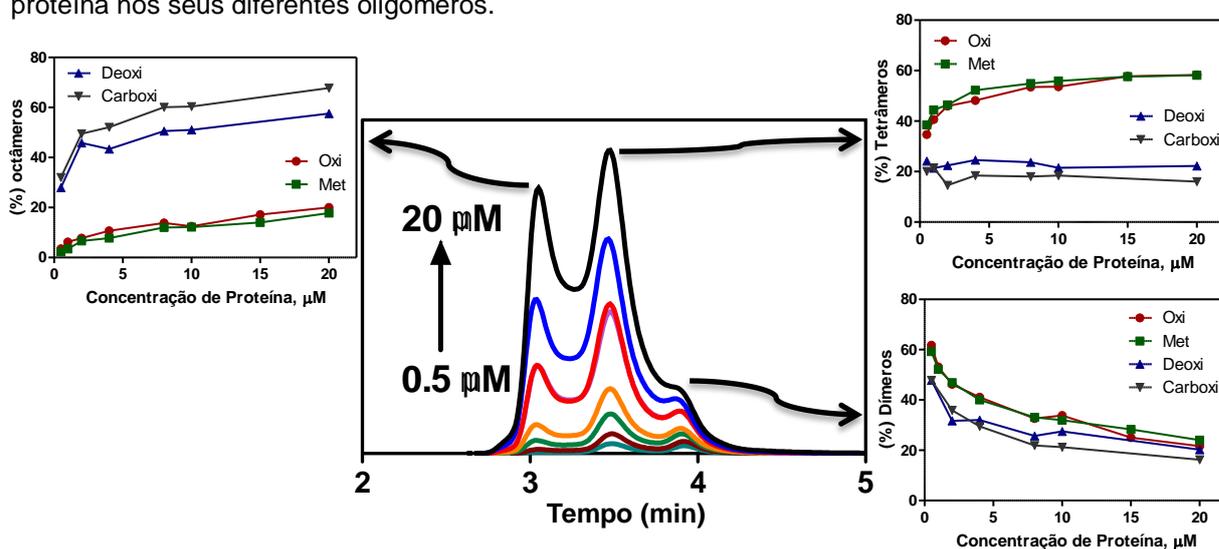


Sousa *et al.* (2007) observou-se que a atividade enzimática da DevS era inibida 6 vezes quando ligada ao oxigênio. Ou seja, a taxa de autofosforilação é reduzida em 6 vezes quando DevS encontra-se ligada ao oxigênio. Consistentemente com essa descoberta, observou-se aqui que a razão entre a quantidade relativa de DevS na forma octamérica, supostamente sua forma ativa, quando na forma ligada ao oxigênio (7.8%) e na forma anaeróbica (45.8%) é também de 6 vezes. Todavia, diferentemente dos sensores *BpeGReg* e *PccGSC* descrito por Burns *et al.* (2014), que também mostraram ter seus estados de oligomerização dependentes de sua ligação ao oxigênio, o sensor DevS tem sua resposta a mudança do estado de oligomerização rapidamente alterado.

4.6.2. Investigação do efeito da concentração da proteína nos estados oligoméricos

Investigou-se a dependência dos estados oligoméricos da proteína DevS com a sua concentração. Assim, observou-se um favorecimento dos estados de maior oligomerização com o aumento da concentração, ao passo que, com a diminuição da concentração, a forma dimérica foi a mais tendenciosa, conforme se pode observar na Figura 28.

Figura 28 - Cromatogramas de DevS met com o aumento da concentração de proteína (0,5; 1; 2; 4; 8; 10; 15 e 20 μM) em tampão tris 50 mM, NaCl 50mM, pH 7,4. Nos gráficos destacados pelas setas temos as variações das porcentagens dos estados oligoméricos com o aumento da concentração da proteína nos seus diferentes oligômeros.

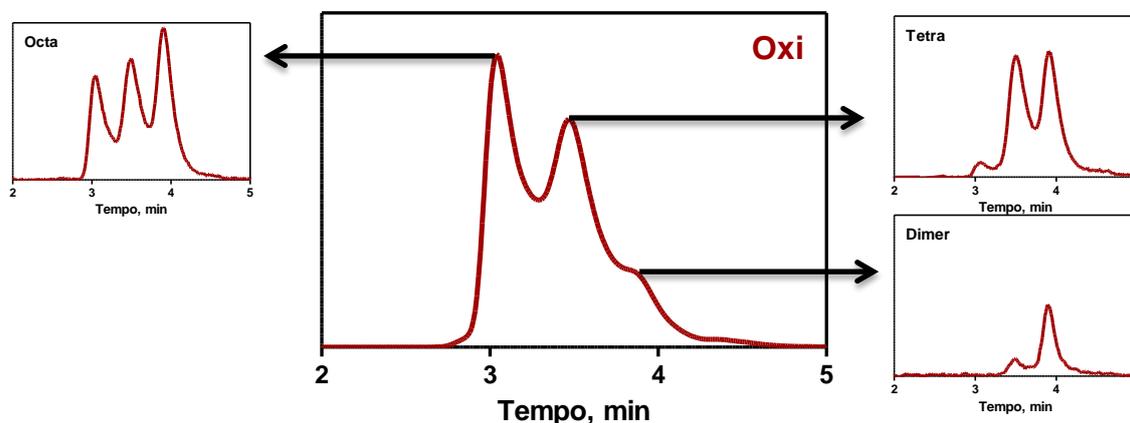


Pode-se perceber que, as formas octaméricas são as mais prevalentes nos estados ativos, deoxi e carboxi da proteína, enquanto a tetramérica predomina nos estados inativos, oxi e met. Mesmo sob elevadas concentrações ainda é possível observar alterações provocadas pelo ligante hémico. No trabalho realizado por Burns *et al.* (2014) o aumento da concentração de proteína não afeta a oligomerização, o que é curioso visto que, por se tratar de um equilíbrio entre múltiplas espécies, espera-se que haja alguma influência da concentração. Talvez isso decorra da lenta reorganização dos estados oligoméricos.

4.6.3. Isolamento dos estados oligoméricos

Interessados em avaliar se seria possível isolarmos os estados oligoméricos e realizar estudos com cada um, foi injetado oxi-DevS em alta concentração e isolados os picos cromatográficos. Com tais amostras isoladas, foram realizadas suas re-injeções a fim de avaliar se eram mantidas nos estados oligoméricos isolados, tal como relatado por Burns *et al.* (2014). Curiosamente, foi verificado que a reorganização dos estados oligoméricos da oxi-DevS ocorre logo após o seu isolamento. Mesmo a re-injeção sendo realizada 5 min após a coleta das espécies isoladas já era possível observar sua reorganização. Convém mencionar que durante isolamento na coluna de filtração em gel a proteína é sujeita a expressiva diluição o que deve favorecer a sua reorganização, além de favorecer a estados de menor oligomerização (tetrâmero e dímero), Figura 30. Esse comportamento diverge do observado por Burns *et al.* (2014) em que a forma tetramérica isolada, por exemplo, praticamente não sofreu reequilíbrio das espécies mesmo após 18 horas. Os dados obtidos para DevS corroboram com a ideia inicial de se tratar de um mecanismo alostérico devido a rapidez na reorganização das formas, em especial da octamérica, a qual era a predominante na concentração de injeção da amostra, 20 μ M de oxi DevS, e após 5 min de seu isolamento, pode observar o reequilíbrio para os estados de tetrâmero e dímero, dominantes na proteína na forma oxi diluída, Figura 29.

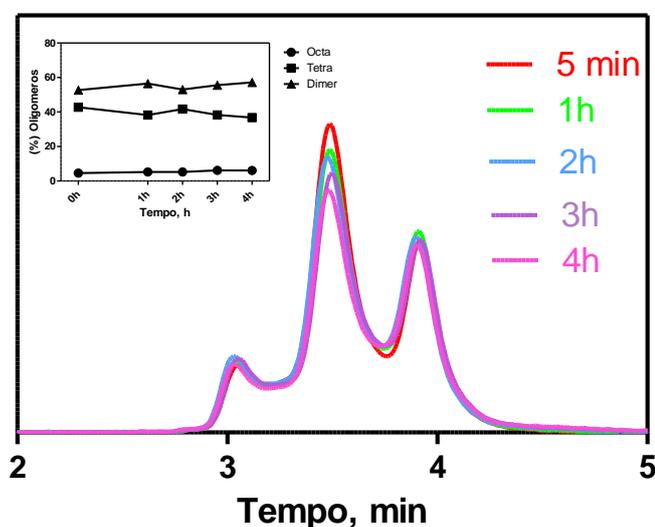
Figura 29 – Cromatograma da proteína oxi-DevS 20 μM em tris 50 mM, NaCl 50 mM pH 7.4, em coluna de filtração em gel, destacando nos quadros menores as reinjeções de cada um dos estados oligoméricos isolados: octâmero, tetrâmero e dímero, que foram reinjetados nos tempo de 5, 15 e 25 min após a coleta, respectivamente.



4.6.4. Monitoramento da reorganização dos estados oligoméricos no tempo

Buscou-se acompanhar a ocorrência de possíveis alterações entre os estados oligoméricos acompanhando no tempo de 5 min a 4h de uma amostra de DevS. Observou-se variações pouco significativas das proporções entre os estados oligoméricos da proteína DevS no tempo decorrido conforme pode se observar na Figura 30.

Figura 30 – Cromatograma das injeções da proteína met-DevS 1 μM , após preparo nos tempos de 5 min, 1h, 2h, 3h e 4h.. Em destaque ilustra-se as mudanças das porcentagens relativas dos estados octamérico, tetramérico e dimérico no tempo.

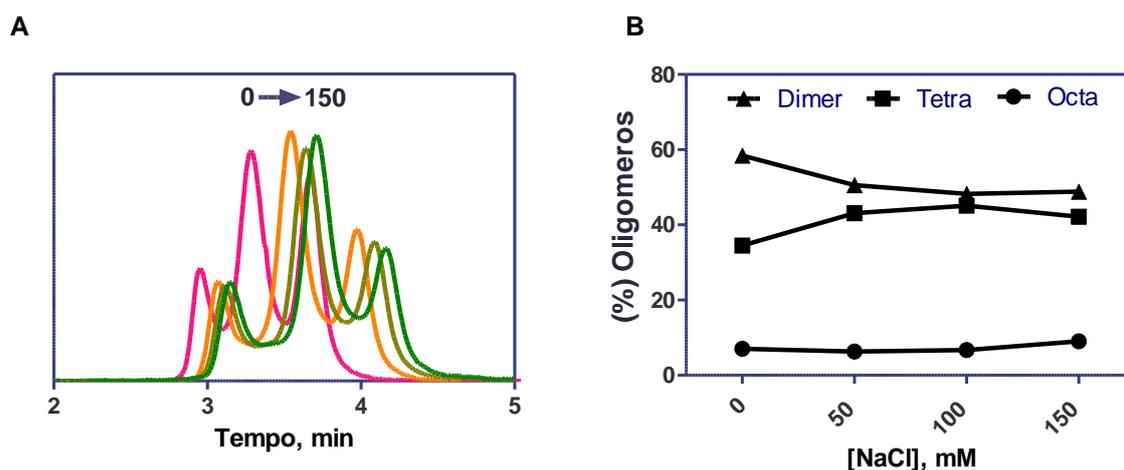


Esses resultados corroboram com a rápida reorganização anteriormente vista entre os estados ativos e inativos.

4.6.5. Investigação do efeito da força iônica nos estados de oligomerização

Avaliou-se as possíveis interferências da força iônica do meio na organização dos estados multiméricos da DevS, empregando-se NaCl de 0 a 150 mM. Todavia, a mudança mais evidente ocorreu entre 0 e 50 mM de NaCl, sendo mantido praticamente uniforme as quantidades relativas dos estados oligoméricos entre 50 e 150 mM de NaCl, como observado na Figura 33. Convém mencionar que o deslocamento dos picos observado nos cromatogramas da Figura 33, são também observados na injeção de proteínas padrões sob as mesma condições, o que deve afetar fatores associados a permeação/interação com a coluna. Entretanto, as quantidades relativas são ainda assim pouco afetadas.

Figura 31 – Cromatogramas da oxi-DevS a 1 μ M em coluna de filtração em gel, com variadas concentrações de NaCl: 0, 50, 100 e 150 mM, em tampão Tris 50 mM, pH 7.4. Em B mostra-se a variação das frações dos estados oligoméricos com o aumento da salinidade.



De acordo com Burns *et al.* (2016), o aumento da salinidade também não provocou nas proteínas ali investigadas mudanças significativas nas frações relativas dos estados oligoméricos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos de desnaturação do domínio GAF-A, que contém o grupo heme, indicaram que o cloreto de guanidínio, GndHCl, é o agente mais efetivo na desnaturação química da proteína que ureia. Tais resultados sugerem que interações iônicas sejam possivelmente críticos para sustentar tal domínio, justificando essa observação. Adicionalmente, foi observado uma menor estabilidade frente a desnaturação da proteína na forma ligada ao CO, o que poderia ser justificada pela menor interação deste ligante aos resíduos distais, o que com oxigênio promove formação de ligações de hidrogênio. Apesar destes resultados não fornecerem informações quanto a estabilidade global da proteína, pode-se inferir uma estabilidade local.

Os estudos por fluorescência intrínseca indicaram alterações modestas mas consistentes, quando a proteína DevS encontra-se na forma ativa e inativa. Considerando que dispõe-se de três triptofanos localizados aproximadamente em cada um dos domínios (W215, W369 e W572), não seria inesperado que emissão global deles indicassem mudanças. Tal como observado por filtração em gel que há alterações nos estados de oligomerização, estes múltiplos estados devem, certamente, afetar um ou mais desses triptofanos durante esse fenômeno. Na verdade, caso se cheque o posicionamento destes triptofanos nas estruturas de raios-X resolvidas, pode-se vislumbrar seu posicionamento em aparentes interfaces. Apesar de que não temos como atribuir que na formação desses tetrâmeros e octâmeros tais resíduos estejam envolvidos e que façam parte das interfaces de interação.

Outros estudos empregando fluorescência extrínseca com bis-ANS foram importantes para avaliar as afinidades de metais divalentes a esta proteína, que seguiram a ordem $Mg^{2+} < Ca^{2+} < Mn^{2+} < Zn^{2+}$. Curiosamente, não se observou mudanças significativas medindo tais afinidades seja na forma inativa da proteína ou na forma ativa, indicando que mesmo com as evidentes alterações de estados de oligomerização provocadas não se afetaria a afinidade aos íons divalentes. Caso ocorresse tal efeito, seria uma elegante forma de se modular a atividade enzimática, uma vez que a atividade histidina quinase é completamente dependente da

presença de certos íons metálicos (ex. Mg^{2+} e Mn^{2+}). Ainda assim, excluir esse mecanismo de regulação é relevante para definir como ocorre a transdução de sinal.

Os estudos por dicroísmo circular sustentaram que não há alterações nas estruturas secundárias durante a ativação ou inativação enzimática da DevS, o que se mostra compatível com as observações de que na verdade ocorre somente mudanças nos estados de oligomerização, sem efeito nas estruturas secundárias. Não menos interessante, na região do visível referente ao grupo heme, evidenciou-se um comportamento inalterado dos sinais da banda Soret em todos os estados ativos e inativos, contrário ao observado para a proteína FixL. Estes resultados sustentam que não haveria para DevS, durante sua ativação e inativação, qualquer efeito significativo de reorganização dos grupos propionatos/vinil, responsáveis chaves por este sinal de CD. Isso vem a reforçar essa medição como importante ferramenta para avaliar esse tipo de fenômeno, que na verdade se mostra bastante comum para várias hemeoproteínas sensoras, ex. FixL, guanilato ciclase solúvel, mas que para DevS não se mostra atuante.

Mesmo que as informações anteriores sejam importantes para a compreensão do sistema em estudo, o resultado mais significativo deste trabalho foi identificar o modo de transdução de sinal atuante no sensor DevS. Dependendo do estado da DevS, se enzimaticamente ativa ou inativa, observou-se uma brusca alteração nos estados de oligomerização. Interessantemente, no estado ativo temos majoritariamente o estado octamérico, bastante não usual para essas proteínas, enquanto que no estado inativo temos majoritariamente as formas tetraméricas e diméricas. O fator de inativação define a resposta provocada por um ligante na regulação da atividade enzimática de uma hemeoproteína sensora. Mostrando-se ainda como o único caso em que tal regulação deve funcionar efetivamente numa rápida resposta. Entender como essas interfaces se organizam para originar octâmeros versus tetrâmero torna-se de grande relevância e poderá levar ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que atuem bloqueando a formação dos octâmeros, inativando o sistema DevS, que poderá afetar a dormência do *Mycobacterium tuberculosis*.

REFERÊNCIAS

- 1 BRASIL, M.d.S.; Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica. **Manual técnico para o controle da tuberculose**: cadernos de atenção básica. Ministério da Saúde: Brasília, 2002.
- 2 WAYNE, L.G. e HAYES, L.G., An in vitro model for sequential study of shutdown of Mycobacterium tuberculosis through two stages of nonreplicating persistence. **Infect Immun**, 64(6), p. 2062-9, 1996.
- 3 WAYNE, L.G. e SOHASKEY, C.D., Nonreplicating persistence of mycobacterium tuberculosis. **Annu Rev Microbiol**, 55, p. 139-63, 2001.
- 4 NEYROLLES, O.; WOLSCHEENDORF, F.; MITRA, A. e NIEDERWEIS, M., Mycobacteria, metals, and the macrophage. **Immunol Rev**, 264(1), p. 249-63, 2015.
- 5 RODRIGUEZ, G.M. e NEYROLLES, O., Metallobiology of Tuberculosis. **Microbiol Spectr**, 2(3), 2014.
- 6 ORGANIZATION, W.H., **Global tuberculosis report 2017**. Geneva: World Health Organization, 2017.
- 7 ORGANIZATION, W.H., **Global tuberculosis report 2016**. Geneva: World Health Organization, 2016.
- 8 LEHNINGER, A.L., **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4. Ed. ed. São Paulo, 2006.
- 9 SOUSA, E.H.; LOPES, L.G.; GONZALEZ, G. e GILLES-GONZALEZ, M.A., Drug discovery targeting heme-based sensors and their coupled activities. **J Inorg Biochem**, 167, p. 12-20, 2017.
- 10 CHAN, C.; PAUL, R.; SAMORAY, D.; AMIOT, N.C.; GIESE, B.; JENAL, U. e SCHIRMER, T., Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101(49), p. 17084-9, 2004.
- 11 DE, N.; NAVARRO, M.V.; RAGHAVAN, R.V. e SONDERMANN, H., Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator WspR. **J Mol Biol**, 393(3), p. 619-33, 2009.
- 12 BURNS, J.L.; RIVERA, S.; DEER, D.D.; JOYNT, S.C.; DVORAK, D. e WEINERT, E.E., Oxygen and Bis(3',5')-cyclic Dimeric Guanosine

- Monophosphate Binding Control Winterization State Equilibrate of Disgruntle Cyclase-Containing Globin Coupled Sensors. **Biochemistry**, 55(48), p. 6642-6651, 2016.
- 13 ORTIZ DE MONTELLANO, P.R., Heme and I. **The Journal of Biological Chemistry**, 290(36), p. 21833-21844, 2015.
 - 14 BREWITZ, H.H.; HAGELUEKEN, G. e IMHOF, D., Structural and functional diversity of transient heme binding to bacterial proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1861(3), p. 683-697, 2017.
 - 15 GILLES-GONZALEZ, M.-A. e GONZALEZ, G., Chapter 2 - A Surfeit of Biological Heme-based Sensors A2. *In*: GHOSH; ABHIK, **The Smallest Biomolecules: Diatomics and their Interactions with Heme Proteins**. Amsterdam: Elsevier, 2008, p. 18-65.
 - 16 GILLES-GONZALEZ, M.A.; DITTA, G.S. e HELINSKI, D.R., A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. **Nature**, 350(6314), p. 170-172, 1991.
 - 17 SHIMIZU, T.; HUANG, D.; YAN, F.; STRANAVA, M.; BARTOSOVA, M.; FOJTÍKOVÁ, V. e MARTÍNKOVÁ, M., Gaseous O₂, NO, and CO in Signal Transduction: Structure and Function Relationships of Heme-Based Gas Sensors and Heme-Redox Sensors. **Chemical Reviews**, 115(13), p. 6491-6533, 2015.
 - 18 SOUSA, E.H.S.; TUCKERMAN, J.R.; GONZALEZ, G. e GILLES-GONZALEZ, M.-A., DosT and DevS are oxygen-switched kinases in *Mycobacterium tuberculosis*. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, 16(8), p. 1708-1719, 2007.
 - 19 ROBERTS, D.M.; LIAO, R.P.; WISEDCHAISRI, G.; HOL, W.G. e SHERMAN, D.R., Two sensor kinases contribute to the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Biol Chem**, 279(22), p. 23082-7, 2004.
 - 20 IOANOVICIU, A., YUKL, E.T.; MOENNE-LOCCOZ, P. e DE MONTELLANO, P.R., DevS, a heme-containing two-component oxygen sensor of *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemistry**, 46(14), p. 4250-60, 2007.
 - 21 SIVARAMAKRISHNAN, S. e ORTIZ DE MONTELLANO, P.R., The DosS-DosT/DosR Mycobacterial Sensor System. **Biosensors**, 3(3), p. 259-282, 2013.

- 22 YUKL, E.T.; IOANOVICIU, A.; ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. e MOËNNE-LOCCOZ, P., Interdomain Interactions within the Two-Component Heme-Based Sensor DevS from *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemistry**, 46(34), p. 9728-9736, 2007.
- 23 NICHOLAS C. PRICE, J.N., **Exploring Proteins: a student's guide to experimental skills and methods**, ed. O.U. Press. 2009.
- 24 GUIMARAES, W.G.; GONDIM, A.C.S.; COSTA, P.; GILLES-GONZALEZ, M.A.; LOPES, L.G.F.; CAREPO, M.S.P. e SOUSA, E.H.S., Insights into signal transduction by a hybrid FixL: Denaturation study of on and off states of a multi-domain oxygen sensor. **J Inorg Biochem**, 172, p. 129-137, 2017.
- 25 CABALLERO-HERRERA, A.; NORDSTRAND, K.; BERNDT, K.D. e NILSSON, L., Effect of urea on peptide conformation in water: molecular dynamics and experimental characterization. **Biophys J**, 89(2), p. 842-57, 2005.
- 26 MYERS, J.K.; PACE, C.N. e SCHOLTZ, J.M., Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. **Protein Sci**, 4(10), p. 2138-48, 1995.
- 27 BASUDHAR, D.; MADRONA, Y.; YUKL, E.T.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; NISHIDA, C.R.; MOENNE-LOCCOZ, P. e ORTIZ DE MONTELLANO, P.R., Distal Hydrogen-bonding Interactions in Ligand Sensing and Signaling by *Mycobacterium tuberculosis* DosS. **J Biol Chem**, 291(31), p. 16100-11, 2016.
- 28 LEE, A.J.; CLARK, R.W.; YOUN, H.; PONTER, S. e BURSTYN, J.N., Guanidine hydrochloride-induced unfolding of the three heme coordination states of the CO-sensing transcription factor, CooA. **Biochemistry**, 48(28), p. 6585-97, 2009.
- 29 F. JAMES HOLLER, D.A.S., Stanley R.Crouch, **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009, 1056.
- 30 LAKOWICZ, J.R., **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 2nd ed. United States of America: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.
- 31 RIBELATTO, J.C.; POLI, A.L.; MOREIRA, L.M. e IMASATO, H., Hemes férricos pentacoordenados e hexacoordenados dos monômeros d nativo e reconstituído da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*: estudos espectroscópicos em meio ácido. **Química Nova**, 28, p. 829-833, 2005.

- 32 MARTHA H. STIPANUK, M.A.C., **Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition**. 3rd ed. ed.: Elsevier Health Sciences, 2013, 968.
- 33 GILLES-GONZALEZ, M.A. e GONZALEZ, G., Regulation of the kinase activity of heme protein FixL from the two-component system FixL/FixJ of *Rhizobium meliloti*. **J Biol Chem**, 268(22), p. 16293-7, 1993.
- 34 CHO, H.Y.; LEE, Y.H.; BAE, Y.S.; KIM, E. e KANG, B.S., Activation of ATP binding for the autophosphorylation of DosS, a *Mycobacterium tuberculosis* histidine kinase lacking an ATP lid motif. **J Biol Chem**, 288(18), p. 12437-47, 2013.
- 35 WILLIAM J. MARSHALL, M.L., **Bioquímica Clínica: Aspectos Clínicos e Metabólicos**. Tradução da 3 ed.: Elsevier Editora Ltda., 2016, 976.
- 36 MARCELA RODRIGUEZ, G. e NEYROLLES, O., Metallobiology of Tuberculosis. **Microbiology Spectrum**, 2(3), 2014.
- 37 PADILLA-BENAVIDES, T.; LONG, J.E.; RAIMUNDA, D.; SASSETTI, C.M. e ARGUELLO, J.M., A novel P(1B)-type Mn²⁺-transporting ATPase is required for secreted protein metallation in mycobacteria. **J Biol Chem**, 288(16), p. 11334-47, 2013.
- 38 HAWE, A.; SUTTER, M. e JISKOOT, W., Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization. **Pharmaceutical Research**, 25(7), p. 1487-1499, 2008.
- 39 VALENTINE, I.B.H.B.G.E.I.S.J.S., **Biological Inorganic Chemistry: structure and reactivity**. United States of America: University Science Books, 2007.
- 40 KELLY, S.M.; JESS, T.J. e PRICE, N.C., How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, 1751(2), p. 119-139, 2005.
- 41 HENNESSEY, J.P. e JOHNSON, W.C., Information content in the circular dichroism of proteins. **Biochemistry**, 20(5), p. 1085-1094, 1981.
- 42 PEREZ-IRATXETA, C. e ANDRADE-NAVARRO, M.A., K2D2: Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. **BMC Structural Biology**, 8(1), p. 25, 2008.

- 43 WHITMORE, L. e WALLACE, B.A., Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, 89(5), p. 392-400, 2008.
- 44 YUKL, E.T.; IOANOVICIU, A.; NAKANO, M.M.; ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. e MOËNNE-LOCCOZ, P., A distal tyrosine residue is required for ligand discrimination in devS from *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemistry**, 47(47), p. 12532-12539, 2008.
- 45 NAGAI, M.; NAGAI, Y.; IMAI, K. e NEYA, S., Circular dichroism of hemoglobin and myoglobin. **Chirality**, 26(9), p. 438-42, 2014.
- 46 GUIMARÃES, Wellinson Gadêlha. **FixL Híbrida da Bactéria *Rhizobium etli*: Estudos Conformacionais e de Estabilidade**. 2016. 74 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- 47 CHANGEUX, J.P. e CHRISTOPOULOS, A., Allosteric Modulation as a Unifying Mechanism for Receptor Function and Regulation. **Cell**, 166(5), p. 1084-1102, 2016.
- 48 MONOD, J.; WYMAN, J. e CHANGEUX, J.P., On the nature of allosteric transitions: a plausible model. **J Mol Biol**, 12, p. 88-118, 1965.
- 49 BURNS, J.L.; DOUGLAS DEER, D. e WEINERT, E.E., Oligomeric state affects oxygen dissociation and diguanylate cyclase activity of globin coupled sensors. **Molecular BioSystems**, 10(11), p. 2823-2826, 2014.
- 50 WISEDCHAISRI, G.; WU, M.; RICE, A.E.; ROBERTS, D.M.; SHERMAN, D.R. e HOL, W.G., Structures of *Mycobacterium tuberculosis* DosR and DosR-DNA complex involved in gene activation during adaptation to hypoxic latency. **J Mol Biol**, 354(3), p. 630-41, 2005.