



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

WELLINSON GADÊLHA GUIMARÃES

FixL HÍBRIDA DA BACTÉRIA *Rhizobium etli*: ESTUDOS
CONFORMACIONAIS E DE ESTABILIDADE

FORTALEZA

2016

WELLINSON GADÊLHA GUIMARÃES

FIXL HÍBRIDA DA BACTÉRIA *Rhizobium etli*: ESTUDOS CONFORMACIONAIS
E DE ESTABILIDADE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química. Área de Concentração: Química Inorgânica.

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

Co-orientadora: Dra. Marta Sofia Peixe Carepo

FORTALEZA

2016

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)

W478f Wellinson Gadêlha, Guimarães.

FixL Híbrida da Bactéria *Rhizobium etli* : estudos conformacionais e de estabilidade / Guimarães
Wellinson Gadêlha. – 2016.
74 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação
em Química, Fortaleza, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa.
Coorientação: Profa. Dra. Marta Sofia Peixe Carepo.

1. Heme proteína sensora. 2. FixL. 3. Conformação. 4. Estabilidade. 5. Desnaturação. I. Título.

CDD 540

WELLINSON GADÊLHA GUIMARÃES

FixL HÍBRIDA DA BACTÉRIA *Rhizobium etli*: ESTUDOS CONFORMACIONAIS
E DE ESTABILIDADE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química. Área de Concentração: Química Inorgânica.

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

Co-orientadora: Dra. Marta Sofia Peixe Carepo

Aprovada em: 18/07/2016.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Eduardo Henrique, por me permitir trabalhar numa área tão interessante, pelos conhecimentos transmitidos e pela inspiração gerada ao ver alguém tão engajado na pesquisa e ao lecionar.

À Marta, por ser tão paciente ensinando alguém com tão pouca experiência, por tudo que me ensinou, por me fazer pensar de forma mais crítica, pela sensatez transmitida, por me fazer ter compromisso com o trabalho e pela sensação de acolhimento que eu sempre senti perto dela.

Aos demais companheiros da “Bioquímica da Bioinorgânica”, Ana Claudia, Mikael, Nathalie, Gustavo, Josi, Marie e Gian, pela colaboração em muitas etapas do trabalho.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) pela oportunidade e toda a estrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do programa de pós-graduação em Química da UFC.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), pela bolsa concedida e auxílio financeiro disponibilizado para esta pesquisa.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, os quais sabem o quão são importantes para mim, e que foram fundamentais para que tudo desse certo, muitas vezes de forma indireta, ajudando-me a manter o equilíbrio exigido nos estudos.

À minha família, pelo apoio dado ao longo de todo esse processo de formação acadêmica.

RESUMO

Heme proteínas sensoras (HPS) são uma classe de heme proteínas cujos estudos são relativamente recentes. As HPS são capazes de se ligar reversivelmente a moléculas como O₂, CO e NO por meio do ferro do seu grupo heme, o que leva a alterações estruturais que governam as respostas adaptativas, tornando-as ativas ou inativas para uma resposta. A FixL é uma histidina quinase encontrada em várias bactérias do gênero *Rhizobium*, estando envolvida nos processos de respiração microaeróbica e no metabolismo do nitrogênio. Esta proteína tem sido bastante estudada, sendo considerada um sistema modelo para heme proteínas sensoras que desempenham função histidina quinase, e cuja elucidação mecânica pode ajudar a entender diversos sistemas semelhantes.

Neste trabalho foi produzida e purificada a proteína FixL da bactéria *Rhizobium etli*, única do gênero estudada até agora, tendo como finalidade investigar aspectos conformacionais e de estabilidade. Desta forma, empregou-se espectroscopia de dicroísmo circular (CD) para estimar os tipos de estrutura secundária desta proteína em seu estado nativo, sendo revelado que sua estrutura se encontra majoritariamente na forma de α -hélices. Posteriormente, foram investigadas as possíveis alterações conformacionais que a proteína sofre por ocasião da mudança na sua atividade enzimática provocada por ligantes sinalizadores. Os interessantes resultados obtidos ilustram a potencialidade da técnica de CD e espectroscopia eletrônica em avaliar alterações estruturais de um estado ativo para inativo que ocorrem aparentemente através da mudança das estruturas terciárias. Os resultados sugerem que as interações do grupo heme com as cadeias protéicas laterais próximas estão envolvidas na perda de atividade da FixL ao se ligar ao O₂ ou ao CN⁻. Por fim, os estudos de estabilidade por desnaturação térmica e química mostraram que a FixL é menos estável que diversas outras heme proteínas, e que existem diferenças significativas de estabilidade entre o estado ativo e o estado inativo, particularmente quanto à desnaturação química, apesar de não haverem diferenças significativas em relação à estabilidade térmica. Essas diferenças na estabilidade foram explicadas à luz de um modelo em que a proteína se torna mais compacta quanto está enzimaticamente ativa através de interações inter/intra domínios.

Palavras-chave: Heme proteína sensora. FixL. Conformação. Estabilidade. Desnaturação.

ABSTRACT

Heme-based sensors are a class of hemeproteins that studies are relatively recent. Heme-based sensor are capable to reversibly bind to molecules such as O₂, CO and NO ligands through iron atom, leading to conformational changes that govern adaptive responses, make them active or inactive to a response. FixL is a histidine kinase found in several bacteria *Rhizobium*, being involved in microaerobic respiration and nitrogen metabolism processes. This protein has been extensively studied and is considered a model system to heme-based sensors that are histidine kinases. Its mechanistic elucidation may help to understand many similar systems.

In this work protein FixL from *Rhizobium etli*, until now one only of genre that was studied, was produced and purified aiming to investigate conformational and stability aspects. Therefore, it was used Circular Dichroism (CD) to estimate the kind of secondary structure in FixL in a active state. It was revealed that it is majority organized on α -helices. After, it was investigated the possible conformational changes that FixL protein may have when its activity is changed due to be bounded to a signaling ligand. Interesting results obtained suggest the potential use of CD technique and electronic spectroscopy to assess structural changes from an active state to inactive one that apparently occur by changing the tertiary structures. The results suggest that the heme interactions with nearby protein side chains are involved in loss of activity from FixL to bind O₂ or CN. Finally, stability studies by thermal and chemical denaturation showed that FixL is less stable than many other heme proteins, and that there are significant differences in stability between the active state and the inactive state, particularly with regard to chemical denaturation, although not had significant differences in the thermal stability. These differences in stability were explained in the light of a model in which the protein becomes more compact when it is enzymatically active by interaction inter / intra domains.

Keywords: Heme-based sensor. FixL. Conformation. Stability. Denaturation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fórmulas estruturais de diferentes tipos de grupo heme. A) Heme- <i>b</i> (complexo ferro-protoporfirina IX); B) Heme- <i>c</i> (cadeia protéica representada por linha curva ligando átomos de enxofre).....	18
FIGURA 2 – Representação esquemática da estrutura de raio-X do domínio PAS contendo o grupo heme na FixL de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> no estado ferroso pentacoordenado, PDB2vv7.....	21
FIGURA 3 – Representação esquemática dos domínios das proteínas FixL de <i>Rhizobium meliloti</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Rhizobium etli</i>	22
FIGURA 4 – Representação esquemática do funcionamento do sistema de dois componentes FixL/FixJ.....	22
FIGURA 5 – Esquema do processo de purificação da proteína FixL híbrida da bactéria <i>Rhizobium etli</i>	33
FIGURA 6 – Perfil de purificação da ReFixL. A) Gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) das frações protéicas isoladas nas etapas do processo de purificação da proteína FixL. B) Espectros eletrônicos UV-Vis da FixL após cada etapa de purificação cromatográfica.....	39
FIGURA 7 – Espectros de UV-Vis na faixa de comprimento de onda de 350 a 650 nm das diferentes formas da FixL. A) FixL <i>met</i> (Fe ³⁺) e FixL <i>cianomet</i> (Fe ³⁺ -CN ⁻); B) FixL <i>deoxi</i> (Fe ²⁺) e FixL <i>oxi</i> (Fe ²⁺ -O ₂); e C) FixL <i>carboxi</i> (Fe ²⁺ -CO).....	41
FIGURA 8 – Representação esquemática do fenômeno de dicroísmo circular.....	43
FIGURA 9 – Espectro de dicroísmo circular para a FixL-Fe ²⁺ (<i>deoxi</i>) na região do espectro entre 190 e 240 nm, cubeta com caminho ótico de 0,1 cm, proteína na concentração de 1 μmol L ⁻¹ , velocidade de varredura de 100 nm/min, 10	

acumulações de espectro.....	45
FIGURA 10 – Espectros de dicroísmo circular na região do ultravioleta distante (<i>far-UV</i>) para FixL nas formas <i>met</i> (FixL-Fe ³⁺), <i>cianomet</i> (FixL-Fe ³⁺ -CN ⁻) e <i>deoxi</i> (FixL-Fe ²⁺). Caminho ótico de 0,1 cm, proteína na concentração de 1 μmol·L ⁻¹ , velocidade de varredura de 100 nm/min, 10 acumulações de espectros.....	47
FIGURA 11 - Espectro de dicroísmo circular na região do ultravioleta próximo (<i>near-UV</i>) para FixL na forma <i>met</i> (FixL-Fe ³⁺) e na forma <i>cianomet</i> (FixL-Fe ³⁺ _CN ⁻). Utilizou-se cubeta com caminho ótico de 1 cm, <i>bandwidth</i> de 1 nm; velocidade de varredura de 50 nm/min, proteína na concentração de 20 μmol L ⁻¹ e 10 acumulações de espectros.....	48
FIGURA 12 – Espectro de dicroísmo circular na região do ultravioleta próximo (<i>near-UV</i>) para FixL nas formas <i>deoxi</i> (FixL-Fe ²⁺), <i>oxi</i> (FixL-Fe ²⁺ -O ₂) e <i>carboxi</i> (FixL-Fe ²⁺ -CO). Utilizou-se cubeta com caminho ótico de 1 cm, <i>bandwidth</i> de 1 nm; velocidade de varredura de 50 nm/min e proteína na concentração de 20 μmol L ⁻¹	49
FIGURA 13 – Espectros de dicroísmo circular na região do ultravioleta próximo (<i>near-UV</i>) para estados ativos e inativos. A) Estados ativos, FixL-Fe ³⁺ e FixL-Fe ²⁺ ; e B) Estados inativos, FixL-Fe ³⁺ -CN ⁻ e FixL-Fe ²⁺ -O ₂ . Caminho ótico de 1 cm, <i>bandwidth</i> de 1 nm; velocidade de varredura de 50 nm/min e proteína na concentração de 20 μmol L ⁻¹	49
FIGURA 14 – Representação esquemática dos domínios da proteína ReFixL, com indicação da localização relativa dos aminoácidos aromáticos.....	50
FIGURA 15 – Espectro de dicroísmo circular na região do visível para FixL nas formas <i>met</i> (FixL-Fe ³⁺) e <i>cianomet</i> (FixL-Fe ³⁺ -CN ⁻). Caminho ótico de 1 cm, <i>bandwidth</i> de 1 nm; velocidade de varredura de 50 nm/min e proteína na concentração de 20 μmol L ⁻¹	51

FIGURA 16 – Estruturas de raios-X resolvidas da proteína BjFixL em diferentes formas mostrando interações (linhas pontilhadas) entre ligantes e uma arginina conservada, e entre os grupos propionatos e aminoácidos laterais ao grupo heme.....	52
FIGURA 17 – Espectro de dicroísmo circular na região do ultravioleta e visível para FixL-Fe ²⁺ na forma pentacoordenada (<i>deoxi</i>), coordenado ao O ₂ (<i>oxi</i>) e coordenado ao CO. Caminho ótico de 1 cm, <i>bandwidth</i> de 1 nm; velocidade de varredura de 50 nm/min e proteína na concentração de 20 μmol L ⁻¹	54
FIGURA 18 – Perfis de desnaturação térmica (<i>Melting curves</i>) para a FixL. A) Na forma <i>met</i> (FixL-Fe ³⁺); B) na forma <i>cianomet</i> (FixL-Fe ³⁺ -CN ⁻); e C) na forma <i>deoxi</i> (FixL-Fe ²⁺). Elipticidade de resíduo principal acompanhada a 222 nm, utilizando cubeta com caminho ótico de 0,1 cm, proteína na concentração de 1,3 μmol L ⁻¹ e velocidade de varredura de 100 nm/min, resultado de três medidas independentes.....	56
FIGURA 19 – Espectros de dicroísmo circular para FixL <i>met</i> e efeitos do metal divalente (Mg ²⁺) e ATP.....	59
FIGURA 20 – Espectros eletrônicos na região do UV-Vis da FixL na concentração de 4 μmol L ⁻¹ após incubação com diferentes concentrações uréia. A) FixL-Fe ³⁺ (<i>met</i>), B) FixL-Fe ³⁺ -CN ⁻	61
FIGURA 21 – Desnaturação química da FixL empregando-se uréia. Perfil de desnaturação usando variação do máximo de absorção da banda <i>Soret</i> da FixL na concentração de 4 μmol L ⁻¹ após incubação com uréia em diferentes concentrações para A) FixL-Fe ³⁺ (<i>met</i>) e B) FixL-Fe ³⁺ - CN ⁻	62
FIGURA 22 - Espectros Dicroísmo Circular da FixL na concentração de 1,6 μmol L ⁻¹ após incubação com diferentes concentrações uréia. A) FixL-Fe ³⁺ (<i>met</i>), B) FixL-Fe ³⁺ - CN ⁻ a temperatura de 25 °C	66

FIGURA 23 – Desnaturação química da FixL empregando-se uréia. Perfil de desnaturação usando variação da elipticidade a 222 nm no espectro de CD da FixL na concentração de $1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ após incubação com uréia em diferentes concentrações..... 67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Valores dos comprimentos de onda das absorções máximas da banda de <i>Soret</i> e bandas <i>Q</i> do grupo heme da proteína FixL em diferentes formas.....	17
TABELA 2 – Composição dos géis usado na eletroforese SDS-PAGE.....	31
TABELA 3 – Desnaturação térmica, valores de T_m e ΔH de <i>folding</i> para FixL na formas <i>met</i> , <i>cianomet</i> e <i>deoxi</i>	57
TABELA 4 – Parâmetros para a desnaturação química da FixL- Fe^{3+} (<i>met</i>) e FixL- Fe^{3+} - CN^- por meio do modelo de desnaturação em dois estados acompanhada por UV-Vis no máximo da banda <i>Soret</i> e por CD pela elipticidade a 222nm.....	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	O Grupo Heme.....	16
1.2	Proteínas FixL.....	18
2	JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	23
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	24
3.1	Gene.....	24
3.2	Crescimento celular e expressão.....	24
3.2.1	Transformação e Pré-inóculo.....	24
3.2.2	Expressão da Proteína FixL.....	25
3.3	Purificação.....	27
3.3.1	Lise das células.....	28
3.3.2	Precipitação da fração protéica contendo FixL.....	29
3.3.3	Coluna Fenil-sefarose.....	29
3.3.4	Coluna de Troca Aniônica (DEAE).....	30
3.3.5	Coluna de Exclusão em Gel.....	30
3.4	Dicroísmo Circular.....	33
3.4.1	Obtenção das diferentes formas da FixL.....	33
3.4.2	Estrutura secundária da FixL.....	34
3.4.3	Curvas de desnaturação térmica e T_m da FixL.....	34
3.4.4	FixL em presença de Mg^{2+} e ATP.....	35
3.5	Desnaturação com uréia.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1	Purificação da proteína FixL híbrida da <i>Rhizobium etli</i>	38
4.2	Diferentes formas da FixL obtidas.....	39
4.3	Investigação das estruturas da FixL utilizando Dicroísmo Circular (CD).....	41
4.3.1	Estrutura secundária.....	43
4.3.2	Mudanças na conformação de formas ativas e inativas.....	45
4.4	Temperatura de Desnaturação (<i>Melting Temperature</i> , T_m).....	54
4.6	Investigação conformacional com o cátion divalente (Mg^{2+}) e ATP.....	57
4.7	Desnaturação com uréia.....	59
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

Hemeproteínas sensoras (HPS) são proteínas que contêm além de um domínio contendo o grupo heme um outro domínio funcional. O grupo heme é, geralmente, capaz de se ligar a pequenas moléculas gasosas tais como O₂, CO e NO. A ligação a estas moléculas gasosas promove alterações nos domínios funcionais da proteína sensora que vão modular a resposta adaptativa celular a variações nos níveis destas moléculas (GILLES-GONZALEZ; GONZALEZ, 2005).

As heme proteínas sensoras são encontradas em todos os reinos da natureza, de organismos procariontes a eucariontes, possuem diversas funções biológicas, e podem estar envolvidas, por exemplo, na fixação de nitrogênio em bactérias (GILLES-GONZALEZ; GONZALEZ, 1993). Dentre os exemplos de hemeproteínas sensoras descritas na literatura, podemos citar a guanilato ciclase solúvel (sGC), uma enzima encontrada em mamíferos, que está envolvida no processo de contração do músculo liso vascular, agregação plaquetária e memória, dependentes da resposta ao NO (DIERKS; BURSTYN, 1996); a CooA, um regulador transcricional que controla o metabolismo do monóxido de carbono (CO) em uma bactéria do gênero *Rhodospirillum* (AONO; NAKAJIMA, 1999); e a FixL encontrada por exemplo na bactéria *Sinorhizobium meliloti*, uma quinase histidínica que governa a expressão de genes responsáveis pela fixação de nitrogênio (TUCKERMAN; GONZALEZ; GILLES-GONZALEZ, 2001).

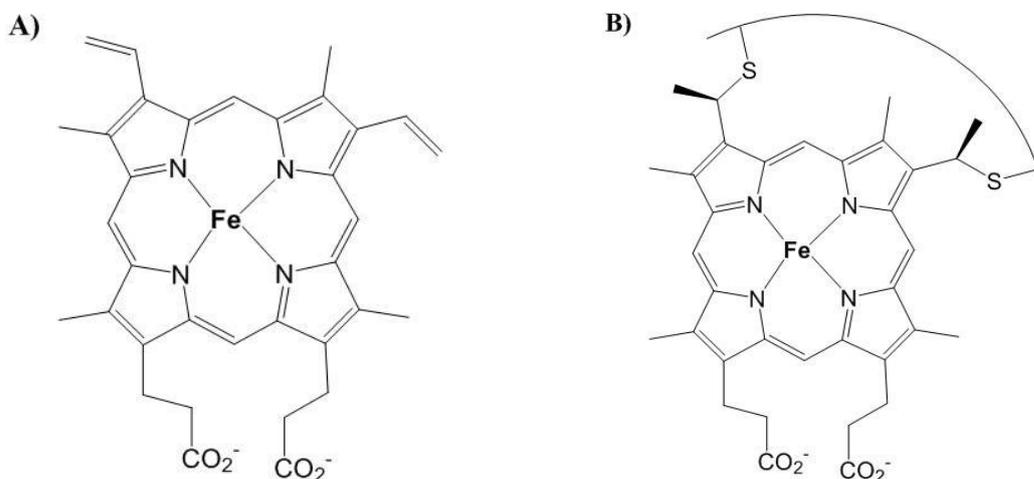
1.1 O Grupo Heme

O grupo heme é formado por um sistema de anel heterocíclico derivado da porfirina, contendo um átomo de ferro central. São quatro anéis pirrólicos unidos por átomos de carbono, e geralmente por quatro substituintes metila, dois propionatos e dois grupos vinila. Esse macrociclo sem o átomo metálico central é denominado de protoporfirina IX (MOREIRA *et al.*, 2011).

Existem algumas variações observadas para o grupo heme, cujas mudanças se dão nos grupos substituintes do anel protoporfirínico. As formas mais comuns de se encontrar esse grupo são como heme-*b* e heme-*c*. O heme-*b* é um complexo ferro-protoporfirina IX que não se liga covalentemente à proteína através do macrociclo (FIGURA 1-a). Por outro lado, no grupo heme-*c* são estabelecidas ligações covalentes do tipo tioéter entre cisteínas da proteína e os grupos vinila do macrociclo (FIGURA 1-

b). Além dessas formas mais comuns para o grupo heme, existem também os grupos heme-*a*, heme-*d*₁ e heme-*o* (BOWMAN; BREN, 2008).

FIGURA 1 – Fórmulas estruturais de diferentes tipos de grupo heme. A) Heme-*b* (complexo ferro-protoporfirina IX); B) Heme-*c* (cadeia protéica representada por linha curva ligando átomos de enxofre).



Fonte: o autor.

Os complexos formados como grupo heme nas hemeproteínas assumem dois arranjos ideais com respeito ao átomo de ferro: octaédrico, quando o ferro encontra-se hexacoordenado, ou piramidal quadrado, quando encontra-se pentacoordenado. Nas hemeproteínas temos quatro dos ligantes fornecidos pelo anel porfirínico através das suas ligações estabelecidas com os átomos de nitrogênio ao ferro; enquanto o quinto ligante vem de resíduos de aminoácidos da própria cadeia protéica. O sexto ligante, quando presente, pode ser uma molécula de H₂O, O₂, CO, NO ou outro ligante específico, inclusive de aminoácidos da própria cadeia protéica, dependendo da hemeproteína. Os dois ligantes distintos daqueles fornecidos pela protoporfirina são ditos ligantes axiais, e ficam perpendiculares ao plano do anel (RAFFERTY; DAYER, 2015). O grupo heme contendo um átomo de ferro pentacoordenado é caracteristicamente de spin alto, ao passo que ao se tornar hexacoordenado ele poderá ser de spin alto ou spin baixo, dependendo da natureza dos ligantes axiais. Ligantes como a histidina e a metionina, que são de campo forte, fazem com que se observe o ferro na configuração de spin baixo (FONSECA; PAQUETE; LOURO, 2014).

As hemeproteínas sensoras possuem geralmente um grupo heme do tipo *b*, onde o nitrogênio do anel imidazólico de um resíduo de histidina da cadeia protéica se

coordena à uma das posições axiais de coordenação (CHO *et al.*, 2009; GONG *et al.*, 1998; PARK *et al.*, 2004).

1.2 Proteínas FixL

Os genes *fixL* que codificam proteínas sensoras FixL foram primeiramente descobertos em bactérias do gênero *Rhizobium*. Nesses organismos a proteína FixL desempenha as seguintes funções: permite a sobrevivência na ausência de O₂, regula a expressão de genes responsáveis pela fixação de nitrogênio e por processos de desnitrificação sob condições de hipóxia (GONZALEZ, 2008).

Estudos espectroscópicos mostram que as proteínas FixL se assemelham a hemoglobina humana quanto ao estado eletrônico e à coordenação quando têm o íon ferro do grupo heme na forma de ferro (II), mas diferem quando têm o íon ferro (III). Na hemoglobina, em pH menor que 8, o ferro (III) está associado a uma molécula de água, e o complexo apresenta uma banda de *Soret* intensa em 405 nm no espectro eletrônico de UV-Vis. Nas FixLs, com ferro no mesmo estado de oxidação, essa banda se mostra menos intensa e deslocada para 395nm, indicando pentacoordenação (GILLES-GONZALEZ *et al.*, 1994), o que é confirmado pelas estruturas de raios-X disponíveis (MIYATAKE *et al.*, 1999, 2000). Na FixL da *Rhizobium meliloti* o ferro está ligado ao anel protoporfirínico e ao imidazol de uma histidina da cadeia protéica. Esta ligação é dita proximal e fica perpendicular ao plano do anel (MIYATAKE *et al.*, 2000). Dependendo da presença de outro ligante axial no grupo heme e do tipo de ligante, a FixL apresenta diferenças no espectro eletrônico de absorção. A tabela 1 traz os valores dos máximos de absorção para a banda de *Soret* (banda B) e para as bandas *Q* para diferentes formas da FixL.

A FixL pertence a uma classe de proteínas que formam sistemas de dois componentes. Esses sistemas são responsáveis por um sofisticado mecanismo de estímulo/resposta acoplados. De forma geral, o domínio sensor do sistema de dois componentes trata-se de uma histidina quinase que ao perceber uma alteração no ambiente se autofosforila. Em seguida ocorre a transferência do grupo fosfato para um resíduo de aminoácido do domínio regulador de resposta, que deve desencadear alguma alteração celular para adaptação às mudanças ambientais (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000).

As proteínas FixLs são, além de hemoproteínas, quinases histidínicas. As quinases são enzimas que catalisam a transferência de grupos fosfato de nucleotídeos fosfatados, tipicamente ATP (do inglês, *adenosinetriphosphate* – trifosfato de adenosina), para seus substratos. Um cátion divalente como o Mg^{2+} ou Mn^{2+} é necessário à reação, desempenhando função estrutural e catalítica na proteína (ROSKOSKI, 2015). Antes de ocorrer a transferência do grupo fosfato, deve haver a autofosforilação, a qual ocorre em condições de hipóxia, quando a proteína FixL encontra-se ativa. Quando a concentração de oxigênio aumenta o ferro do grupo heme no estado 2+ se coordena a ele, o que causa o desligamento reversível na atividade enzimática da proteína (GILLES-GONZALEZ; GONZALEZ, 1993). Similarmente ao observado na FixL, as hemoproteínas quinases DevS e DosT do microrganismo causador da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, foram identificadas como estando ativas em hipóxia e inativas na presença de oxigênio (SOUSA *et al.*, 2007). Essas proteínas estão envolvidas no processo de latência da bactéria devido sua interação com o fator transcricional DevR, seu parceiro nos sistemas de dois componentes (DevS-DevR e DosT-DevR) (ROBERTS *et al.*, 2004; SAINI; MALHOTRA; TYAGI, 2004; SAINI *et al.*, 2004).

TABELA 1 – Valores dos comprimentos de onda das absorções máximas da banda de *Soret* e bandas *Q* do grupo heme da proteína FixL em diferentes formas.

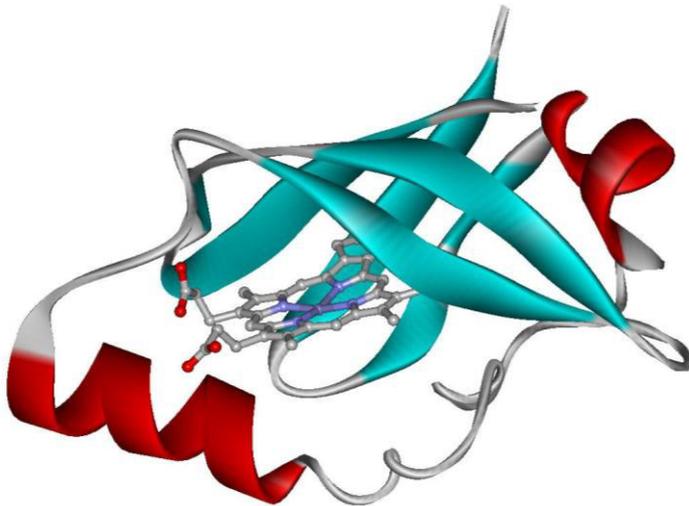
FixL	$\lambda_{\text{máx}}$ <i>Soret</i> (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ Bandas <i>Q</i> (nm)
Fe^{3+} (<i>met</i>)	395 ^a	511 ^c
$Fe^{3+} - CN^{-}$ (<i>cianomet</i>)	422 ^b	571 ^b
Fe^{2+} (<i>deoxy</i>)	435 ^a	563 ^c
$Fe^{2+} - O_2$ (<i>oxy</i>)	418 ^a	541/577 ^d
$Fe^{2+} - CO$ (<i>carboxy</i>)	425 ^a	542/572 ^c

a) GILLES-GONZALEZ *et al.*, 1994; b) WINKLER *et al.*, 1996; c) REYNOLDS *et al.*, 2009; d) MONSON *et al.*, 1992.

As FixLs são quinases histidínicas da família de hemoproteínas PAS. Os domínios PAS (*Per-Arnt-Sim*) estão presentes em diversas proteínas de todos os reinos de seres vivos (GONZALEZ, 2008). Esses domínios são encontrados geralmente próximos a porção N-terminal de proteínas sinalizadoras. Os domínios PAS apresentam uma estrutura tridimensional conservada, apesar de existirem diferenças em sua

estrutura primária (HENRY, J.T. AND CROSSON, 2011). Dentre a estrutura conservada estão as regiões que têm contato direto com o grupo heme, destacando-se um hélice F_{α} que se coordena ao ferro. Há um *loop* FG que se estende dessa hélice até a extremidade do heme contendo os grupos propionatos, duas folhas- β antiparalelas (G_{β} e H_{β}) que continuam do *loop* FG e se alinham ao bolso de ligação no lado distal do grupo heme (GONG *et al.*, 1998). A Figura 3 mostra a estrutura de raios-X resolvida para o domínio PAS da FixL contendo o grupo heme.

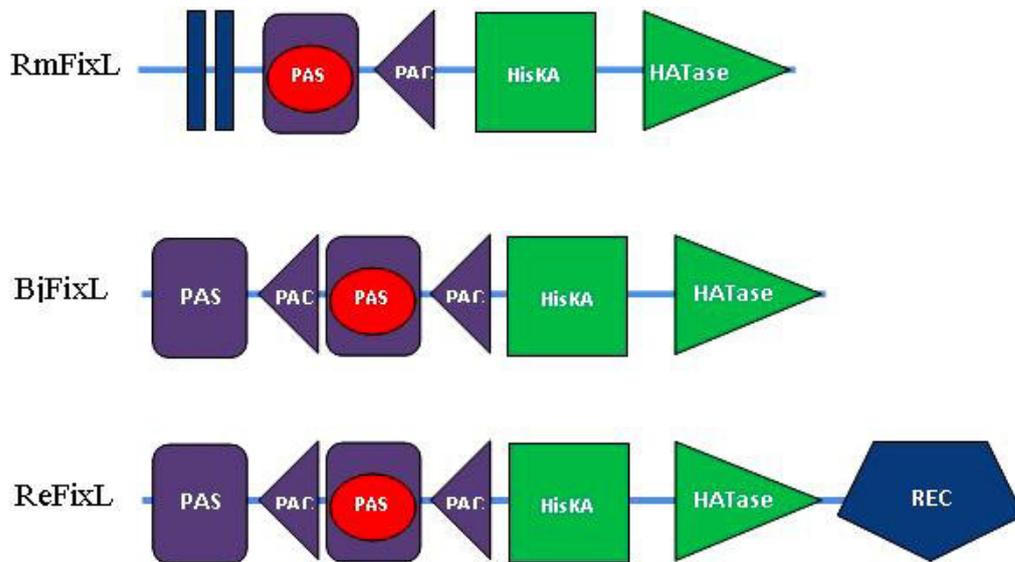
FIGURA 2 – Representação esquemática da estrutura de raio-X do domínio PAS contendo o grupo heme na FixL de *Bradyrhizobium japonicum* no estado ferroso pentacoordenado, PDB 2vv7 (hélices- α estão representadas em vermelho, folhas- β estão representadas em azul).



Fonte: o autor (PDB 2vv7).

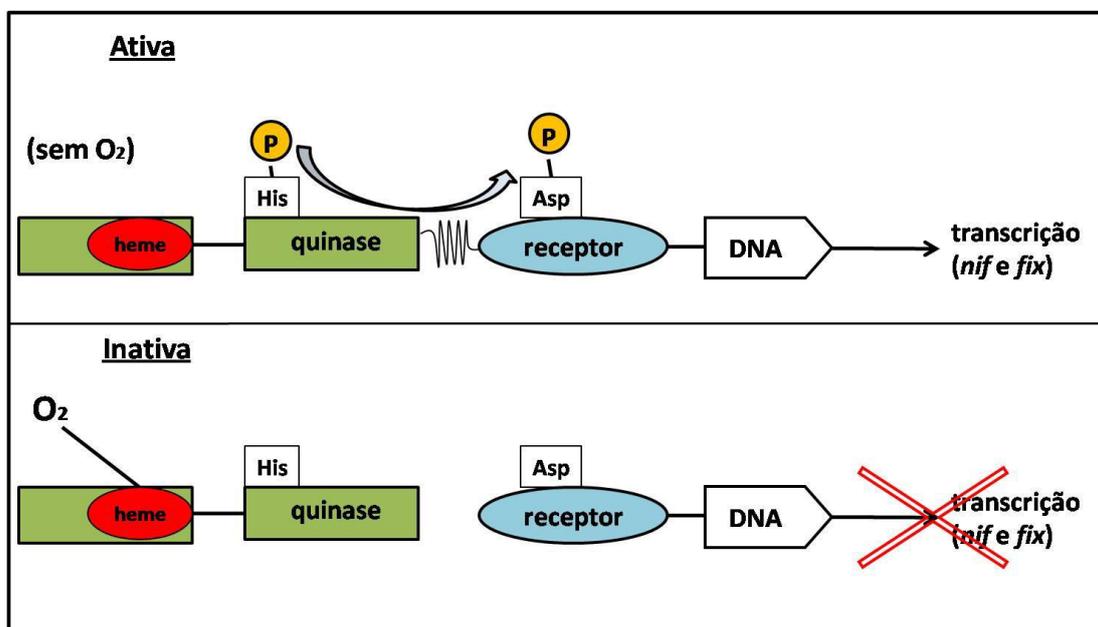
Além desse domínio, as FixLs possuem um domínio funcional onde a atividade de quinase se processa (HisKA), acoplada a um domínio ATPase, e podem ainda possuir outro domínio PAS não associado a um grupo heme, tal como é o caso para FixL da *Bradyrhizobium japonicum* (Figura 3).

FIGURA 3 – Representação esquemática dos domínios das proteínas FixL de *Rhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Rhizobium etli*. (Nomenclatura, símbolos e organização dos domínios estão de acordo com SMART - *simple modular architectu reresearch tool*).



Fonte: o autor.

FIGURA 4 – Representação esquemática do funcionamento do sistema de dois componentes FixL/FixJ. Na ausência de oxigênio a proteína FixL está ativa e se autofosforila, para em seguida transferir o grupo fosfato (P) para o seu parceiro receptor FixJ. O receptor ao estar fosfatado e ligado ao DNA é um regulador da transcrição dos genes *nif* e *fix*. Quando o grupo heme da FixL está ligado a oxigênio a reação de autofosforilação não ocorre, e por consequência, as demais etapas também não ocorrem. His e Asp são resíduos de histidina e aspartato que devem ser fosfatados na FixL e na FixJ, respectivamente.



Fonte: adaptado de TUCKERMAN; GONZALEZ; GILLES-GONZALEZ (2001).

A ReFixL (FixLda *Rhizobium etli*) possui ainda um domínio REC (Figura 3), onde existe um resíduo de aspartato que deve ser fosforilado. Esse domínio adicional REC é geralmente encontrado na proteína FixJ, que ao ser fosforilada pela FixL torna-se um fator de transcrição gênica ativa. Essa proteína reguladora compõe em conjunto com a FixL um sistema de dois componentes. A FixJ após ter sido ativada se liga ao DNA, ativando a transcrição (TUCKERMAN; GONZALEZ; GILLES-GONZALEZ, 2001). (Figura 4). A ReFixL trata-se de uma hemeproteína sensora híbrida por dispor de uma estrutura típica de FixL além do domínio de fosforilação da FixJ, tornando-a interessante alvo de estudos estruturais devido seus múltiplos domínios funcionais.

Além das formas *deoxy* e *oxy*, são conhecidas outras formas da FixL que configuram formas enzimaticamente ativas e inativas da proteína. Quando seu grupo heme encontra-se com ferro oxidado (Fe^{3+}) e pentacoordenado (forma *met*) a proteína está ativa, ao passo que, no mesmo estado de oxidação, ao se ligar a CN^- (forma *cianomet*) a proteína encontra-se inativa, isto é, incapaz de se autofosforilar. Outra forma ativa da proteína conhecida é quando a proteína está ligada a CO (forma *carboxy*), tal ligação só ocorre quando o heme está reduzido (Fe^{2+}) (DUNHAM *et al.*, 2003; TUCKERMAN *et al.*, 2002).

Estudos estruturais com a FixL utilizando cristalografia de raio-X e Ressonância Raman mostram que dependendo da forma em que se encontra o grupo heme, ocorrem modificações em sua conformação, que são transmitidas ao microambiente que o circunda e acabam por gerar alterações em outras regiões da proteína (GONG *et al.*, 1998; MIYATAKE *et al.*, 2000; YANO *et al.*, 2013). Por exemplo, na forma *met*, um dos propionatos do heme da FixL forma uma ligação do tipo ponte salina, isto é, uma interação eletrostática, com um resíduo de aminoácido conservado (uma histidina ou uma arginina). Ao se ligar a cianeto, o grupo heme adquire uma conformação mais plana, que faz com que a interação estabelecida com esse resíduo aconteça com outro propionato. Essas mudanças governam alterações em toda a proteína, as quais devem estar envolvidas no seu processo ativação/inativação (GONG *et al.*, 1998).

2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Hemeproteínas sensoras são encontradas em diversos seres vivos, de microrganismos até ao ser humano, sendo responsáveis por respostas adaptativas a variações nos níveis de O₂, CO e NO (GONZALEZ, 2008). A proteína FixL é um sensor que, juntamente com a FixJ, sua parceira num sistema de dois componentes, regula a produção de outras proteínas, as quais são responsáveis pela respiração microaeróbica e pela fixação do nitrogênio. Os genes responsáveis pela produção dessas proteínas não serão expressos enquanto o grupo heme da FixL estiver ligado ao O₂, o que a torna enzimaticamente inativa (GILLES-GONZALEZ *et al.*, 1994; GONZALEZ, 2008; TUCKERMAN; GONZALEZ; GILLES-GONZALEZ, 2001). Esta proteína foi uma das primeiras hemeproteínas sensoras a serem intensamente estudadas e pode ser considerada um modelo para outras proteínas dessa classe. Seu estudo é importante para a compreensão do papel que hemeproteínas sensoras desempenham na natureza, auxiliando assim a responder diferentes questões de grande importância, inclusive com implicações médicas em seres humanos, como por exemplo, os processos de vasodilatação e agregação plaquetária ou a persistência da tuberculose em humanos.

O objetivo geral deste trabalho é compreender as alterações conformacionais associadas aos diferentes estados (ativo/inativo) da proteína FixL da bactéria *Rhizobium etli* bem como realizar estudos de estabilidade desta proteína e obter informação ao nível da sua estrutura secundária. Os objetivos específicos incluem:

- Avaliar sua estabilidade estrutural através de desnaturação com agente caotrópico uréia por espectroscopia na região do ultravioleta-visível.
- Avaliar sua estabilidade térmica e determinar sua temperatura de desnaturação (T_m – *melting temperature*) por dicroísmo circular;
- Utilizar a espectroscopia de dicroísmo circular para obter dados da estrutura secundária da proteína FixL em solução, determinando as quantidades relativas aproximadas de α -hélices e β -folhas;
- Verificar as mudanças conformacionais que ocorrem na proteína quando esta passa de uma forma ativa para uma forma inativa, utilizando a técnica de dicroísmo circular. Considerando possíveis alterações nas estruturas secundária, terciária e no grupo prostético heme.

3 PARTE EXPERIMENTAL

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

3.1 Gene

Neste estudo empregou-se o plasmídeo pRET31, que contém o gene completo da FixL proveniente da *Rhizobium etli* clonado no plasmídeo pGGNKT (derivado do pUC19), sob controle do promotor *tac*, contendo gene de resistência a ampicilina para seleção em *Escherichia coli*, tal como descrito na literatura (SOUSA, EDUARDO H S *et al.*, 2013).

3.2 Crescimento celular e expressão

3.2.1 Transformação e Pré-inóculo

Os procedimentos que exigem ambiente 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.

O processo de transformação consiste na inserção de material genético estranho em uma célula bacteriana (SPIZIZEN, 1968). Células capazes de realizar tal processo são ditas competentes (HORECKER *et al.*, 1982). A partir da transformação é possível obter células clonadas com gene(s) de interesse, e que serão capazes de expressá-lo(s). A transformação pode ser realizada quimicamente, pela adição de CaCl₂; ou por meio de um pulso elétrico, uma técnica chamada de eletroporação. Nos dois métodos a membrana celular torna-se momentaneamente permeável, permitindo a entrada do material genético. Para a transformação, 2 µL da solução contendo o vetor pGGNKT ligado ao fragmento de interesse (gene *fixL*) foram misturados a 50 µL de solução contendo células eletrocompetentes de *E. coli* MC1061 armazenadas a -84°C em 5% glicerol previamente descongeladas e mantidas em gelo, ficando 1 minuto em incubação a 0°C após a mistura. As células com plasmídeo foram então colocadas numa cubeta *E. coli* Pulser™ (BIO-RAD) para que fosse feita a eletroporação. Foi utilizado Eletroporador MicroPulser™ (BIO-RAD (USA)).

À solução de células submetidas à eletroporação foi misturado um volume de 500 μL de meio de cultura LB Broth Miller (FISHER SCIENTIFIC), previamente autoclavado e preparado de acordo com as especificações do fabricante (25 g L^{-1} em água deionizada). O crescimento bacteriano realizou-se a 37°C sob agitação de 200 rpm em incubadora tipo shaker orbital (TE-420 TECNAL®) durante uma hora. Utilizou-se 10, 100 e 250 μL desse crescimento para plaquear em meio de cultura sólido LB Agar MO BIOinc., contendo antibiótico ampicilina sódica (SIGMA®) na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após terem sido plaqueados, as placas de *petri* foram incubadas por cerca de 16 horas, a 37°C , em estufa para cultura e bacteriologia (ETHIK TECHNOLOGY).

No dia seguinte foi selecionada uma colônia isolada nas placas para inoculação em 10 mL de meio de cultura líquido contendo ampicilina ($100\mu\text{g mL}^{-1}$). Após 16 horas sob agitação e a 37°C , foram usados 5 μL desse crescimento para inocular 50mL de meio de cultura líquido contendo ampicilina na concentração de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$. A concentração de ampicilina foi aumentada 4 vezes em relação ao crescimento em meio LB ágar para aumentar a eficiência na seleção de células contendo o plasmídeo com resistência a ampicilina. Foram feitos 5 crescimentos sucessivos nessas condições, utilizando-se sempre 5 μL de crescimento para inocular 50 mL de meio de cultura fresco e cada crescimento durando cerca de 6 horas, cuja densidade óptica a 600 nm encontrava-se ~ 0.05 ($\sim 10^7$ células mL^{-1}). Ao final do 5º crescimento, o meio de cultura foi centrifugado à 5000 rpm durante 15 minutos em centrífuga (Hettich EBA 3S), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuspenso em LB contendo 15% glicerol esterilizado (500 μL) e armazenado à -84°C .

3.2.2 Expressão da Proteína FixL

O crescimento bacteriano foi realizado em biorreator autoclavável de 5 litros (Applikon® BIOTECHNOLOGY). Para esse crescimento foram preparados um pré-inóculo e um inóculo final. O pré-inóculo foi preparado mergulhando uma alça de platina estéril nas células transformadas e crescidas descritas acima, após serem descongeladas, e em seguida transferindo-a para um tubo de ensaio contendo cerca de 5 mL de meio de cultura LB e ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), essa mistura foi mantida por 16 horas a 37°C e sob agitação a 200 rpm. O pré-inóculo foi usado para inocular 500 mL de meio de cultura fresco contendo ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), e foi crescido a 37°C sob agitação de 200 rpm até que a densidade óptica a 600 nm ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) atingisse 0,6.

Empregou-se o espectrofotômetro Cary 5000 UV-Vis-NIR (Agilent, Australia) para acompanhar a densidade óptica, sendo feito branco com meio de cultura LB. Quando o inóculo atingiu a densidade ótica desejada, este foi centrifugado durante 20 minutos a $2600 \times g$ em centrífuga (NT820 Novatecnica®). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuspense em 10 mL de meio de cultura fresco, ficando pronto para inocular o biorreator.

Para o crescimento no biorreator, foi preparado meio de cultura líquido misturando-se 100 gramas de pó solúvel de LB para meio de cultura de bactérias com 3,5 litros de água deionizada no biorreator e levando-o para esterilização em autoclave a 121°C durante 40 minutos; adicionalmente foram preparadas as seguintes soluções aquosas:

- 50% α -D-glicose anídrica (SERVA);
- 50% glicerol (SIGMA);
- 20x YT – extrato de Levedura (Fluka®), 100 mg mL^{-1} e peptona (FISHER SCIENTIFIC), 200 mg mL^{-1} ;
- citrato férrico, Fe(III) 16,5 – 20% (Alfa Aesar®), $9,86 \text{ mg mL}^{-1}$;
- tampão fosfato – $0,34 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 / 0,17 \text{ mol L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ (ambos SIGMA®);
- metais e elementos traço – $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$; $0,2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $0,2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $0,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KI}$; $0,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $0,25 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$;
- ampicilina sódica (SIGMA®) , 80 mg mL^{-1} ;
- NH_4OH 24 – 26% (VETEC), 1:1 (v/v).

As soluções de glicose, citrato férrico e ampicilina foram filtradas empregando-se filtro estéril com poro de $0,22 \mu\text{m}$, enquanto as demais foram autoclavadas a 121°C durante 20 minutos.

Ao biorreator, contendo o meio estéril já na temperatura ambiente, foram adicionados 500 mL de tampão fosfato estéril, 10 mL de solução de ampicilina, 4 mL de solução de citrato férrico, 8 mL de metais e elementos traço, 1 mL de anti-espumante concentrado (Antifoam concentrate A SIGMA®) e o inóculo previamente ressuspense em meio de cultura fresco.

As condições desejáveis ao crescimento foram mantidas automaticamente pelo biorreator (ez-Control Applikon® BIOTECHNOLOGY, Holanda). Durante a fermentação a concentração de oxigênio foi mantida entre 4 e 6% por meio de cilindro

de oxigênio acoplado ao aparelho e de sensor de oxigênio inserido no meio de cultura, e previamente calibrado com a saturação em oxigênio do meio correspondendo a 100%. O pH foi monitorado por sensor inserido no meio e mantido em 7,0 – com variação máxima de 0,1 unidade para cima ou para baixo – por adições automáticas de solução aquosa de NH_4OH para neutralizar metabólitos ácidos produzidos pelas bactérias. O sensor de pH foi previamente calibrado, utilizando calibração de dois pontos, com soluções padrão de pH 4,0 e pH 7,0. A temperatura foi acompanhada por termômetro acoplado ao aparelho, e mantida em 37°C durante a fase de crescimento e em 30°C durante a fase de expressão, por meio de aquecimento e resfriamento automático controlado pelo aparelho.

O índice de glicose foi acompanhado durante o crescimento por meio de fitas reagente para urinálise Distix® (BAYER®) e mantido entre 5 e 10 g L^{-1} pela adição semi-automática de solução contendo glicose, 20x YT, metais e elementos traços e citrato férrico, descritas acima, nas respectivas proporções em volume, 40:20:2:1. Cinco horas após a inoculação do biorreator, a densidade celular foi acompanhada periodicamente a cada hora. Uma vez atingida a densidade celular de cerca de 26 g L^{-1} , a alimentação com glicose foi interrompida. Imediatamente após a glicose do meio ter sido consumida foi iniciada alimentação com solução contendo 50% glicerol, 20x YT, metais e elementos traços e citrato férrico, nas respectivas proporções em volume, 40:20:2:1. Além de funcionar como fonte de carbono, a glicose age como supressora indireta da expressão protéica em *E. coli*, de forma que a ausência desta faz com que se inicie a fase de expressão da proteína clonada (VOET, D.; VOET, J.G., 2013). A alimentação com solução contendo glicerol foi mantida com períodos alternados de 10 segundos de gotejamento e 60 segundos de pausa, por aproximadamente 12 horas, adicionando em média 50 mL h^{-1} . As células foram coletadas uma hora após o fim da alimentação (2600 x g, durante 20 minutos). O *pellet* das células foi armazenado a -84°C até ser iniciado procedimento de purificação.

3.3 Purificação

Para a purificação da proteína foram preparadas as seguintes soluções:

1. $2\text{ mol L}^{-1}\text{NaCl}$ (SERVA);
2. $0,5\text{ mol L}^{-1}\text{KCl}$ (AMRESCO®);
3. 1 mol L^{-1} Tris-HCl - Hidrocloreto de Trisaminometano (SIGMA®) pH 8,0

4. 0,175 mol L⁻¹ EDTA - Etilenodiaminotetraacetato, sal dissódico, (REAGEN);
5. 4 mol L⁻¹ NH₄SO₄ (SERVA), 10mM Tris pH 8,0, 1mM EDTA;
6. 2 mol L⁻¹NaOH (CROMOLINE®);
7. 10% Etilenoglicol (EMSURE®)
8. 2-mercaptoetanol, min 98% (SIGMA®);
9. Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (AMRESCO®);
10. Lisozima de ovo branco de galinha (SIGMA®);
11. Phenyl Sepharose™ 6 fast flow (high sub) (GE HEALTHCARE);
12. DEAE Sepharose® fast flow;
13. Superdex™ 200 (Amersham Biosciences).

3.3.1 Lise das células

Foi preparado tampão de lise com a seguinte composição:

- 50 mmol L⁻¹Tris-HCl pH 8,0;
- 137 mmol L⁻¹NaCl;
- 5 mmol L⁻¹KCl;
- 5% glicerol;
- 1 mmol L⁻¹ EDTA;
- 10 mmol L⁻¹ 2-mercaptoetanol;
- 0,17 mg mL⁻¹ PMSF;
- 0,1 mg mL⁻¹ lisozima.

O *pellet* celular congelado foi ressuspensado em tampão de lise na proporção de 5 mL para cada 2 gramas de *pellet*, à temperatura ambiente. Após total ressuspensão, a mistura foi sonicada, sob agitação suave e 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 40.000 x 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.

3.3.2 Precipitação da fração protéica contendo FixL

Após a centrifugação, ao sobrenadante foi adicionado solução saturada de NH_4SO_4 (4 mol L^{-1}) até alcançar 40% da concentração de saturação e provocando a precipitação. A alta concentração de sal faz com que a disponibilidade de água para interação com a proteína diminua. A interação entre os resíduos hidrofóbicos da proteína faz com que ela precipite (PRICE, N. C.; NAIRN, J., 2009). Logo após a precipitação a mistura foi centrifugada a cerca 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.

3.3.3 Coluna Fenil-sefarose

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

Esta etapa cromatográfica baseia-se na interação hidrofóbica que ocorre entre certas proteínas e o material da coluna em concentrações relativamente elevadas de sal, no caso, sulfato de amônio.

O precipitado de sulfato de amônio foi ressuspense em tampão 10 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 8,0 perfazendo 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 (PhenylSepharoseTM, $d= 2,8\text{cm}$; $h=15\text{cm}$), 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% NH_4SO_4 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$), e em seguida feita eluição com 10% etilenoglicol.

Espectros eletrônicos no UV-Vis foram medidos com as frações eluídas da coluna, sendo checado as razões entre os máximos em 280 nm e 395 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*. A banda com máximo em 280 nm surge devido às transições eletrônicas provocada pela absorção de energia dos grupos aromáticos protéicos, presentes nos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano. A razão (Rz), $\text{Abs}_{280\text{nm}}/\text{Abs}_{395\text{nm}}$, relaciona a concentração da heme proteína à

concentração de proteínas totais, e quanto menor for o valor da razão maior será o grau de pureza da FixL. As frações com razão Rz inferiores a 1,4 foram combinadas numa única fração, enquanto as frações com razão superior a 1,4 descartadas. A fração combinada foi dialisada contra tampão 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 8,0 durante 16 horas para retirada de sais remanescentes.

3.3.4 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 amostra 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, 100, 125, 175, 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_{395nm} (Rz) tal como anteriormente descrito. As frações que apresentaram Rz entre 0,62 e 0,67, assim como as entre 0,71 e 0,89, foram combinadas formando duas frações globais. As demais frações com Rz superiores aos limites anteriormente descritos foram descartadas.

3.3.5 Coluna de Exclusão em Gel

Esta etapa cromatográfica consiste em uma filtração em gel, sendo que as moléculas com maiores massas molares terão velocidade de eluição maior frente às de menores massas molares. Como o volume de amostra aplicado nessa coluna não deve exceder 1% do volume total da coluna, antes de ser aplicada, a amostra foi concentrada. Para isso utilizou-se o concentrador de proteína Millipore Amicon® 8050 sob pressão de argônio e agitação, utilizando uma membrana Amicon YM-30 (com massa molar limite de corte de 30 KDa). Após a amostra ter sido concentrada até aproximadamente 10% do volume original, foram feitas sucessivas injeções na coluna de filtração em gel,

cada uma com volume de aproximadamente 700 μL . Em seguida, foi utilizado para equilibrar a coluna e eluir a amostra tampão 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 8,0 e 150 mmol L^{-1} NaCl, posteriormente foram medidos os espectros eletrônicos UV-Vis das frações eluídas da coluna de exclusão em gel (SuperdexTM 200) ($d=2,2$ cm; $h= 92\text{cm}$), e determinadas o R_z . As frações foram novamente combinadas de acordo com seus R_z gerando 3 frações finais, consistindo daquelas com valores de R_z de 0,58; 0,61 e 0,64. Essas amostras foram concentradas até cerca de 150 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo adicionado 5% de glicerol, em seguida foram separadas em alíquotas de diversos volumes (10, 20, 50, 100 μL), a fim de minimizar ciclos de descongelamento e congelamentos. Essas amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -84°C .

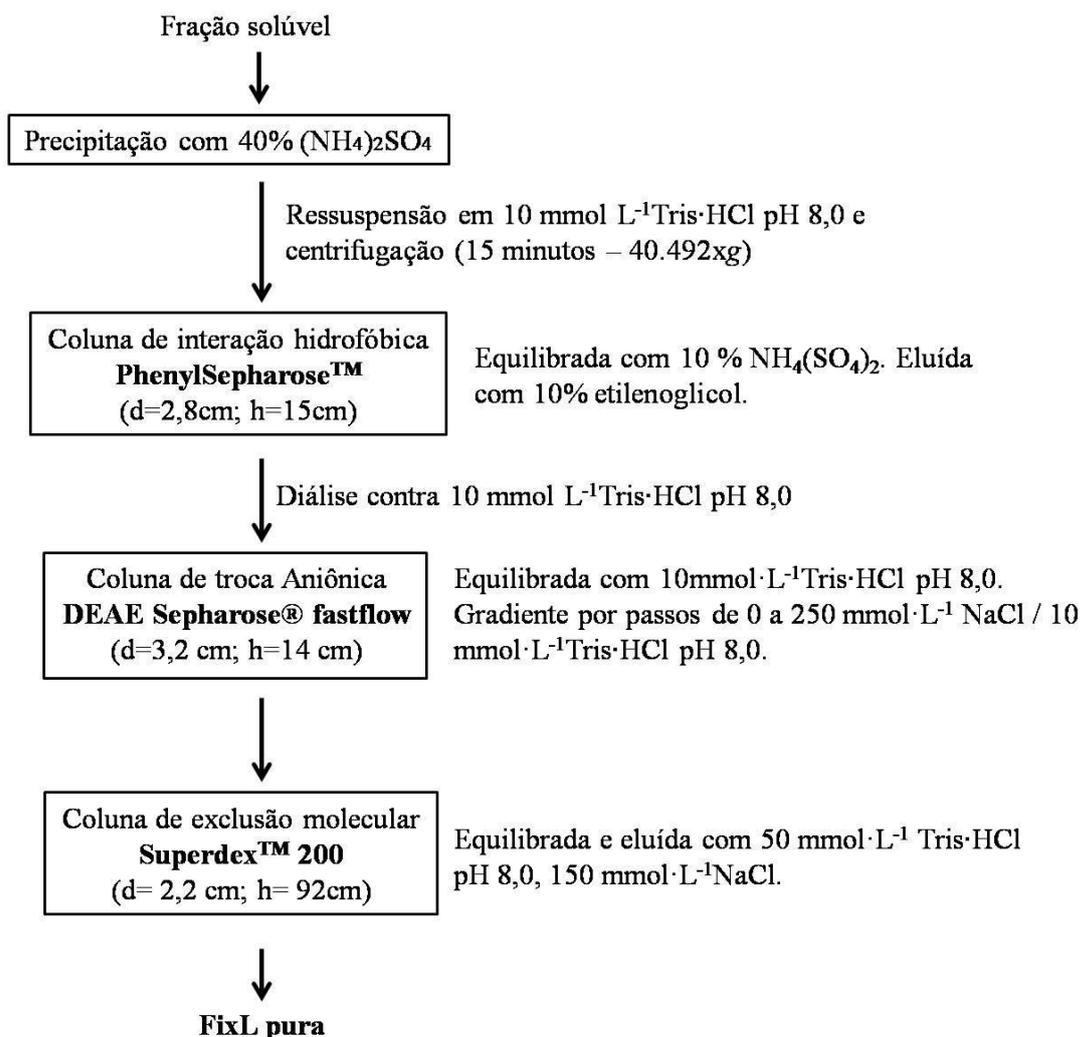
Para confirmar a pureza da amostras finais e avaliar a eficiência do processo de purificação foi feito eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE). O tratamento com dodecil sulfato de sódio (SDS) confere às proteínas carga negativa constante e faz com elas adquiram estrutura alongada uniforme, de forma que a migração depende apenas do tamanho, com as maiores movendo-se mais lentamente. Foi utilizada acrilamida/bis-acrilamida, 37:1 (SIGMA®), na concentração de 10% no gel de separação. A tabela abaixo descreve a formulação dos géis – gel de alinhamento e gel de separação.

TABELA 2 – Composição dos géis usado na eletroforese SDS-PAGE.

Composição dos géis	Volume (μL) de:	
	gel alinhamento (stacking gel)	gel separação (resolving gel)
Stacking gel buffer (0,375mol·L⁻¹Tris-HCl, pH 8,8)	450	---
Resolution gel buffer (0,125mol·L⁻¹Tris-HCl, pH 6,8)	---	1250
Acrilamida/Bis-acrilamida, 37:1	225	1250
10% Dodecil sulfato de sódio (SDS)	18	50
H₂O	1110	2450
10% Persulfato de amônio	13,5	38
TEMED (tetrametiletlenodiamina)	2	2,5

Fonte: o autor.

FIGURA 5 – Esquema do processo de purificação da proteína FixL híbrida da bactéria *Rhizobium etli*.



Fonte: o autor.

O gel foi preparado utilizando suporte para montagem de gel de acrilamida BIO-RAD e placas com 1,0 mm de espaçamento. Para a corrida eletroforética foram utilizadas cuba de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® Tetra System BIO-RAD e fonte para eletroforese FB300 FISHER SCIENTIFIC. Às amostras foram adicionados 7 μL de tampão de amostra, e em seguida estas foram aquecidas em banho-maria a 100°C durante 4 minutos. O tampão da amostra possui a seguinte composição final:

- $0,125 \text{ mol L}^{-1} \text{Tris}\cdot\text{HCl}$ pH 6,8;
- 4% Dodecil sulfato de sódio (SDS);
- 700 mmol L^{-1} 2-mercaptoetanol;
- 10% glicerol;
- $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ azul de bromofenol.

Foi utilizado como marcador molecular *Protein Ladder* (New England BioLabs), um marcador com 12 proteínas com massa molecular entre 10 e 250 kDa.

Após a corrida o gel foi corado ficando 30 minutos sob agitação em contato com solução corante [5g L⁻¹ azul de *Coomassie*, 7,5 % ácido acético glacial (v/v) e 45% metanol (v/v)], sendo em seguida descorado por 3 horas em solução descorante [7,5% ácido acético glacial (v/v) e 45% metanol (v/v)].

3.4 Dicroísmo Circular

Os espectros de Dicroísmo Circular foram adquiridos usando espectrôfotometro J-815 CD JASCO (Japão). Para medidas na região do ultravioleta distante (*far-UV*) foram adquiridos espectros na faixa de comprimento de onda de 190 a 255 nm, utilizou-se cubeta de quartzo com caminho ótico de 0,1cm e proteína na concentração de 1 μmol L⁻¹. Para medidas na região do ultravioleta próximo (*near-UV*) e do visível foram adquiridos espectros nas faixas de 255 a 320 nm e de 300 a 500 nm, respectivamente; utilizou-se cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm e 20 μmol L⁻¹ da proteína FixL. 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 ou 100 nm min⁻¹; 3 acumulações. Para as medidas nas regiões do *near-UV* e do visível utilizaram-se as 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; 10 acumulações de espectros. Todas as medidas foram feitas a 20 °C, exceto quando informado diferente.

3.4.1 Obtenção das diferentes formas da FixL

Foram feitas medidas com FixL na forma ativa, isto é, com grupo heme contendo Fe³⁺ e pentacoordenado (*met*), Fe²⁺ em condições aneróbicas e pentacoordenado (*deoxy*), e com Fe²⁺ ligado ao CO na forma Fe²⁺-CO, além de medidas nas suas formas inativas, contendo Fe²⁺ ligado ao O₂ (*oxi*), e Fe³⁺ ligado ao CN⁻ (*cianomet*)

Para preparar a forma reduzida da proteína, a amostra foi deixada incubada durante 15 minutos com 1,5 mmol·L⁻¹ Na₂S₂O₄ (ditionito de sódio) em câmara anaeróbica, e em seguida, o excesso do agente redutor foi removido em coluna de

filtração em gel Supedex G-25 (d= 0,6; h= 4cm), eluído em 10 mmol L⁻¹ Tris pH 8,0, tendo-se obtido a forma *deoxy*. A amostra foi colocada em cubeta de quartzo e fechada hermeticamente na câmara, de forma a impedir a sua oxigenação e posterior oxidação.

As formas ligadas a O₂ e CO foram obtidas a partir da forma *deoxy* pela diluição em tampão 10 mmol L⁻¹ Tris pH 8,0 saturado com os gases. A saturação dos tampões foi conseguida mediante borbulhamento durante 30 minutos. Para obtenção da forma ligada ao CN⁻, a proteína oxidada foi incubada durante 30 minutos com KCN na concentração final de 0,6 mmol L⁻¹.

Antes de realizarem-se as medidas de dicroísmo circular foram adquiridos os espectros eletrônicos UV-Vis na faixa de 250 a 700nm. Os valores observados dos comprimentos de onda em que se encontravam as bandas de *Soret* e bandas Q foram comparados com valores descritos na literatura, confirmando as formas obtidas.

3.4.2 Estrutura secundária da FixL

Para se estimar a estrutura secundária da proteína FixL foram utilizados os programas CDSSTR (SREERAMA; WOODY, 2000), CONTINLL (VAN STOKKUM *et al.*, 1990) e SELCON 3 (SREERAMA; VENYAMINOV; WOODY, 1999), todos inclusos no software CDPro. Foram utilizados os valores de variação do coeficiente de absorção molar ($\Delta\epsilon$) por resíduo. A faixa de comprimento de onda utilizada foi de 190 a 240 nm (*far-UV*).

3.4.3 Curvas de desnaturação térmica e *T_m* da FixL

Para determinação de curvas de temperatura foram feitas medidas com a FixL na forma nativa (Fe³⁺), na forma ligada a CN⁻ e na forma *deoxi* (Fe²⁺). Foi acompanhada a variação na elipticidade a 222 nm, na faixa de temperatura de 10,2 a 70,0 °C, sendo cada medida feita 1 minuto após a temperatura ter estabilizado no valor desejado. A temperatura foi controlada por meio de aparelho acessório peltier.

As curvas de estabilidade térmica foram ajustadas utilizando a equação abaixo que descreve o processo de desnaturação térmica em duas etapas com a passagem de dímero nativo (*folded*) para monômeros desnaturados (*unfolded*), considerando que não há variações na capacidade térmica ($\Delta C_p=0$) (GREENFIELD, 2006);

$$f = (U - L) \cdot \frac{((4.c.K+1) - \sqrt{(8.c.K+1)})}{4.c.K} + 1; \quad \text{Equação 1}$$

em que, *f* é a elipticidade molar por resíduo calculada utilizando método do mínimos quadrados, em deg cm² dmol⁻¹; *U* é a elipticidade molar por resíduo quando a proteína

está totalmente enovelada (*folded*), em $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$; L é a elipiticidade molar por resíduo quando a proteína está totalmente desnaturada (*unfolded*), em $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$; c é a concentração da proteína, em mol L^{-1} , e K é a constante de desnaturação calculada por meio da seguinte equação;

$$K = \exp \left\{ \left(\left(\frac{H}{1,987.T} \right) \cdot \left(\left(\frac{T}{T_m} \right) - 1 \right) \right) - \ln(c) \right\}; \quad \text{Equação 2}$$

em que, H é a entalpia de *folding*, em cal mol^{-1} ; T é a temperatura, em Kelvin; T_m é a temperatura de desnaturação média (melting temperature), em Kelvin; e c é a concentração, em mol L^{-1} .

3.4.4 FixL em presença de Mg^{2+} e ATP

Com o objetivo de investigar possíveis alterações conformacionais na proteína por ocusão de sua autofosforilação, foram adquiridos os espectros de dicróimo circular para FixL na forma *met* (ativa) em presença do íon divalente Mg^{2+} (fornecido pelo sal MgCl_2) e de ATP (trifosfato de adenosina). Foram feitas medidas na região do ultravioleta próximo (*near-UV*) e do visível nas faixas de comprimento de onda de 255 a 320 nm e de 300 a 500 nm. Utilizou-se proteína na concentração de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. As concentrações de MgCl_2 e de ATP usadas foram 500 e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$.

3.5 Desnaturação com uréia

Para obtenção da proteína na forma ligada a CN^- incubou-se $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ da proteína com 1mmol L^{-1} KCN durante 30 minutos a temperatura ambiente. Foi adquirido o espectro eletrônico na região do UV-Vis após a incubação com KCN para certificação de que o complexo cianomet foi obtido.

Para o experimento com FixL na forma $\text{Fe}^{3+}\text{-CN}^-$ (*cianomet*) a concentração final de KCN foi $0,6 \text{mmol L}^{-1}$ durante a desnaturação. As concentrações de uréia usadas foram 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0; 5,5 e $6,0 \text{mol L}^{-1}$. A proteína ficou incubada com o agente desnaturante durante 2 horas a temperatura ambiente antes de serem realizadas as medidas. O processo de desnaturação foi acompanhado por meio de espectroscopia eletrônica na região do UV e do visível e dicróismo circular na região do ultravioleta distante.

Na desnaturação acompanhada por dicróismo circular foi utilizada proteína na concentração final de $1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$. Foram adquiridos espectros na faixa de comprimento de onda de 210 a 255 nm e utilizou-se cubeta de quartzo com caminho

ótico de 0,1 cm. As medidas foram feitas com as seguintes condições experimentais otimizadas: *data pitch* de 0,5 nm; *D.I.T.* de 1 segundo; *bandwidth* de 1 nm; velocidade de varredura de 100 nm/min; 3 acumulações. Na desnaturação acompanhada por UV-Vis foi utilizada proteína na concentração final de 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Os experimentos foram realizados em tampão com 150 mmol L^{-1} NaCl e 50 mmol L^{-1} Tris·HCl pH 8,0.

Para avaliar o processo de desnaturação da proteína foram usados dois modelos descritos na literatura (RUMFELDT *et al.*, 2008). Um dos modelos descreve o processo de desnaturação ocorrendo com a passagem direta da proteína do estado nativo para o estado desnaturado, enquanto outro modelo considera a formação de uma forma intermediária da proteína durante a desnaturação.

A seguinte equação foi utilizada para descrever o processo de desnaturação da FixL em dois estados, isto é, com passagem direta da forma nativa para a forma desnaturada:

$$S = \frac{S_N + S_D \cdot \exp\left\{\frac{\Delta G_{(H_2O)} - m \cdot [D]}{R \cdot T}\right\}}{1 + \exp\left\{\frac{\Delta G_{(H_2O)} - m \cdot [D]}{R \cdot T}\right\}}; \quad \text{Equação 3}$$

em que, S é o sinal espectrofotométrico (absorbância ou elipticidade) em qualquer ponto; S_N e S_D são os sinais espectrofotométricos dos estados nativo e desnaturado, respectivamente; $\Delta G_{(H_2O)}$ é energia livre do processo de desnaturação extrapolado para quando a concentração do desnaturante é igual a 0 (zero); m é a inclinação da curva relativa ao processo de passagem do estado nativo para o desnaturado; $[D]$ é a concentração do agente desnaturante; R é a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta (MORJANA; MCKEONE; GILBERT, 1993).

A equação utilizada para descrever o processo de desnaturação da proteína em três estados é a seguinte:

$$S = \frac{S_N + S_I \cdot \exp\left\{\frac{\Delta G_{(H_2O)1} - m_1 \cdot [D]}{R \cdot T}\right\} + S_D \cdot \exp\left\{\frac{\Delta G_{(H_2O)1} - m_1 \cdot [D]}{R \cdot T}\right\} \cdot \exp\left\{\frac{\Delta G_{(H_2O)2} - m_2 \cdot [D]}{R \cdot T}\right\}}{1 + \exp\left\{\frac{\Delta G_{(H_2O)1} - m_1 \cdot [D]}{R \cdot T}\right\} + \exp\left\{\frac{\Delta G_{(H_2O)1} - m_1 \cdot [D]}{R \cdot T}\right\} \cdot \exp\left\{\frac{\Delta G_{(H_2O)2} - m_2 \cdot [D]}{R \cdot T}\right\}};$$

Equação 4

em que, S é o sinal espectrofotométrico em qualquer ponto; S_N , S_I e S_D são os sinais espectrofotométricos dos estados nativo, intermediário e desnaturado (*unfolded*), respectivamente; $\Delta G_{(H_2O)1}$ e $\Delta G_{(H_2O)2}$ são as energias livres para os processos de passagem do estado nativo para o intermediário (N=>I) e do estado intermediário para o desnaturado (I=>D), respectivamente, extrapolado para quando a concentração do

desnaturante é igual a 0 (zero); m_1 e m_2 são os declives da curva relativos aos processos de passagem do estado nativo para o intermediário (N=>I) e do estado intermediário para o desnaturado (I=>D), respectivamente; $[D]$ é a concentração do agente desnaturante; R é a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta (MORJANA; MCKEONE; GILBERT, 1993).

Além dos parâmetros mostrados nas equações foi possível obter $[D]_{1/2}$, que é a concentração que causa a desnaturação média de 50% da proteína. Essas concentrações médias foram calculadas utilizando $\Delta G_{(H_2O)} = m \cdot [D]_{1/2}$, em que $\Delta G_{(H_2O)}$ é energia livre do processo de desnaturação extrapolado para quando a concentração do desnaturante é igual a 0 (zero) e m é a inclinação da curva relativa ao processo de passagem do estado nativo para o desnaturado (BINSHENG, 2011).

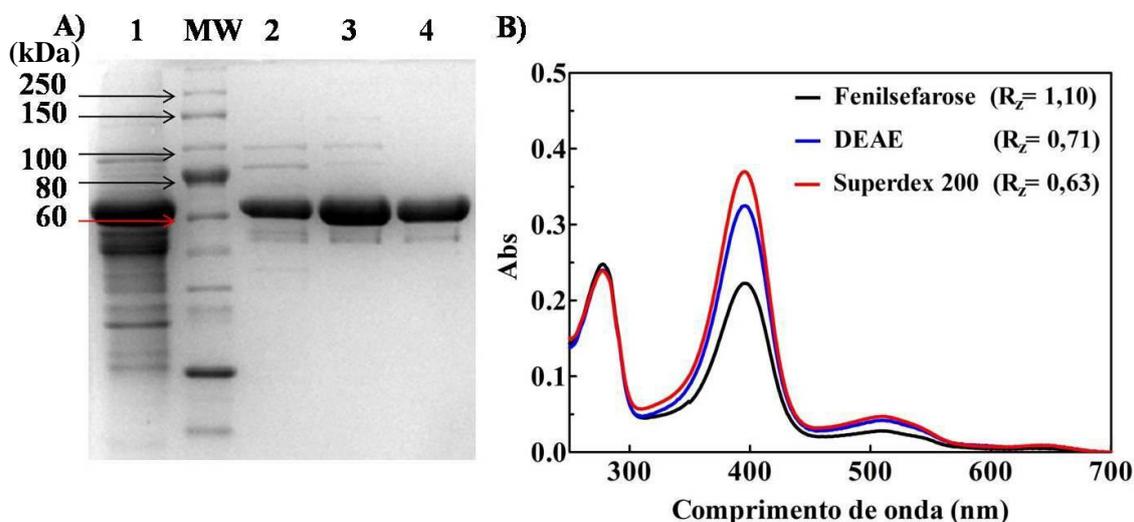
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação da proteína FixL híbrida da *Rhizobium etli*

Com a finalidade de se obter a proteína FixL híbrida pura, após o crescimento bacteriano e indução, foram realizados os procedimentos de lise das células e precipitação de proteínas com sulfato de amônio. E em seguida, as etapas cromatográficas de purificação foram executadas empregando-se colunas de interação hidrofóbica (fenil sefarose), troca aniônica (DEAE) e exclusão molecular (S200).

A Figura 6A apresenta uma fotografia do gel de poliacrilamida sob condição desnaturante (SDS-PAGE) após cada uma das etapas de purificação da amostra. Adicionalmente, obteve-se os espectros eletrônicos na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) para as amostras isoladas após cada uma das etapas cromatográficas, Figura 6B.

FIGURA 6 – Perfil de purificação da ReFixL. A) Gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) das frações protéicas isoladas nas etapas do processo de purificação da proteína FixL, poços: 1 – precipitado com sulfato de amônio; MW – marcador molecular padrão (New England Labs); 2 – Isolado da coluna de fenil sefarose; 3 – Isolado da coluna de troca aniônica (DEAE); 4 – Isolado da coluna de filtração em gel (Superdex 200). B) Espectros eletrônicos UV-Vis da FixL após cada etapa de purificação cromatográfica.



Fonte: o autor.

Após a precipitação com 40% de sulfato de amônio é possível observar na Figura 6A linha 1 a presença de vários contaminantes, os quais foram eficientemente

removidos da amostra logo na primeira etapa cromatográfica (coluna fenil sefarose Figura 6A linha 2). As demais etapas cromatográficas (colunas DEAE e Superdex™ 200) foram etapas de refinamento do processo de purificação (Figura 6A linhas 3 e 4). A eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante apresentou uma banda ligeiramente acima da banda de referência de 60 kDa e abaixo da de 80 kDa do marcador molecular. A FixL híbrida da *Rhizobium etli* é um homodímero em que cada subunidade tem massa molecular de 70175,9 Da, o que é consistente com o observado no gel desnaturante (Figura 6), evidenciando sua integridade e elevada pureza.

A razão de pureza de uma hemoproteína é estabelecida como a razão entre as absorvâncias da amostra a 280 nm e o valor máximo da banda *Soret*, sendo para FixL valores de razão ao redor de 0,6-0,7 considerados amostras puras. No caso da FixL nativa e recém purificada o máximo da banda *Soret* ficou em 395 nm, o mesmo valor observado por Gilles-Gonzalez e colaboradores para outras proteínas FixLs de *Rhizobium* (GILLES-GONZALEZ *et al.*, 1994) e medida para esta proteína mais recentemente (SOUSA *et al.*, 2013). Desta forma, após etapa empregando a coluna hidrofóbica (fenil sefarose) a razão de pureza R_z da amostra, $A_{280\text{nm}}/A_{395\text{nm}}$, foi de 1,1, enquanto para as outras etapas envolvendo a coluna de troca aniônica e exclusão em gel os R_z foram de 0,71 e 0,63, respectivamente. A diminuição da razão de pureza indica que a purificação foi eficiente na remoção de contaminantes proteicos. Ao final de cada etapa cromatográfica é possível observar nos espectros de UV-Vis um aumento relativo da banda *Soret* em relação a banda em 280 nm, indicando aumento da concentração da proteína FixL frente às outras proteínas não-hêmicas contaminantes.

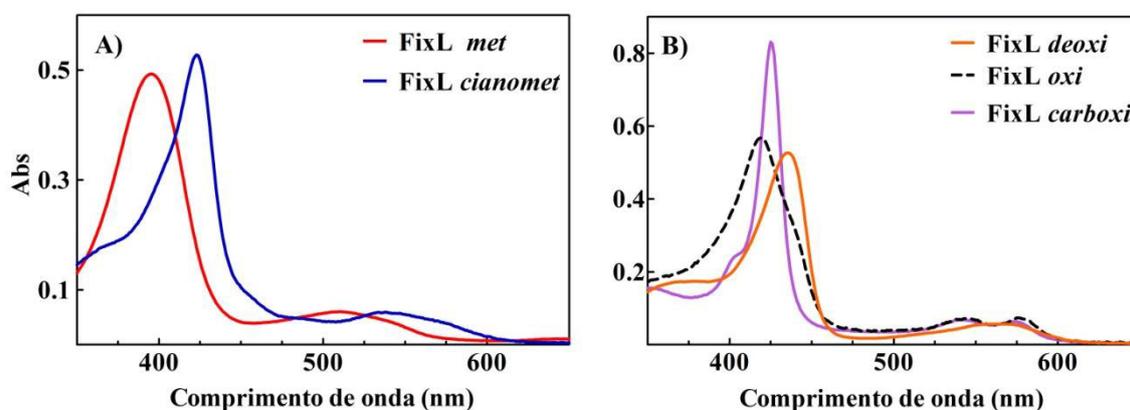
Por meio dos espectros eletrônicos na região do UV-Vis e da eletroforese em gel de poliacrilamida é possível afirmar que a proteína FixL encontra-se intacta, obtida na sua forma *holo* e com um grau de pureza elevado. Além disso, uma vez que o máximo da banda *Soret* surgiu em 395 nm, é possível afirmar que o ferro do grupo heme apresenta-se na forma de Fe^{3+} , alto *spin* e pentacoordenado, como descrito na literatura (GILLES-GONZALEZ *et al.*, 1994).

4.2 Diferentes formas da FixL obtidas

No espectro de absorção eletrônica na região do UV-Vis para hemoproteínas a banda *Soret* (ou banda B), que aparece em aproximadamente 400 nm, assim como as bandas alfa e beta, que aparecem próximas a 540 e 500 nm, surgem devido às intensas

transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ no anel porfirínico do grupo heme. É comum serem observadas alterações nesses valores de referência dependendo da presença e do tipo de ligantes axiais coordenados ao ferro (OWENS; CONNOR, 1988). Utilizando espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis e comparando os valores dos máximos da banda Soret e bandas Q, verificou-se que foi possível a obtenção das formas enzimaticamente ativas, *met* (Fe^{3+}), *deoxi* (Fe^{2+}) e *carboxi* ($\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$); e das formas inativas, *cianomet* ($\text{Fe}^{3+}\text{-CN}^-$) e *oxi* ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$), da proteína FixL. Na figura 7 são mostrados os espectros de UV-Vis na faixa de 350 a 650 nm para as diferentes formas da proteína.

FIGURA 7 – Espectros de UV-Vis na faixa de comprimento de onda de 350 a 650 nm das diferentes formas da FixL. A) FixL *met* (Fe^{3+}) e FixL *cianomet* ($\text{Fe}^{3+}\text{-CN}^-$); B) FixL *deoxi* (Fe^{2+}) e FixL *oxi* ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$); e C) FixL *carboxi* ($\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$).



Fonte: o autor.

Sabe-se que a FixL na forma *met* apresenta o grupo heme com ferro pentacoordenado, com um resíduo de histidina como um dos ligantes axiais (GONG *et al.*, 1998). Para essa forma o máximo da banda *Soret* ocorre em 395 nm, o que é representativo do ferro(III) com estado de spin alto. Nesse caso não houve uma separação efetiva entre as bandas Q. A banda beta, mais intensa, apareceu em 513 nm com um ombro em aproximadamente 545 nm (Figura 7A). A banda alfa sempre tem uma intensidade bem menor do que a banda beta por se tratar de uma transição proibida (DOLPHIN, 1978), e comumente acaba aparecendo colapsada à banda beta. No caso da forma *cianomet*, observa-se um deslocamento da banda de *Soret* para uma região de menor energia, ficando centrada em 424 nm. Isso ocorre devido ao fato do CN^- ser um forte π -acceptor, fazendo com ocorra um desdobramento maior dos orbitais do metal (e_g ,

t_{2g}), o que acaba por aumentar a energia dos orbitais a_{1u} e a_{2u} do anel porfirínico, diminuindo a separação energética entre estes e os orbitais e_g do anel (OWENS; CONNOR, 1988). Pela mesma razão ocorre um deslocamento das bandas Q na forma cianomet, com a banda beta surgindo em 540 nm e a banda alfa aparecendo apenas como um ombro em torno de 572 nm (Figura 7).

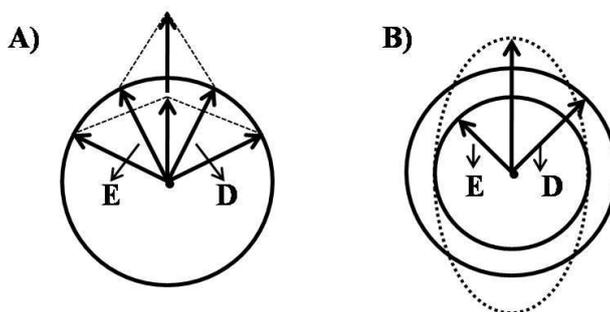
A estrutura de raios-x do domínio PAS da FixL em sua forma *deoxi* mostra que o grupo heme encontra-se pentacoordenado (KEY; MOFFAT, 2005). O fato da banda *Soret* aparecer deslocada para o vermelho é uma indicação que o ferro encontra-se em estado de baixo spin, provocando uma diminuição na separação entre os níveis energéticos dos orbitais ligantes e antiligantes do anel porfirínico. A falta de forma para as bandas na região do visível (α/β) pode ser interpretado como o surgimento de transferência de carga e transições d-d, que acabam por diminuir o tempo de vida dos estados eletrônicos no visível (DOLPHIN, 1978). Tanto na forma *oxi* quanto na forma *carboxi* da FixL observa-se o desdobramento em duas bandas na região do visível, com a banda beta aparecendo em 545 nm para as duas formas e a banda alfa aparecendo em 576 nm e em 580 nm, para *carboxi* e *oxi*, respectivamente. O fato da banda alfa aparecer quase tão intensa quanto a banda beta pode ser devido ao acoplamento vibrônico acontecendo com a banda *Soret* que aparece muito intensa nas duas formas (DOLPHIN, 1978; OWENS; CONNOR, 1988). No caso da forma *carboxi*, a banda de *Soret* intensa em 426 nm é uma indicação da formação do complexo de baixo spin. O fato da banda *Soret* para a forma *oxi* aparecer em 420 nm, e não em 418 nm como já foi mostrado para outra FixL, indica que a proteína não está totalmente ligada a oxigênio. Sousa e colaboradores já determinaram anteriormente que a FixL de *Rhizobium etli* possui reduzida afinidade a oxigênio em comparação a outras FixL e encontra-se, mesmo em solução saturada de oxigênio, expressivamente, numa mistura contendo a forma *deoxi* (SOUSA, EDUARDO H S *et al.*, 2013).

4. 3 Investigação das estruturas da FixL utilizando Dicroísmo Circular (CD)

O uso de espectroscopia de dicroísmo circular (*Circular Dichroism – CD*) no estudo de estruturas biológicas tem crescido largamente desde o desenvolvimento de espectrofotômetros comerciais nos anos de 1960 (FASMAN, 1996). Os sinais de CD surgem devido a absorção diferenciada dos dois componentes da luz circularmente polarizada (polarizada para esquerda e polarizada para direita). Quando ocorre essa

absorção diferenciada a luz resultante que emerge da amostra descreve uma trajetória elíptica (Figura 8). Normalmente o espectro de CD é apresentado como o valor da elipticidade (θ), em graus, em função do comprimento de onda. A elipticidade é descrita a partir da relação entre os eixos da elipse resultante da trajetória da luz emergente da amostra, $\theta = \tan^{-1}(b/a)$, onde b e a são os eixos maior e menor da elipse. Há uma relação direta entre a diferença de absorção e a elipticidade ($\theta = 32,98 \cdot \Delta A$) (KELLY, S. M.; JESS; PRICE, 2005).

FIGURA 8 – Representação esquemática do fenômeno de dicroísmo circular. Os dois componentes circularmente polarizados da luz plano polarizada (E-esquerdo e D-direito). A) Os dois componentes têm a mesma magnitude e quando combinados geram radiação plano polarizada. B) Os dois componentes têm magnitudes diferentes e sua combinação gera radiação elípticamente polarizada.



Fonte: o autor (adaptado de KELLY, S. M.; JESS; PRICE, 2005).

Para que um grupo cromóforo absorva os dois componentes da luz em quantidades diferentes ele deve ser intrinsecamente quiral, estar ligado a um centro estereogênico ou estar em um ambiente quiral devido a estrutura tridimensional da molécula. Em proteínas esses grupos são principalmente as ligações peptídicas, que absorvem em regiões abaixo de 240 nm (*far-UV*); os resíduos de aminoácidos aromáticos, absorvendo na faixa entre 260 e 320 nm (*near-UV*); além de co-fatores, como o grupo heme que absorve fortemente em torno de 410 nm, e podem possuir bandas entre 350 e 650 nm, dependendo do estado spin e do número de coordenação do átomo de ferro. Uma análise da região do *far-UV* no espectro de CD de uma proteína pode fornecer informações a respeito do tipo de estruturas secundárias em que a proteína se organiza. Enquanto a região do *near-UV* pode ser usada por exemplo para investigar se a proteína está em seu enovelamento ideal, se ocorreram alterações na

estrutura terciária devido a mutações, interações com ligantes ou com outras proteínas, e ainda como determinadas regiões da proteína afetam outras regiões. Adicionalmente, os sinais que surgem devido à absorção de cofatores não-protéicos podem ser usados para avaliar a integridade dos mesmos e se ocorrem alterações no microambiente que os circundam em função de alterações na proteína como um todo (KELLY, S. M.; JESS; PRICE, 2005; TEDESCO; BERTUCCI, 2015).

Apesar dos espectros de CD na região do *near-UV* e do visível serem apresentados normalmente em termos de elipicidade em graus (ou miligraus), é comum observar espectros na região do *far-UV* sendo apresentados em termos de elipicidade por resíduo principal (em inglês, *mean residue ellipticity*), $\theta(\text{mrw})$. O cálculo da elipicidade por resíduo principal envolve o número de ligações peptídicas, a massa molar da proteína, o caminho ótico da célula usada e a concentração da proteína. A unidade usada é $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$. Essa é uma forma de levar em consideração as várias ligações peptídicas que compõem a proteína, e que são os principais grupos cromóforos que absorvem nessa região do espectro. Isso torna possível que sejam feitas comparações entre espectros de diferentes proteínas, de modo a comparar suas estruturas secundárias (KELLY, S. M.; JESS; PRICE, 2005).

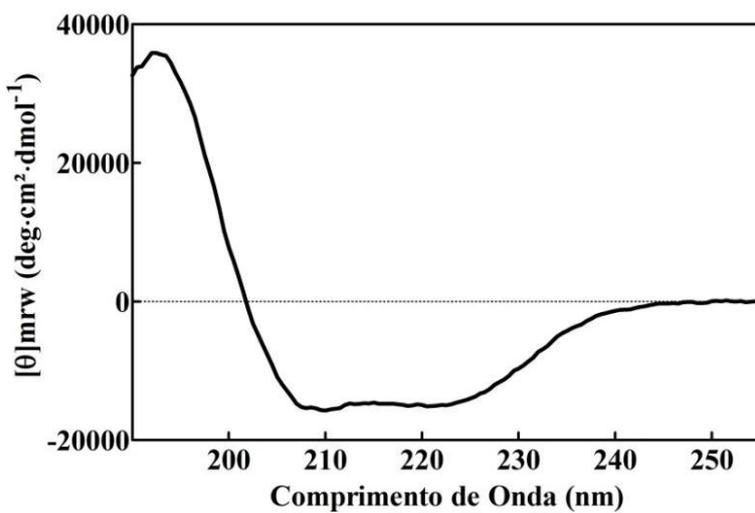
4. 3.1 Estrutura secundária

A estrutura secundária de uma proteína diz respeito à sua organização local mantida em sua maior parte por interações físico-químicas, comumente ligações de hidrogênio, entre os resíduos de aminoácidos que se encontram próximos. Estruturas secundárias típicas são α -hélices e β -folhas (ROSENBERG, 1996). Na região do ultravioleta distante (*far-UV*) os principais grupos que absorvem radiação são as ligações peptídicas. Há uma transição fraca e larga do tipo $n \rightarrow \pi^*$ em 220 nm e uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ intensa em aproximadamente 190 nm (PAIN, 2005). Os diferentes tipos de estruturas secundárias geram espectros de CD característicos na região do ultravioleta distante (KELLY, S. M.; JESS; PRICE, 2005). De modo que esta tem sido a técnica mais comumente empregada para avaliar a formação e a contribuição destas estruturas.

O espectro de dicroísmo circular para FixL, na faixa entre 190 e 240 nm, foi medido com o objetivo de obter informação relativa à estrutura secundária desta proteína, uma vez que não existem dados estruturais para a proteína completa. A figura

9 apresenta o espectro de dicroísmo circular para FixL-Fe²⁺ (*deoxi*) nessa faixa de comprimento de onda.

FIGURA 9 – Espectro de dicroísmo circular para a FixL-Fe²⁺ (*deoxi*) na região do espectro entre 190 e 240 nm, cubeta com caminho ótico de 0,1 cm, proteína na concentração de 1 μmol L⁻¹, velocidade de varredura de 100 nm/min, 10 acumulações de espectro.



Fonte: o autor.

Observando-se o espectro da figura 9 é possível identificar um sinal negativo intenso em aproximadamente 222 nm (-12941 deg cm² dmol⁻¹) e outro sinal igualmente intenso em 209 nm (-13541 deg cm² dmol⁻¹). Esses sinais são característicos de proteínas que apresentam sua estrutura secundária majoritariamente em α -hélices, considerando-se que um polipeptídeo hipotético formado exclusivamente por α -hélices tem uma elipticidade, em 222 nm, de aproximadamente -30000 deg cm² dmol⁻¹ (PAIN, 2005).

Foram utilizados os programas CDRRTS, CONTINLL e SELCON3 para estimar a estrutura secundária global da FixL. Esses programas fazem uso de algoritmos que, utilizando espectros de dicroísmo circular e bancos de dados de proteínas com estruturas secundárias conhecidas, estabelece quais as percentagens de α -hélices e β -folhas devem estar presentes na proteína, com um nível razoável de precisão, sendo os resultados obtidos para a quantidade de α -hélices mais confiáveis (KELLY, S. M.; JESS; PRICE, 2005; SREERAMA; VENYAMINOV; WOODY, 1999; SREERAMA; WOODY, 2000; VAN STOKKUM *et al.*, 1990).

As análises com os três programas revelaram poucas diferenças entre os valores para os percentuais das estruturas. Como já havia sido observado pelo aspecto geral do espectro de CD, a proteína FixL apresenta-se em sua maior parte na forma de α -hélices, sendo 42% o valor médio para esse tipo de estrutura. As estruturas β -folhas apresentam-se em uma quantidade bem menor, 14%.

Os tipos de estruturas secundárias para outras hemeoproteínas usando dicroísmo circular foram determinados por Hennessey e Johnson. Para o citocromo c eles obtiveram 42% para α -hélices e 3% para β -folhas. Para a lactato desidrogenase encontraram 39% de α -hélices e 7% de β -folhas. No caso da hemoglobina os valores foram 68 e 2% para α -hélices e β -folhas, respectivamente. E para mioglobina essas porcentagens foram 83 e 3%, respectivamente (HENNESSEY; JOHNSON, 1981). Apesar de todas as proteínas hémicas citadas aqui, assim como a FixL, apresentarem alto conteúdo de α -hélices, até então é desconhecido algum estudo que correlacione este grupo prostético com essa estrutura secundária especificamente.

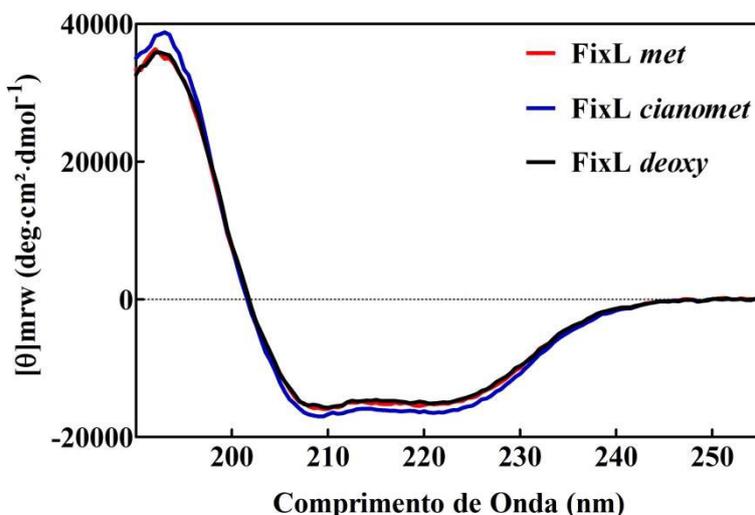
A estrutura de raios-X do domínio hémico da FixL revela que o principal tipo de estruturas existentes são β -folhas (GONG *et al.*, 1998), de forma que, baseado nos valores obtidos por CD, a ocorrência de estruturas helicoidais nos domínios enzimáticos da proteína deve ser dominante.

4. 3. 2 Mudanças na conformação de formas ativas e inativas

Os ensaios a seguir foram realizados para investigar as potenciais alterações estruturais sofridas nas estruturas secundária e terciária da proteína FixL, bem como em seu grupo prostético, particularmente quando esta passa de uma forma enzimaticamente ativa para uma forma enzimaticamente inativa. Estudos mostram que a ativação (e inativação) da proteína FixL de *R. etli* e de outros organismos não está associada a alterações na estrutura quaternária (SOUSA *et al.*, 2013).

A Figura 10 apresenta o espectro de dicroísmo circular na faixa de comprimento de onda entre 190 e 255 nm para FixL-Fe³⁺ pentacoordenado (*met*), FixL-Fe³⁺-CN⁻ (*cianomet*) e FixL-Fe²⁺ pentacoordenado (*deoxi*). Desta forma, observou-se que não há diferenças significativas entre os espectros de *far-UV* para as diferentes formas de FixL estudadas. Podemos assim afirmar, a partir dos dados apresentados, que não ocorrem alterações significativas na estrutura secundária da proteína quando esta passa de uma forma ativa para uma forma inativa.

FIGURA 10 – Espectros de dicroísmo circular na região do ultravioleta distante (*far-UV*) para FixL nas formas *met* (FixL-Fe³⁺), *cianomet* (FixL-Fe³⁺-CN⁻) e *deoxy* (FixL-Fe²⁺). Caminho ótico de 0,1 cm, proteína na concentração de 1 μmol·L⁻¹, velocidade de varredura de 100 nm/min, 10 acumulações de espectros.

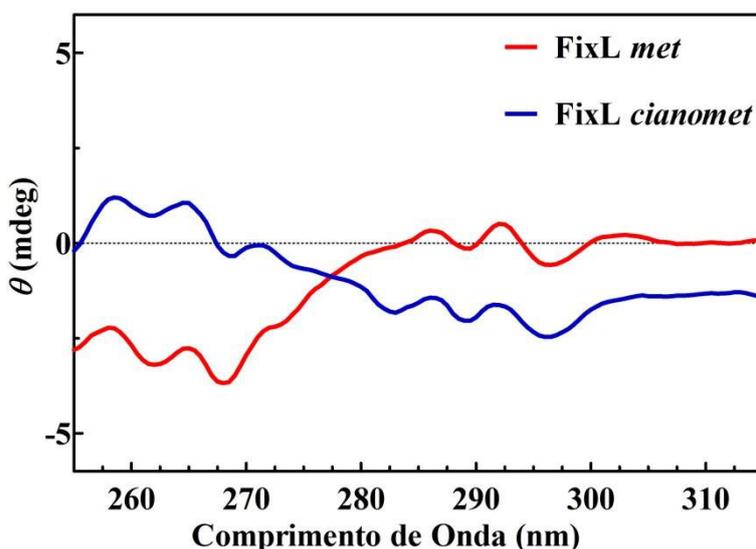


Fonte: o autor.

A Figura 11 apresenta os espectros de dicroísmo circular na região do ultravioleta próximo (*near-UV*), de 255 a 340 nm, para FixL com grupo heme em duas formas distintas: pentacoordenado e com ferro no estado de oxidação 3+ (*met*), e hexacoordenado ligado ao CN⁻ e com ferro no estado de oxidação 3+. Na região do UV-próximo no espectro de dicroísmo circular, os sinais na faixa de mais alta energia representam as transições eletrônicas que ocorrem devido às absorções dos grupos aromáticos dos resíduos de fenilalanina (260-270nm), um sinal que surge entre 272 e 285 nm é devido à absorção das tirosinas, enquanto os sinais entre 285 e 300 nm se devem aos triptofanos. Os triptofanos e as fenilalaninas encontram-se distribuídos ao longo de todos os domínios da proteína FixL (Figura 14). Curiosamente, ao se observar os espectros de CD para FixL na forma *met* e na forma coordenada ao cianeto (CN⁻), verifica-se uma inversão em praticamente todos os sinais, isso poderia ser associado com uma diminuição na intensidade dos sinais da forma hexacoordenada. Em ambas as formas, o estado de oxidação do ferro é o mesmo, 3+, todavia o ferro passa de pentacoordenado para hexacoordenado, de modo que se pode atribuir primariamente as diferenças observadas entre os espectros à mudança na coordenação do ferro. O resultado observado nessa região do espectro está em acordo com aquele verificado para a região visível do espectro de CD. Isto é, as mudanças que acontecem no grupo heme

quando este se liga ao CN^- são acompanhadas de mudanças na estrutura terciária da proteína que devem estar relacionadas a perda de atividade quinase.

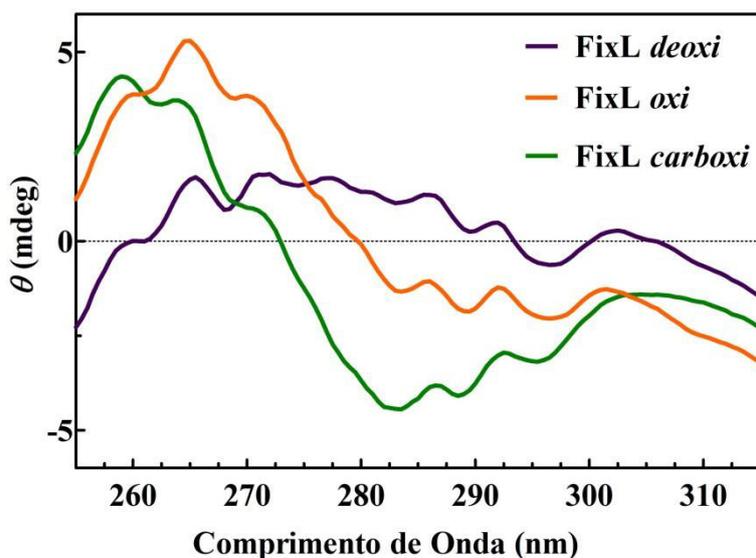
FIGURA 11 - Espectro de dicroísmo circular na região do ultravioleta próximo (*near-UV*) para FixL na forma *met* (FixL-Fe^{3+}) e na forma *cianomet* ($\text{FixL-Fe}^{3+}\text{-CN}^-$). Utilizou-se cubeta com caminho ótico de 1 cm, *bandwidth* de 1 nm; velocidade de varredura de 50 nm/min, proteína na concentração de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 10 acumulações de espectros.



Fonte: o autor.

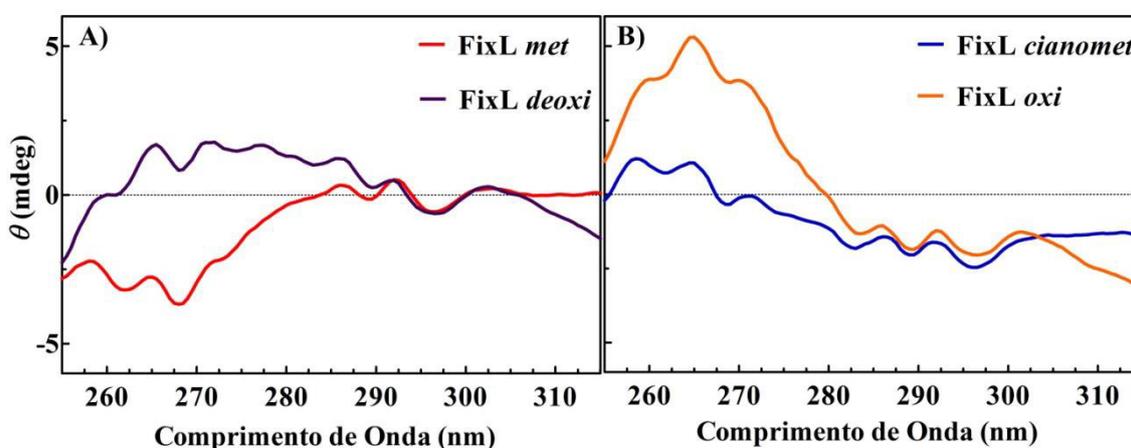
A Figura 12 mostra os espectros de dicroísmo circular na região do ultravioleta próximo, de 255 a 340 nm, para a FixL na forma *deoxy* (FixL-Fe^{2+}), na forma *oxy* ($\text{FixL-Fe}^{2+}\text{-O}_2$) e na forma *carboxi* ($\text{FixL-Fe}^{2+}\text{-CO}$). Nos espectros na região do ultravioleta próximo (*near-UV*) para FixL-Fe^{2+} pentacoordenada (*deoxy*) e para $\text{FixL-Fe}^{2+}\text{-O}_2$ (*oxy*) se observa inversões de sinais na região entre 280 e 305 nm. A proteína FixL quando ligada ao O_2 tem sua atividade quinase fortemente inibida, isso provavelmente ocorre em decorrência das mudanças observadas na estrutura terciária da proteína provocada por este ligante, o que pode estar sendo observada por CD.

FIGURA 12 – Espectro de dicroísmo circular na região do ultravioleta próximo (*near-UV*) para FixL nas formas *deoxi* (FixL-Fe²⁺), *oxi* (FixL-Fe²⁺-O₂) e *carboxi* (FixL-Fe²⁺-CO). Utilizou-se cubeta com caminho ótico de 1 cm, *bandwidth* de 1 nm; velocidade de varredura de 50 nm/min e proteína na concentração de 20 μmol L⁻¹.



Fonte: o autor.

FIGURA 13 – Espectros de dicroísmo circular na região do ultravioleta próximo (*near-UV*) para estados ativos e inativos. A) Estados ativos, FixL-Fe³⁺ e FixL-Fe²⁺; e B) Estados inativos, FixL-Fe³⁺-CN⁻ e FixL-Fe²⁺-O₂. Caminho ótico de 1 cm, *bandwidth* de 1 nm; velocidade de varredura de 50 nm/min e proteína na concentração de 20 μmol L⁻¹.



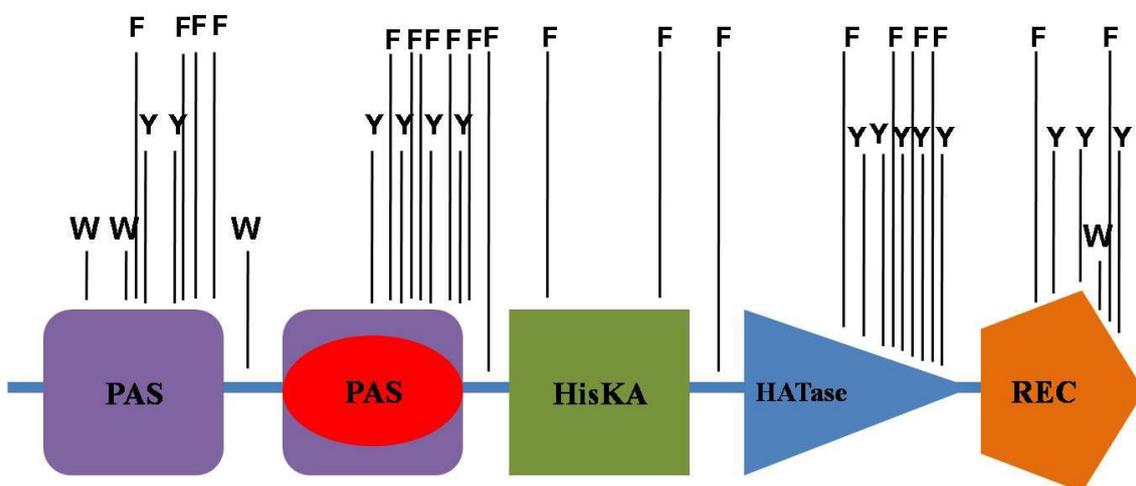
Fonte: o autor.

Adicionalmente, observou-se algumas semelhanças nos espectros de dicroísmo circular na região do *near-UV* quando são comparadas as formas ativas e inativas

separadamente. A figura 13 mostra os espectros de CD na faixa de comprimento de onda entre 255 e 320 nm para a FixL em seus diferentes estados, de forma a comparar FixL-Fe³⁺ com FixL-Fe²⁺, ambas formas enzimaticamente ativas; e FixL-Fe³⁺-CN⁻ com FixL-Fe²⁺-O₂, as quais são formas enzimaticamente inativas.

É possível observar na figura 13 que os sinais das formas ativas (*met* e *deoxi*) convergem na região que vai de 291 a 306 nm. Enquanto entre as formas inativas (*cianomet* e *oxi*) os sinais são muito semelhantes entre 285 e 304 nm. Nessa região em questão os sinais são devido principalmente as absorções dos anéis aromáticos dos triptofanos. Curiosamente, a distribuição de triptofanos na ReFixL é bastante restrita e limita-se ao domínio PAS1 e ao REC, diferentemente do que ocorre com tirosinas e fenilalaninas, que ocorrem em maior quantidade e estão distribuídas por toda a proteína (Figura 14). Levando em conta isso, é possível que o monitoramento do espectro de CD na região onde os sinais surgem devido ao triptofano possa ser utilizado para indicar se hemoproteínas sensoras estão em um estado ativo ou inativo, o que não se dispõe de qualquer técnica disponível, exceto a medição direta de atividade enzimática quinase. Estudos adicionais que possibilitem melhores esclarecimentos devem ser considerados.

FIGURA 14 – Representação esquemática dos domínios da proteína ReFixL, com indicação da localização relativa dos aminoácidos aromáticos (W= triptofanos; Y= tirosinas; F= fenilalaninas).

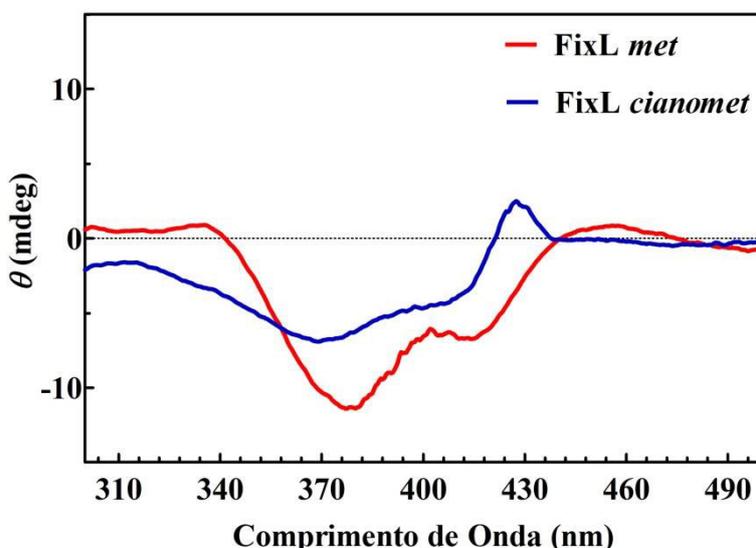


Fonte: o autor.

A Figura 15 mostra os espectros de dicroísmo circular na região do ultravioleta e visível, de 300 a 500 nm, para FixL na forma *met*, isto é, com o ferro do grupo heme no estado de oxidação 3+ e pentacoordenado, e também para FixL com ferro do grupo

heme no estado de oxidação 3+ e ligado a CN^- . É possível observar na Figura 15 que há diferenças consideráveis entre os espectros da FixL na forma *met*, uma forma ativa, e na forma hexacoordenada ligada a CN^- , uma forma inativa. Na forma *met* o sinal é majoritariamente negativo com dois mínimos, um em 380 nm e o outro em 414 nm. Após a ligação do cianeto o mínimo observado a 380 nm diminuiu de intensidade e sofreu um deslocamento hipsocrômico para 369 nm. Na $\text{FixL-Fe}^{3+}\text{-CN}$ aparece um sinal positivo com um máximo em 428 nm, ocorrendo nesta região uma inversão do espectro da FixL na forma *met* em relação ao sinal visto na forma ligada ao CN^- , além de um pequeno deslocamento para região de menor energia.

FIGURA 15 – Espectro de dicroísmo circular na região do visível para FixL nas formas *met* (FixL-Fe^{3+}) e *cianomet* ($\text{FixL-Fe}^{3+}\text{-CN}^-$). Caminho óptico de 1 cm, *bandwidth* de 1 nm; velocidade de varredura de 50 nm/min e proteína na concentração de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$.

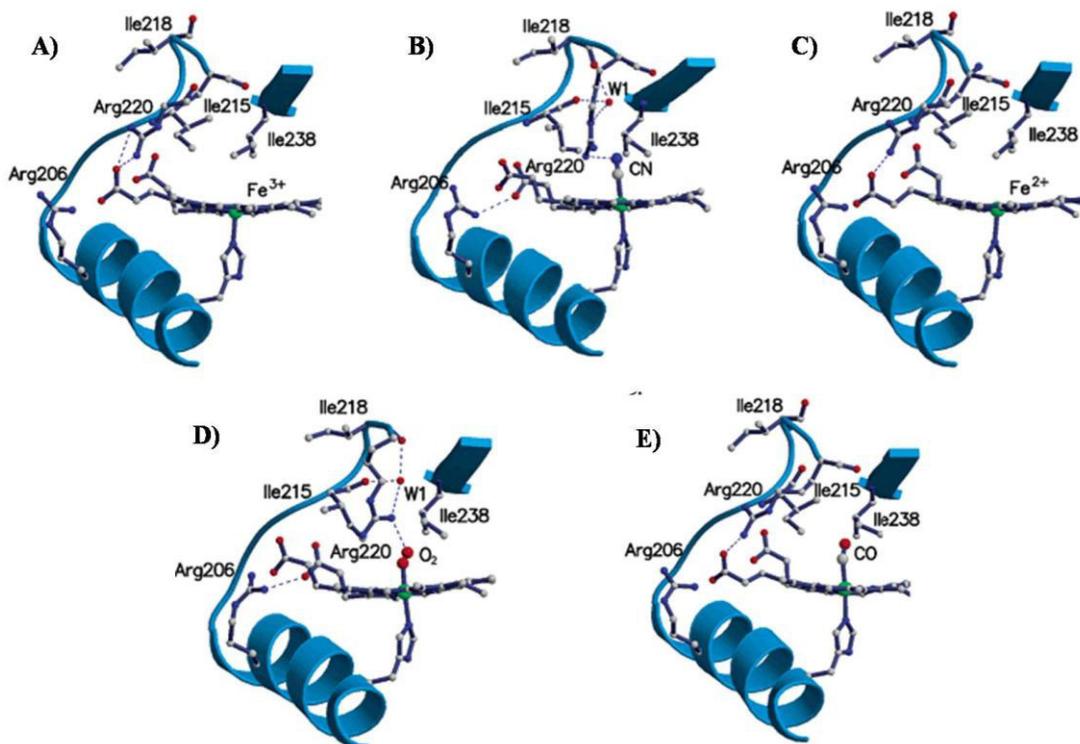


Fonte: o autor.

Sabe-se que quando um ligante de campo forte como o CN^- se liga ao ferro do grupo heme, ocorre uma mudança no estado de spin do metal, que passa a ser de spin baixo. Essa alteração provoca uma diminuição no seu raio, permitindo uma melhor acomodação no centro do anel. Já foi mostrado para RmFixL que quando está ligado ao CN^- o grupo ferro-protoporfirina-IX está em uma configuração planar, enquanto que na forma *met* há um desvio da planaridade com o átomo de ferro se distanciando cerca de $0,44 \text{ \AA}$ do centro anel (MIYATAKE *et al.*, 1999). Adicionalmente, essas perturbações causam modificações no posicionamento dos grupos laterais, vinila e propionato. A maior intensidade da banda *Soret* para a forma enzimaticamente ativa, *met*, pode ser em

parte atribuída ao fato de ser observada aqui uma estrutura distorcida em relação ao plano, como já foi mostrado para formas modificadas de grupo heme (NAGAI *et al.*, 2015). Ao passar da forma *met*, para a forma *cianomet* ocorre também um distanciamento entre o grupo heme e o *loop* FG do domínio PAS, fazendo com que sejam perdidas interações estabelecidas entre essa região e os grupos propionato do heme (Figura 16) (HAO *et al.*, 2002). É possível que a diminuição do sinal negativo no espectro de CD da *FixL cianomet* em relação ao da forma *met* esteja associado a esta mudança ocorrida nos grupos propionato, os quais já foram estabelecidos como sendo responsáveis pelo aumento na intensidade dos sinais do grupo heme através da interação estabelecida com a cadeia protéica em mioglobina (NAGAI *et al.*, 2015). Gallar e Olsen (2006) mostraram evidências de que os propionatos do grupo heme não funcionam só como grupos ancoradores na estrutura da proteína, mas participam da transferência de elétrons no anel porfirínico, através do seu par de elétrons isolado, e a dinâmica da proteína tem repercussões nesse fenômeno (GUALLAR; OLSEN, 2006).

Figura 16 – Estruturas de raios-X resolvidas da proteína *BjFixL* em diferentes formas mostrando interações (linhas pontilhadas) entre ligantes e uma arginina conservada, e entre os grupos propionatos e aminoácidos laterais ao grupo heme. A) *met*; B) *cianomet*; C) *deoxi*; D) *oxi* e E) *carboxi*.



Fonte: HAO *et al.*, 2002.

Os resultados obtidos permitem-nos dizer que a ligação do CN^- ao grupo heme produz alterações significativas na conformação do ambiente protéico que circunda o heme e como consequência podemos inferir que com certeza induz alterações conformacionais no grupo PAS e como vimos anteriormente pelo *near-UV* repercute em toda a FixL.

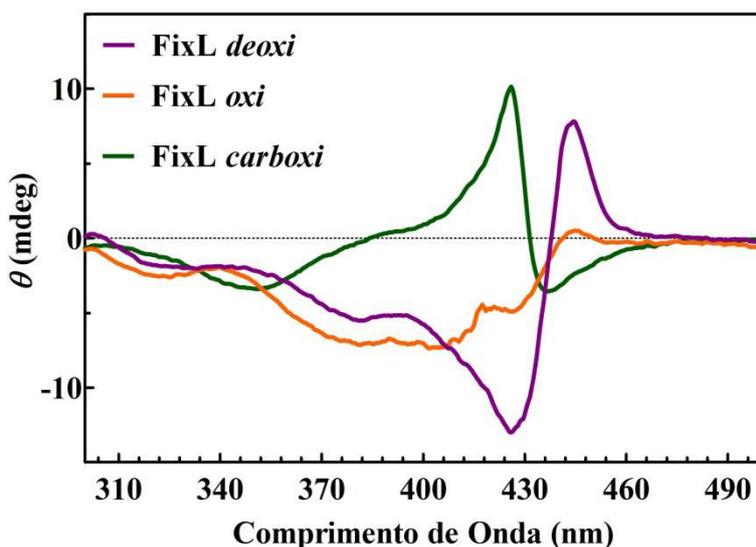
O espectro de dicroísmo circular pode fornecer informações importantes a respeito do microambiente que circunda os cofatores de proteínas, muitas vezes um cofator livre não apresenta ou apresenta um sinal muito fraco no espectro de CD. O grupo heme, por exemplo, é um derivado da porfirina, e devido a sua simetria a porfirina é opticamente inativa (KELLY, S.; PRICE, 2000). Quando o heme está ligado a proteína surge uma atividade ótica induzida pelas interações do grupo prostético com a proteína. Isso leva a geração de sinais de CD devido às transições eletrônicas no grupo heme (HSU; WOODY, 1971). Essa mudança na força rotacional de uma molécula é chamada “Efeito Cotton”. O efeito Cotton observado no espectro dicroico da FixL na forma *met* (Fe^{3+}) é do tipo negativo.

A Figura 17 mostra os espectros de dicroísmo circular na região do ultravioleta e visível, na faixa de 300 a 500 nm, para a proteína FixL com ferro do grupo heme no estado de oxidação 2+ quando está pentacoordenado (forma *deoxy*), quando está coordenado a O_2 (forma *oxi*) e quando está coordenado a CO (forma *carboxi*). Entre os espectros da FixL nas formas *deoxy* e *oxi* notam-se diferenças quanto à intensidade dos sinais, especialmente os localizados em 426 nm e em 445 nm. Devido as diferenças apresentadas é possível afirmar que a ligação da molécula de oxigênio, que torna a proteína FixL inativa, leva a uma mudança no microambiente que circunda o grupo heme. Essa mudança, aparentemente, é menos pronunciada que a mudança que ocorre quando um íon CN^- se liga a proteína FixL oxidada (Fe^{3+}), o que também causa inatividade. É provável que isso se deva em parte ao fato da proteína não saturada completamente de oxigênio, mesmo em uma solução saturada de O_2 , dada a sua baixíssima afinidade por esse gás (SOUSA *et al.*, 2013).

Em relação à FixL coordenada ao monóxido de carbono (CO), há apenas uma pequena inibição da atividade enzimática da proteína nesta forma, portanto, a proteína Fe^{2+} -CO encontra-se ainda consideravelmente na forma ativa. No entanto, o espectro de CD, entre 300-500 nm, é significativamente diferente do medido para FixL- Fe^{2+} (*deoxy*).

O máximo em 426 nm aparece com sinal positivo, enquanto o máximo observado na forma deoxy em 445 nm foi deslocado para 437 nm e ficou negativo.

FIGURA 17 – Espectro de dicroísmo circular na região do ultravioleta e visível para FixL-Fe²⁺ na forma pentacoordenada (*deoxi*), coordenado ao O₂ (*oxi*) e coordenado ao CO. Caminho ótico de 1 cm, *bandwidth* de 1 nm; velocidade de varredura de 50 nm/min e proteína na concentração de 20 μmol L⁻¹.



Fonte: o autor.

O fato das formas *deoxi* e *carboxi* apresentarem sinais intensos, enquanto a forma *oxi* apresenta um sinal menos pronunciado, está em acordo com a proposta apresentada anteriormente, de que a interação dos propionatos com a cadeia lateral ao grupo heme causa esse incremento na absorção, tendo em vista que, dessas três formas, a ligada ao oxigênio é a única onde não são estabelecidas essas interações (HAO *et al.*, 2002). As duas formas ativas da enzima (*deoxi* e *carboxi*) apresentaram sinais positivos e negativos, entretanto o sinal negativo da forma *deoxi* é consideravelmente maior. Quando a proteína encontra-se ligada ao CO, o anel do grupo heme adquire conformação planar perfeita, ao passo que quando este está pentacoordenado, há uma distorção, com o ferro distanciando-se 0,55 Å do centro do anel tetrapirrólico (MIYATAKE *et al.*, 1999). Essa maior simetria da forma *carboxi* é uma forma de explicar a diminuição observada no seu sinal negativo, em relação a forma *deoxi*, estando em acordo com o que foi observado para formas *met* e *cianomet*.

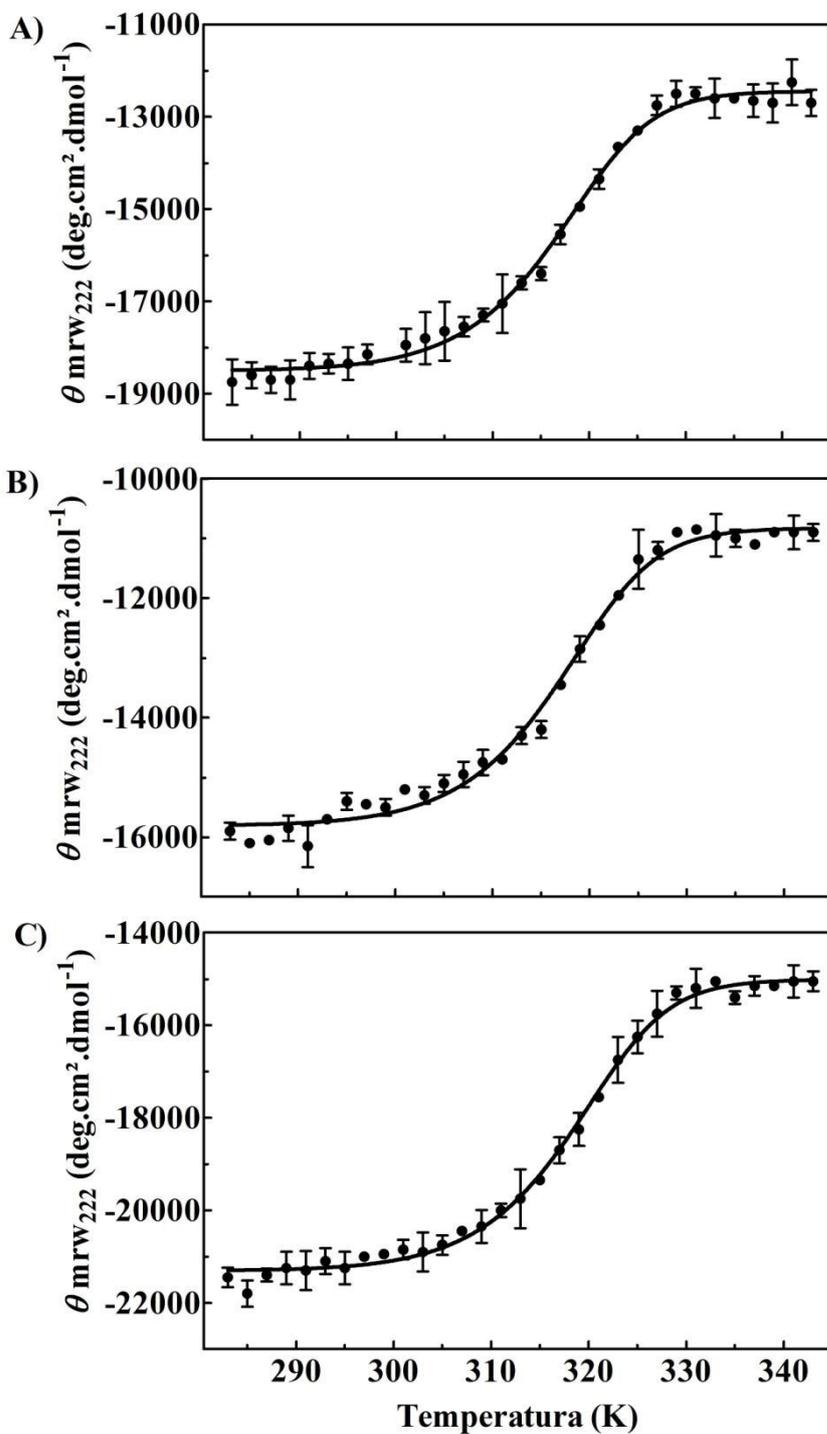
4. 4 Temperatura de Desnaturação (*Melting Temperature*, T_m)

Uma proteína sob condições que proporcionem seu enovelamento ideal (*fold*ing), quando é submetida a mudanças como, por exemplo, na temperatura, no pH do meio ou na pressão, pode sofrer alterações estruturais, levando inclusive a desnaturação. O processo de desnaturação de uma proteína envolve a perda das interações interatômicas, exceto as próprias ligações peptídicas. As ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes salinas (iônicas), e em alguns casos ligações de dissulfeto, são rompidas. Isso leva a perda da estrutura secundária da proteína, e conseqüentemente também a perda das estruturas terciária e, quando há, da estrutura quaternária.

Para se investigar as alterações que a variação de temperatura causa na estrutura secundária da FixL foram acompanhadas as mudanças de elipticidade a 222 nm, comprimento de onda responsável por um sinal intenso em espectros de proteínas com elevado conteúdo α -hélices e observado na ReFixL (ver Figura 9). Dessa forma, foram construídas as curvas de *melting* (desnaturação térmica) da proteína em três diferentes formas: FixL-Fe³⁺ (*met*), FixL-Fe³⁺-CN⁻ (*cianomet*) e FixL-Fe²⁺ (*deoxy*); e foram determinadas suas temperaturas de melting, (T_m) e variação de entalpia de enovelamento (*fold*ing, ΔH). A Figura 18 apresenta as curvas de desnaturação térmica para a FixL nas três diferentes forma mencionadas acima.

As curvas de desnaturação térmica para as três formas de FixL apresentadas na Figura 18 ilustram a expressiva similaridade global entre elas. Em todas elas a transição entre a forma enovelada e desnaturada ocorre principalmente entre 310 K (~37 °C) e 325 K (~52°C). Utilizando a equação 4 (ver seção 3.5.1), que descreve o processo de desnaturação térmica de dímeros em uma etapa sem variação na capacidade calorífica a pressão constante, foram determinadas as temperaturas de desnaturação térmica (T_m – *melting temperature*) e os valores de ΔH de enovelamento (*fold*ing). Na tabela 3 são apresentados os valores obtidos de T_m e ΔH para a FixL na forma *met* e *deoxy*, ambas formas enzimaticamente ativas, e ligada ao CN⁻, enzimaticamente inativa.

FIGURA 18 – Perfis de desnaturação térmica (*Melting curves*) para a FixL. A) Na forma *met* (FixL-Fe³⁺); B) na forma *cianomet* (FixL-Fe³⁺-CN⁻); e C) na forma *deoxi* (FixL-Fe²⁺). Elipticidade de resíduo principal acompanhada a 222 nm, utilizando cubeta com caminho ótico de 0,1 cm, proteína na concentração de 1,3 μmol L⁻¹ e velocidade de varredura de 100 nm/min, resultado de três medidas independentes.



Fonte: o autor.

TABELA 3 – Desnaturação térmica, valores de T_m e ΔH de *folding* para FixL nas formas *met*, *cianomet* e *deoxi*.

FixL	T_m (°C)	ΔH_f (kcal mol ⁻¹)
<i>Met</i>	43,85 ± 0,38	-59,62 ± 4,08
<i>cianomet</i>	44,05 ± 0,36	-58,82 ± 3,79
<i>Deoxi</i>	45,55 ± 0,33	-60,39 ± 3,55

Fonte: o autor.

Analisando os valores de temperatura de *melting* (T_m) e de variação de entalpia de *folding* (ΔH_f) é possível dizer que a estabilidade da proteína não sofre mudanças consideráveis devido às diferenças conformacionais que existem entre as diferentes formas estudadas. A maior diferença ocorre entre as T_m s das formas *met* e *deoxi*, onde se observa, considerando o desvio padrão, uma pequena diferença de aproximadamente 1°C.

Curiosamente, um estudo feito com apenas o domínio PAS héptico da *BjFixL* (*Bradyrhizobium japonicum*) em sua forma *met* mostrou temperatura de *melting* igual a 56,6 ± 0,01 °C (LANDFRIED *et al.*, 2007). Todavia, é preciso cautela ao se fazer comparações com o valor obtido para esse domínio, levando em conta que foi usada uma concentração de aproximadamente 25 μmol L⁻¹, enquanto a usada neste trabalho, para a proteína inteira, foi de 1,3 μmol L⁻¹. Já foi mostrado que a concentração de uma proteína pode estar relacionada a sua estabilidade frente um processo de desnaturação térmica (BENÍTEZ-CARDOZA; ROJO-DOMI; HERNÁNDEZ-ARANA, 2001; QI *et al.*, 1995). Todavia, a maior estabilidade do domínio isolado comparado à proteína inteira é plausível com resultados mostrados por outros autores. Experimentos feitos com mutantes da proteína membrana NaChBac indicaram que ao perder um de seus domínios a proteína ficou termicamente mais estável (POWL; MILES; WALLACE, 2012). O domínio N-terminal isolado de uma α-amilase mostrou-se mais estável frente a desnaturação térmica quando comparado a proteína inteira, tendo em vista que foi observado um aumento em 7°C na temperatura de *melting* (LU *et al.*, 2016). Em outro trabalho mostrou-se que a exclusão, através de mutação, de uma região contendo 9 aminoácidos em uma aminotransferase fez com que seu tempo de meia vida para inativação por calor fosse mais que o dobro do valor para a proteína na sua forma íntegra (AZZARITI *et al.*, 1998). Uma explicação que poderia ser dada a menor

estabilidade da proteína completa comparada a um de seus domínios isolados seria o fato de que a estrutura maior da forma completa sofre mais com o fenômeno de cooperatividade na desnaturação térmica. Em outras palavras, existe uma quantidade maior de regiões para serem desestabilizadas gradativamente até que em dado momento a proteína seja desenovelada de forma mais abrupta perdendo completamente seu *fold*ing. Isso deve ser ponderado com cuidado, já que em alguns casos a deleção de partes de uma proteína acabou aumentando sua estabilidades (HIERRO *et al.*, 2002) ou não tendo efeitos significativos (SIERON *et al.*, 1993).

Banerjee e colaboradores fizeram estudos semelhantes com mieloperoxidase humana, uma hemoproteína dimérica que, assim como a FixL, é formada majoritariamente por α -hélices, e tem massa molecular razoavelmente próxima da FixL, ~73 kDa por monômero. Estes autores obtiveram valores de 220 kcal mol⁻¹ e 80,9 °C, para ΔH_f e T_m , respectivamente (BANERJEE *et al.*, 2011). Por meio desses parâmetros torna evidente que a FixL é consideravelmente menos estável termicamente que esta outra enzima hémica. Essa baixa estabilidade está provavelmente associada a flexibilidade estrutural exigida a sua função sensora, o que é oposto ao de sistemas catalíticos como o caso da mieloperoxidase. A comparação com os valores de T_m de outras hemoproteínas, tais como ferricitocromo c₅₅₂ de *C. psychrerythraea* (OSWALD, VICTORIA F.; CHEN, WEITING; HARVILLA, PAUL B.; MAGYAR, 2013) e hemoglobina de *G. paulistus* (CARVALHO *et al.*, 2013), que são 61 e 62°C, respectivamente, corrobora com a proposta de baixa estabilidade térmica da FixL. Esta propriedade não deve ter um aspecto tão crítico para sensores biológicos, todavia, a baixa estabilidade térmica seria bem mais prejudicial para a célula se fosse observada com proteínas envolvidas diretamente em eventos metabólicos, tal como alguns dos exemplos apresentados acima.

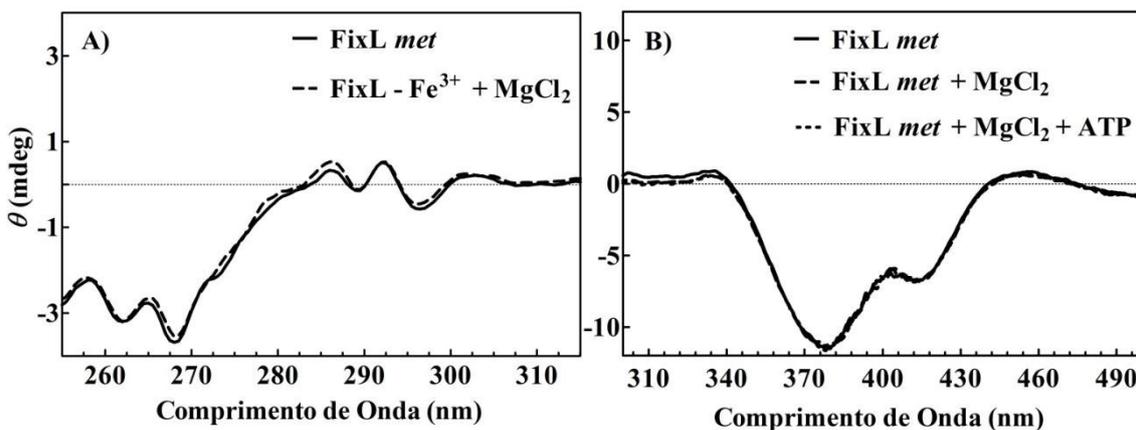
4.6 Investigação conformacional com o cátion divalente (Mg²⁺) e ATP

Para que a autofosforilação das proteínas quinases aconteça geralmente é necessário um cátion divalente, comumente Mg²⁺ (ADAMS; TAYLOR, 1993; FEBS, 1990). O cátion magnésio se liga ao substrato da proteína, isto é, ao ATP, permitindo que este interaja com a enzima, ou pode ainda se ligar diretamente à proteína, causando alguma alteração estrutural que leve ao aumento da atividade enzimática (COWAN, 2002). Portanto, empregou-se técnica de CD para avaliar possíveis alterações

conformacionais na estrutura terciária da FixL, bem como na conformação de seu grupo heme, quando a proteína se encontra na presença de Mg^{2+} . Adicionalmente, foram investigadas alterações conformacionais quando a FixL se encontra na forma ativa e na presença de ATP, que promoverá sua fosforilação.

A Figura 19 mostra os espectros de dicroísmo circular na região do ultravioleta próximo (*near-UV*) e do ultravioleta-visível para FixL- Fe^{3+} (*met*) na presença de Mg^{2+} e na presença de Mg^{2+} e ATP. A adição destes agentes não provocaram quaisquer mudanças significativas nos espectros. Tais resultados sugerem que independentemente da proteína conter ou não o íon Mg^{2+} a sua estrutura terciária permanece a mesma. Pelos modelos mencionados anteriormente, que propõe a exigência de um cátion divalente na atividade quinase, provavelmente para FixL o cátion se liga ao substrato (ATP) facilitando a sua ligação com a proteína. Adicionalmente, com o acompanhamento do espectro de CD na região do visível pode-se comprovar que tanto a presença de Mg^{2+} quanto o fato de a proteína estar fosforilada não causam mudanças em seu grupo heme (Figura 19B). Esses interessantes resultados sugerem que a conformação da FixL é fundamentalmente estabelecida pelo sinal biológico, que proporciona estrutura correta para seu funcionamento envolvendo autofosforilação e transferência de grupo fosfato, e a presença de substrato ATP e Mg^{2+} não servem para fins estruturais.

FIGURA 19 – Espectros de dicroísmo circular para FixL *met* e efeitos do metal divalente (Mg^{2+}) e ATP. A) na região do ultravioleta próximo (*near-UV*) para FixL na presença e ausência do íon Mg^{2+} , B) CD na região do ultravioleta-visível para FixL na presença de Mg^{2+} e na presença de Mg^{2+} e ATP. Caminho ótico de 1 cm, *bandwidth* de 1 nm; velocidade de varredura de 50 nm/min e proteína na concentração de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$.



Fonte: o autor.

Infelizmente, o espectro de CD na região do ultravioleta próximo para FixL na presença de Mg^{2+} e ATP não foi apresentado devido a forte interferência causada pelo ATP na região abaixo de 280 nm, mesmo em significativamente baixas concentrações (50 μM), impossibilitando esta análise.

4.7 Desnaturação com uréia

As proteínas são formadas no ribossomo inicialmente como uma sequência linear de aminoácidos que devem, durante ou após sua formação, se organizar para adquirir sua conformação nativa e funcional. Sabe-se que essa conformação não é imutável, isto é, ela é estável só até certo ponto. Alterações no ambiente em que se encontra a proteína podem levar a mudanças estruturais que podem afetar sua(s) função(ões) (NELSON; COX, 2004).

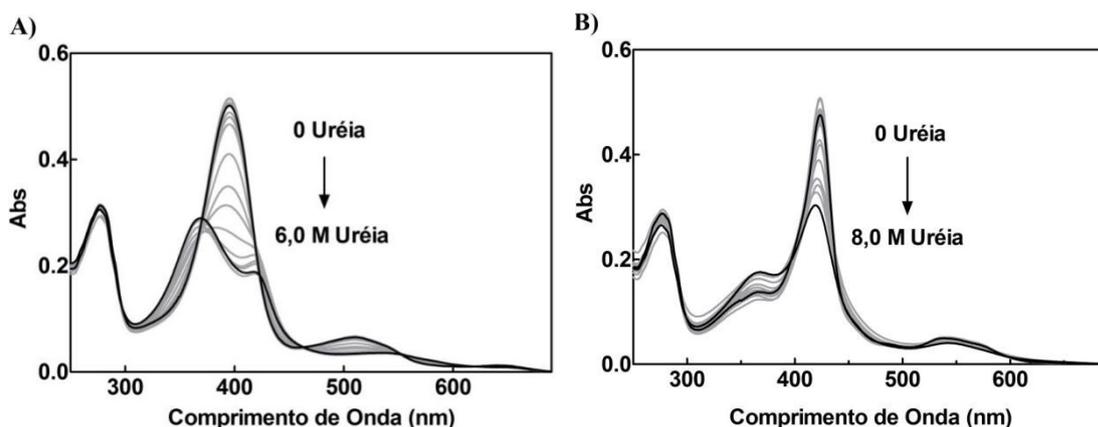
Existem várias condições e meios pelos quais uma proteína pode perder seu enovelamento funcional. Os mais comuns são o aquecimento, a ação de detergentes, mudanças de pH para valores extremos, a presença de solventes orgânicos, como álcoois ou acetona, e a presença de certos solutos, como uréia e cloridrato de guanidina. Ureia, bem como detergentes e os solventes orgânicos citados, agem primeiramente rompendo as interações hidrofóbicas (NELSON; COX, 2004).

O ensaio de desnaturação foi realizado nesta dissertação com o objetivo de verificar a estabilidade da proteína frente ao agente desnaturante uréia. Adicionalmente, interessa investigar se existem diferenças de estabilidade entre o estado enzimaticamente ativo e o inativo. Para isso, investigou-se a proteína contendo o ferro do grupo heme no estado de oxidação 3+ (pentacoordenado, *met*), e também nesse estado de oxidação coordenado ao íon CN^- (hexacoordenado, *cianomet*). A proteína ReFixL apresenta-se enzimaticamente ativa na forma *met* e inativa na forma *cianomet*, servindo assim como interessante sistema para tal estudo.

No espectro de absorção eletrônica de uma proteína, a banda *Soret* surge principalmente devido a interação do grupo heme com a estrutura terciária protéica bem estabelecida (PUETT, 1973); tornando possível investigar o processo de desnaturação de uma hemoproteína acompanhando as alterações que ocorrem nessa região do espectro. Levando em consideração esse fato, foi realizada uma titulação da proteína ReFixL com uréia sendo observadas variações na absorção máxima da banda *Soret* em 395 nm para FixL na forma Fe^{3+} (*met*) e em 422 nm para a forma $Fe^{3+}-CN^-$. A Figura

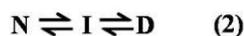
15 apresenta os espectros de absorção eletrônica na região do ultravioleta e do visível para a FixL na forma *met* e na forma ligada ao CN⁻, na concentração de 4 μmol L⁻¹, após incubação por 2 horas com diferentes concentrações de uréia. Anteriormente foram realizados experimentos de desnaturação com diferentes concentrações de uréia fazendo-se monitoramento com o tempo. Assim foi determinando que o tempo de 2 horas é suficiente para que ocorra a completa desnaturação, tendo em vista que passado esse intervalo não se observam modificações adicionais.

FIGURA 20 – Espectros eletrônicos na região do UV-Vis da FixL na concentração de 4 μmol L⁻¹ após incubação com diferentes concentrações uréia. A) FixL-Fe³⁺ (*met*), B) FixL-Fe³⁺-CN⁻.



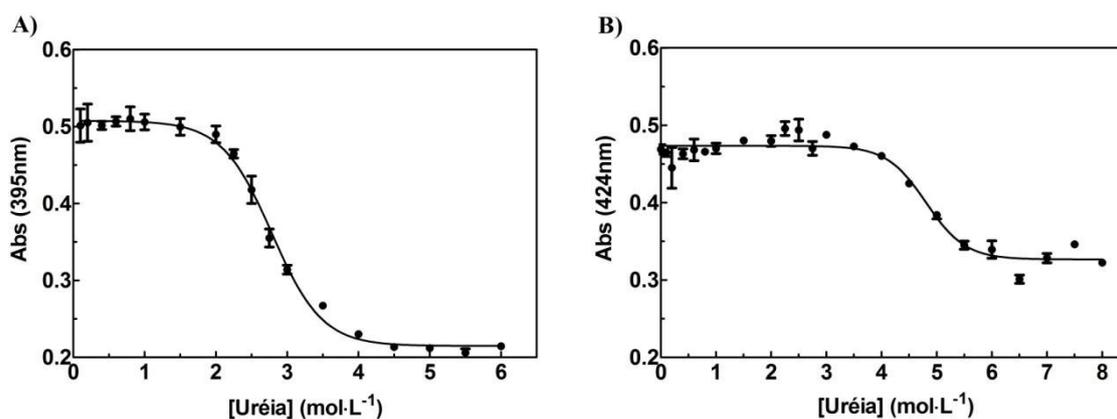
Foi observado que a medida que a concentração de uréia aumenta a absorbância máxima da banda *Soret* diminui. Esse comportamento é típico de desenovelamento de hemoproteínas frente a agentes desnaturantes químicos. Aparentemente a proteína em sua forma ativa, *met* (Figura 20A), é mais susceptível à desnaturação do ambiente que circunda o grupo heme e perda do grupo prostético em questão, já que a diminuição da absorção foi mais intensa nessa forma que na forma *cianomet* (Figura 20B).

A variação de absorbância da banda *Soret* em função da concentração do desnaturante foi analisada utilizando dois modelos de desnaturação para proteínas. O primeiro modelo propõe que a proteína passe diretamente do estado nativo (enovelado-*folded*) para um estado desnaturado (desenovelado-*unfolded*) (1). O segundo modelo é um modelo que propõe que a desnaturação ocorre em três estados, em que proteína antes de chegar ao estado desnaturado passa por um estado intermediário (2) (MORJANA; MCKEONE; GILBERT, 1993).



Estes dois modelos foram ajustados (*fitting*) aos dados experimentais utilizando as equações descritas no item 3.5 na parte de material e métodos, utilizando o método dos mínimos quadrados. O modelo que melhor descreveu a desnaturação para FixL-Fe³⁺(*met*) bem como para FixL-Fe³⁺-CN⁻ foi o modelo de desnaturação em dois estados, sem observação de intermediário, como ilustrado na Figura 21. Adicionalmente, foram obtidos desses ajustes dados termodinâmicos referentes ao modelo de desnaturação em dois estados (Equação 3).

FIGURA 21 – Desnaturação química da FixL empregando-se uréia. Perfil de desnaturação usando variação do máximo de absorção da banda *Soret* da FixL na concentração de 4 μmol L⁻¹ após incubação com uréia em diferentes concentrações para A) FixL-Fe³⁺ (*met*) e B) FixL-Fe³⁺ - CN⁻. Em ambos os gráficos, a linha preta representa o ajuste usando a fórmula para desnaturação em dois estados, cujos R² foram de 0,99 e 0,93, respectivamente.



Fonte: o autor.

Acompanhado o processo de redução da absorção da banda *Soret* é possível inferir que a FixL, na forma *met* (Fe³⁺), a partir de 1,5 mol L⁻¹ de uréia começa a sofrer alterações conformacionais no microambiente que circunda o grupo heme e com 4 mol L⁻¹ de uréia a proteína perdeu totalmente sua associação com o grupo heme. Todavia, para FixL ligada ao CN⁻, somente a partir de 4 mol L⁻¹ de agente desnaturante é que se começa a observar efeitos no grupo heme, e mesmo nas concentrações mais elevadas de

uréia, aparentemente, o grupo prostético permanece ainda parcialmente ligado à estrutura protéica.

Os parâmetros relativos à desnaturação, $\Delta G_{(H_2O)}$, m e $[D]_{1/2}$, foram obtidos do ajuste do modelo de dois estados (ver item 3.4), e estão listados tabela 4.

TABELA 4 – Parâmetros para a desnaturação química da FixL-Fe³⁺(*met*) e FixL-Fe³⁺-CN⁻ por meio do modelo de desnaturação em dois estados acompanhada por UV-Vis no máximo da banda *Soret* e por CD pela elipticidade a 222nm.

	FixL	ΔG_{H_2O} (kJ.mol ⁻¹)	m (kJ L mol ⁻²)	$[D]_{1/2}$ (mol L ⁻¹)
λ_{Soret}	<i>met</i>	19,6 ±1,2	7,0 ±0,4	2,8 ±0,2
	<i>cianomet</i>	36,2 ±5,7	7,6 ±1,2	4,8 ±1,6
θ_{222nm}	<i>met</i>	8,5 ±1,0	3,5 ±0,4	2,4 ±0,4
	<i>cianomet</i>	4,9 ±0,7	1,9 ±0,2	2,6 ±0,5

Fonte: o autor. * ΔG_{H_2O} é a energia livre de desnaturação quando a concentração do desnaturante é zero. m é a dependencia da energia livre na concentração do desnaturante, sendo determinado pela inclinação da curva. $[D]_{1/2}$ é a concentração de desnaturante que causa metade do processo de desnaturação completo.

Analisando-se através da espectroscopia eletrônica, podemos inferir fenômenos que afetam diretamente o grupo heme. Para FixL em sua forma *met*, o valor de ΔG_{H_2O} , que é a variação de energia livre do processo de desnaturação quando a concentração do agente desnaturante é extrapolada a 0 (zero), foi de 19,6 ±1,2 kJ mol⁻¹. Por outro lado, quando a proteína encontra-se na sua forma *cianomet* esse parâmetro foi de 36,2 ±5,7 kJ.mol⁻¹. Podemos interpretar esses resultados da seguinte forma, quanto maior for o valor deste $\Delta G_{(H_2O)}$ para um processo de desnaturação de uma proteína mais estável será essa proteína. Levando-se em conta esse parâmetro é possível afirmar que a ligação do grupo heme é mais estável quando a proteína está em sua forma *cianomet*. Isso sugere que a ligação do CN⁻ ao ferro hémico confere ao complexo uma estabilidade adicional, dificultando sua saída do ambiente protéico que o circunda. A proteína FixL em sua forma *met* encontra-se com o heme pentacoordenado, enquanto que na forma *cianomet* este é hexacoordenado. Um estudo feito com CoxA, um regulador transcricional envolvido no metabolismo de CO em bactérias, revelou diferenças entre as formas ligada e não ligada a CO no que diz respeito a sua estabilidade. Diferente do que é verificado para FixL de *Rhizobium etli*, todas as formas da proteína CoxA são

hexacoordenadas, sendo que quando não são ligantes exógenos, os ligantes axiais são resíduos de aminoácidos da própria cadeia protéica (THORSTEINSSON *et al.*, 2000). Foram realizadas desnaturações com cloridrato de guanidina para a proteína com grupo heme na forma reduzida [Fe(II)]. Os valores de $\Delta G_{(H_2O)}$ para as formas ligada e não ligada a CO foram de 29 e 22 kJ mol⁻¹, respectivamente (LEE *et al.*, 2009). Tendo em vista essas observações é possível sugerir que a maior estabilidade da proteína FixL na forma *cianomet* em relação a forma *met* não surge devido unicamente à hexacoordenação, mas talvez esteja associada a natureza dos ligantes axiais e possivelmente sua interação com resíduos protéicos distais. Isso se torna particularmente relevante ao se considerar que a arginina distal 220 da BjFixL tem se mostrado interagir com cianeto, como visto em estruturas de raios-X. Apesar da ReFixL não dispor da mesma arginina, apresentando em seu lugar uma histidina, esta teria similar capacidade de interagir com cianeto através de ligações de hidrogênio. Esse “ancoramento” provocado por um ligante capaz de realizar fortes interações com ligantes distais poderia adicionalmente justificar o fenômeno observado.

O valor de m é uma indicação da cooperatividade durante o processo de desnaturação. Quanto maior for m , maior será a área superficial da proteína exposta ao agente desnaturante por ocasião do desenovelamento (MYERS; PACE; SCHOLTZ, 1995). Quanto a isso, as formas *met* e *cianomet* da proteína se comportaram semelhantes, tendo em vista a proximidade dos valores de m obtidos.

Em relação a $[D]_{1/2}$, que é a concentração que causa metade do efeito da desnaturação completa, é possível afirmar que a forma hexacoordenada do grupo heme é mais estável quanto ao seu desprendimento da estrutura protéica. No caso da FixL na forma *cianomet* esse valor foi 4,7 mol L⁻¹, quase 70% maior do que para a proteína na forma *met* (2,8 mol L⁻¹).

Um estudo similar ao realizado neste trabalho foi feito com os domínios hémicos sensores GSU0582 e GSU0935, os quais fazem parte de proteínas aceptoras de metila na bactéria *Geobacter sulfurreducens* (SILVA *et al.*, 2012) Ambos sensores formam homodímeros, no entanto, diferentemente da FixL, não se encontram pentacoordenados após serem purificados, mas se encontram no estado férrico. No caso do sensor GSU0582 o grupo heme está coordenado a uma histidina e a uma molécula de água. Por outro lado, o sensor GSU0935 tem um dos monômeros com heme ligado a histidina e metionina nas posições axiais, e o outro monômero com heme ligado a histidina e água (POKKULURI *et al.*, 2008). O valor de $\Delta G_{(H_2O)}$ para GSU0582 foi de

26,3 kJ.mol⁻¹ e para GSU0935 foi de 14,6 kJ.mol⁻¹ (SILVA *et al.*, 2012). Os valores encontrados para $\Delta G_{(H_2O)}$ desses dois sensores são bastantes diferentes, apesar das semelhanças estruturais observadas entre os dois. Os autores sugerem que a estabilidade adicional do sensor GSU0582 é devido a possíveis interações eletrostáticas que não são observadas em GSU0935. É possível que quando CN⁻ está ligado ao grupo heme, esse estabeleça interações com a cadeia protéica que dificultem o desenovelamento e, por consequente, o desprendimento do heme (ver Figura 16). Essas interações tornariam mais difícil a perda do heme pela FixL-*cianomet* mesmo em relação aos sensores GSU0582 e GSU0935, nos quais, diferentemente da FixL, o grupo heme está ligado covalentemente à proteína por meio de ligações tioéter (heme-*c*).

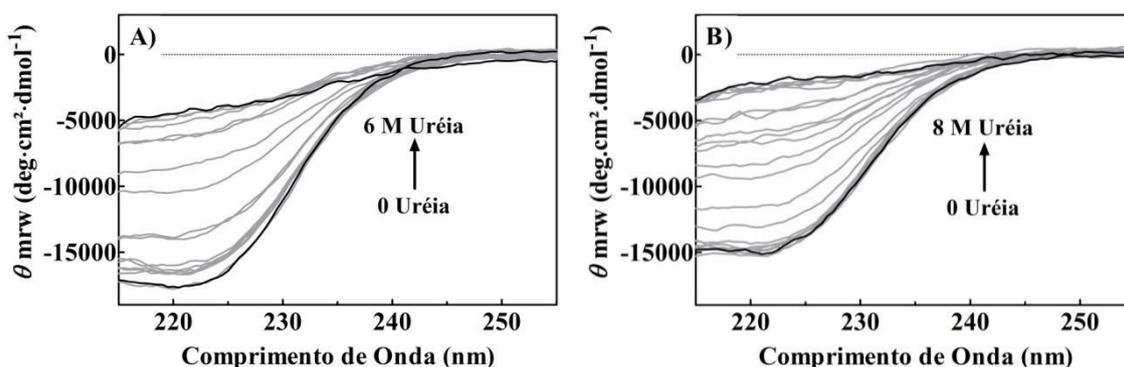
Monitorando o sinal espectroscópico do heme, é comum encontrar valores de ΔG_{H_2O} para hemeproteínas consideravelmente maiores que os valores encontrados para FixL. Para as mioglobinas (formas férricas) de baleia cachalote e de cavalo os valores encontrados foram 53,6 kJ mol⁻¹ e 41,2 kJ mol⁻¹ (PUETT, 1973). Para o citocromo c, ΔG_{H_2O} foi de 43,3 kJ mol⁻¹ (LATYPOV *et al.*, 2006). A função de uma mioglobina é o armazenameto de oxigênio, enquanto que o citocromo c realiza tranferências eletrônicas na cadeia transportadora de elétrons. É possível que a menor estabilidade da FixL se deva a flexibilidade exigida à proteína para desempenhar sua função sensora. Esta deve ser capaz de mudar conformacionalmente por ocasião da percepção de um sinal, passando de uma forma enzimaticamente ativa para uma forma inativa, o que justificaria esses valores de ΔG_{H_2O} .

Paralelamente ao estudo de desnaturação da proteína acompanhada por UV-Vis, foi realizado o mesmo tipo de experimento utilizando a técnica de dicroísmo circular. A faixa de comprimentos de onda acompanhada foi de 210 a 255 nm. Nessa região do espectro os sinais são característicos das estruturas secundárias definidas, de modo que alterações nesses sinais são uma indicação de que essas estruturas estão sendo perturbadas. Na Figura 22 estão os espectros de CD de 210 a 255 nm para FixL nas formas *met* e *cianomet* após incubação com diferentes concentrações de uréia.

Na Figura 22 é possível observar as mudanças nos espectros de CD, cujos sinais diminuem de intensidade à medida que a concentração de uréia aumenta. Isso significa que o agente desnaturante está provocando o desenovelamento da proteína, já que sua estrutura secundária característica está sendo perdida. Especificamente, o sinal com mínimo em 222 nm é o mais intenso e é o que sofre maiores diminuições com o aumento na concentração de uréia. Esse sinal é típico de proteínas com alto conteúdo de

α -hélices, podendo ser usado para monitorar a desnaturação desse tipo de proteínas. Na Figura 23 é mostrado a variação da elipticidade a 222 nm para FixL (*met* e *cianomet*) após incubação com diferentes concentrações de uréia. Adicionalmente são mostrados os ajustes utilizando a fórmula que descreve a desnaturação ocorrendo com dois estados, a qual foi a que melhor se ajustou aos dados experimentais.

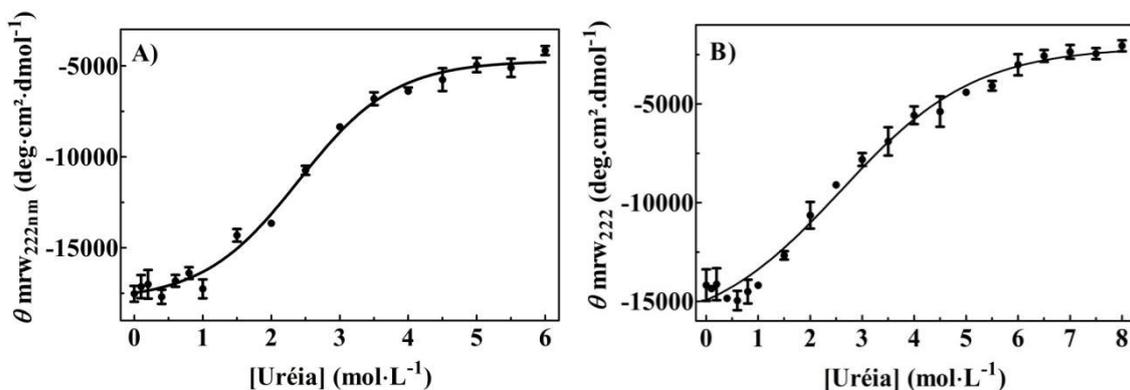
FIGURA 22 - Espectros Dicroísmo Circular da FixL na concentração de $1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ após incubação com diferentes concentrações uréia. A) FixL- Fe^{3+} (*met*), B) FixL- Fe^{3+} - CN a temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Os espectros em destaque (pretos) são os espectros iniciais e finais, isto é, na ausência de uréia e na concentração máxima de uréia, respectivamente.



Fonte: o autor.

Observando os perfis mostrados na Figura 23 é possível dizer que em concentrações de uréia inferiores a 1 mol L^{-1} a proteína, tanto na forma *met* quanto na *cianomet*, começa a sofrer modificações estruturais. Na tabela 4 estão listados os parâmetros para desnaturação monitorada através da mudança na elipticidade a 222 nm utilizando o ajuste do modelo de desnaturação em dois estados. Os valores de $\Delta G_{(H_2O)}$ para as formas *met* e *cianomet* foram $8,5 \pm 1,0$ e $4,9 \pm 0,7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente. De acordo com esses valores, no que diz respeito a estrutura secundária, a FixL em sua forma *met* é termodinamicamente mais estável do que quando está ligada ao CN. Nesse caso, observa-se o contrario do que foi visto quando $\Delta G_{(H_2O)}$ foi determinado a partir da banda *Soret* no UV-Vis, quando a forma *cianomet* mostrou-se mais estável. Deve-se ter em mente que as duas técnicas investigam estruturas diferentes, assim a forma *cianomet* pode ser mais estável apenas em relação a ligação do grupo heme à cadeia protéica.

FIGURA 23 – Desnaturação química da FixL empregando-se uréia. Perfil de desnaturação usando variação da elipticidade a 222 nm no espectro de CD da FixL na concentração de $1,6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ após incubação com uréia em diferentes concentrações para A) FixL-Fe³⁺ (*met*) e B) FixL-Fe³⁺ - CN⁻. Em ambos os gráficos, a linha preta representa o ajuste usando a fórmula para desnaturação em dois estados, cujos R² foram de 0,98 para os dois casos.



Fonte: o autor.

Comparando os valores de variação de energia livre de desnaturação obtidos pelas duas técnicas, é possível inferir que a proteína deve perder primeiramente sua estrutura secundária antes de perder a ligação com o grupo prostético, uma vez que os valores de $\Delta G_{(H_2O)}$ obtidos usando os valores de absorvância foram consideravelmente maiores.

O valor de m para a forma *met* foi mais de 90% superior ao da forma *cianomet*, indicando que a desnaturação da forma *met* é um processo com maior cooperatividade. Quanto aos $[D]_{1/2}$ as duas proteínas se comportaram semelhantemente, uma vez que esses valores foram iguais (aproximadamente $2,5 \text{ mol L}^{-1}$), considerando o desvio padrão.

Landfried e colaboradores (2007) fizeram estudos estruturais e termodinâmicos com algumas apoproteínas e respectivas holoproteínas reconstituídas. Nesse estudo foi realizada desnaturação com uréia para o domínio hémico da *BjFixL* (*Bradyrhizobium japonicum*) em sua forma *met*, a qual foi monitorada acompanhando a sua elipticidade a 222 nm. Os dados obtidos por eles se ajustaram ao modelo de desnaturação em dois estados. Os valores encontrados para $\Delta G_{(H_2O)}$ e $[D]_{1/2}$ foram $22 \pm 1,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $4,2 \pm 0,3 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente (LANDFRIED *et al.*, 2007). Esses valores são bem maiores que os encontrados para a FixL inteira usando a mesma

técnica, todavia próximos ao obtidos usando espectroscopia eletrônica onde observamos somente efeito no grupo heme. Isso indica que a proteína inteira é menos estável que seu domínio PAS hémico isolado. Interessantemente, esse resultado está em concordância com o que foi observado para a desnaturação térmica. Aqui, assim como na desnaturação térmica, é preciso levar em conta que a concentração usada no experimento com o domínio isolado ($\sim 5 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi maior que a usada neste trabalho e isso poderia alterar esses valores para fins comparativos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao fim do processo de produção da proteína seguido das etapas de purificação, pode-se concluir, por meio de ensaios eletroforéticos e espectroscópicos na região do ultravioleta e do visível, que a proteína FixL de *Rhizobium etli* foi obtida na sua forma *holo* e inteira.

Através da técnica de dicroísmo circular e usando os softwares para estimar estruturas secundárias de proteínas, CDSSTR, Continll e SELCON 3 para FixL *deoxy*, estabeleceu-se que ela apresenta-se majoritariamente em α -hélices. Sendo em média 42 % α -hélices e 14 % β -folhas. Até então não há medidas estruturais para a proteína completa, sendo esse um resultado pioneiro. Não houve nenhuma diferença significativa entre as estruturas secundárias das formas *deoxy*, *met* e *cianomet*, indicando que este tipo de estrutura é mantida independente da proteína estar enzimaticamente ativa ou inativa.

Utilizando a técnica de dicroísmo circular foram construídas as curvas de estabilidade térmica para FixL em três formas: nativa (*met*), ligada a CN⁻ e na forma *deoxi*. Foram determinadas suas *T_m* – *melting temperature* (temperaturas médias de desnaturação), e estas ficaram entre 43,5 e 45,9 °C. Não houveram diferenças significativas entre as três formas indicando que diferenças conformacionais existentes entre elas não afeta consideravelmente sua estabilidade térmica. Comparativamente a outras hemoproteínas, a FixL mostrou-se consideravelmente menos estável, o que associa-se a flexibilidade que ela deve ter para as mudanças conformacionais associadas a sua função sensora.

A perda de atividade de auto-fosforilação quando a proteína com ferro do grupo na forma reduzida se liga a oxigênio molecular (O₂) está associada a mudanças que ocorrem na estrutura terciária da proteína. Os resultados dos espectros de dicroísmo circular na região do *near-UV* mostram diferenças marcantes entre 280 e 305 nm. Nessa faixa de comprimento de onda os sinais se devem principalmente aos triptofanos, portanto as alterações devem ocorrer principalmente no primeiro domínio PAS e no domínio receptor da proteína, onde se encontram esses aminoácidos. As mudanças que são observadas nos espectros CD no *near-UV* entre as formas *met* (Fe³⁺) e *cianomet* (Fe³⁺-CN⁻) são ainda mais pronunciadas. Essas são uma forma ativa e uma forma inativa, respectivamente; e esse resultado corrobora com a afirmação de que mudanças

na atividade catalítica da enzima são acompanhadas por mudanças em sua estrutura terciária.

Os resultados mostrados para região do visível do espectro de CD sugerem que ocorrem mudanças na conformação do grupo heme por ocasião deste estar ou não ligado a alguma molécula. Como já proposto por outros autores, a atividade enzimática da FixL correlaciona-se às interações que seu grupo prostético realiza com as cadeias de aminoácidos em sua proximidade.

Estudos de desnaturação química com uréia utilizando espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e do visível e dicroísmo circular com a proteína nas formas *met* e *cianomet*, mostraram que a FixL é pouco estável estruturalmente, se comparada a outras hemeproteínas, o que está em acordo com a baixa estabilidade térmica encontrada. Quanto a ligação do grupo heme à cadeia protéica a forma *cianomet* mostrou-se consideravelmente mais estável que a forma *met*, o que foi atribuído em maior parte às interações que o cianeto pode ter com um resíduo de histina distal, fazendo com que co-fator esteja mais fortemente preso. Quanto a estabilidade da proteína de uma forma global, observou-se que a forma ativa, *met*, é mais estável que a forma inativa, *cianomet*. Existe um modelo proposto na literatura para ativação/inativação da FixL em que a proteína muda de conformação passando de uma forma mais compacta, quando está ativa, para uma forma menos compacta, quando está inativa. A maior estabilidade estrutural da FixL na forma *met* pode ser explicada pelo fato da proteína estar em um arranjo que dificulta a interação com a uréia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J. A; TAYLOR, S. S. Divalent metal ions influence catalysis and active-site accessibility in the cAMP-dependent protein kinase. *Protein science : a publication of the Protein Society*, [S.l.], v. 2, n. 12, p. 2177–86, 1993.

AONO, S.; NAKAJIMA, H. Structure and function of CooA, a novel transcriptional regulator containing a b-type heme as a CO sensor. *Coordination Chemistry Reviews*, [S.l.], v. 190-192, p. 267–282, 1999.

AZZARITI, A. *et al.* Kinetic properties and thermal stabilities of mutant forms of mitochondrial aspartate aminotransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, [S.l.], v. 1386, p. 29–38, 1998.

BANERJEE, S. *et al.* Conformational and thermal stability of mature dimeric human myeloperoxidase and a recombinant monomeric form from CHO cells. *Biochimica et biophysica acta*, [S.l.], v. 1814, n. 2, p. 375–87, 2011.

BENÍTEZ-CARDOZA, C. G.; ROJO-DOMI, A.; HERNÁNDEZ-ARANA, A. Temperature-Induced Denaturation and Renaturation of Triosephosphate Isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence of Dimerization Coupled to Refolding of the Thermally Unfolded Protein. *Biochemistry*, [S.l.], v. 40, p. 9049–9058, 2001.

BINSHENG, Y. The Stability of a Three-State Unfolding Protein. *Thermodynamics - Physical Chemistry of Aqueous Systems*, [S.l.], p. 365–390, 2011.

BOWMAN, S. E. J.; BREN, K. L. The chemistry and biochemistry of heme c: functional bases for covalent attachment. *Natural product reports*, [S.l.], v. 25, n. 6, p. 1118–1130, 2008.

CARVALHO, J. W. *et al.* Thermal denaturation and aggregation of hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* in acid and neutral media. *Int J Biol Macromol*, [S.l.], v. 54, p. 109–118, 2013.

CHO, H. Y. *et al.* Structural insight into the Heme-based redox sensing by DosS from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, [S.l.], v. 284, n. 19, p. 13057–13067, 2009.

COWAN, J. A. Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. *BioMetals*, [S.l.], v. 15, n. 3, p. 225–235, 2002.

DIERKS, E. A; BURSTYN, J. N. Nitric oxide (NO), the only nitrogen monoxide redox form capable of activating soluble guanylyl cyclase. *Biochemical pharmacology*, [S.l.], v. 51, n. 12, p. 1593–600, 1996.

DOLPHIN, D. (Org.). *The Porphyrins*. New York: Academic Press, 1978.

DUNHAM, C. M. *et al.* A distal arginine in oxygen-sensing heme-PAS domains is essential to ligand binding, signal transduction, and structure. *Biochemistry*, [S.l.], v. 42, n. 25, p. 7701–7708, 2003.

FASMAN, G. D. (EDITOR). *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. New York: Plenum Press, 1996.

FEBS, S. Divalent Metal Ion Binding, [S.l.], n. 1987, p. 5436–5442, 1990.

FONSECA, B. M.; PAQUETE, C. M.; LOURO, R. O. Molecular mechanisms of heme based sensors from sediment organisms capable of extracellular electron transfer. *Journal of Inorganic Biochemistry*, [S.l.], v. 133, p. 104–109, 2014.

GILLES-GONZALEZ, M. A *et al.* Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, are a new class of heme protein with distinctive ligand binding and autoxidation. *Biochemistry*, [S.l.], v. 33, n. 26, p. 8067–73, 1994.

GILLES-GONZALEZ, M. A; GONZALEZ, G. Regulation of the kinase activity of heme protein FixL from the two-component system FixL/FixJ of *Rhizobium meliloti*. *The Journal of biological chemistry*, [S.l.], v. 268, n. 22, p. 16293–7, 1993.

GILLES-GONZALEZ, M.; GONZALEZ, G. Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. *Journal of Inorganic Biochemistry*, [S.l.], v. 99, n. 1, p. 1–22, 2005.

GONG, W. *et al.* Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [S.l.], v. 95, n. 26, p. 15177–15182, 1998.

GONZALEZ, G. A Surfeit of Biological Heme-based Sensors. *THE SMALLEST BIOMOLECULES: Diatomics and their Interactions with Heme Proteins*, [S.l.], p. 18–65, 2008.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nature Protoc.*, [S.l.], v. 1, n. 6, p. 2527–2535, 2006.

GUALLAR, V.; OLSEN, B. The role of the heme propionates in heme biochemistry. *Journal of Inorganic Biochemistry*, [S.l.], v. 100, p. 755–760, 2006.

HAO, B. *et al.* Structure-Based Mechanism of O₂ Sensing and Ligand Discrimination by the FixL Heme Domain of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochemistry*, [S.l.], v. 41, p. 12952–12958, 2002.

HENNESSEY, J. P. J.; JOHNSON, W. C. J. Information Content in the Circular Dichroism of Proteins. *Biochemistry*, [S.l.], v. 20, n. 5, p. 1085–1094, 1981.

HENRY, J.T. AND CROSSON, S. Ligand binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annu Rev Microbiol*, [S.l.], v. 65, p. 261–286, 2011.

- HIERRO, A. *et al.* Electrostatic Interactions at the C-Terminal Domain of Nucleoplasmin Modulate Its Chromatin Decondensation Activity. *Biochemistry*, [S.l.], v. 41, p. 6408–6413, 2002.
- HORECKER, B. *et al.* (Org.). *The Molecular Biology of the Bacilli*. New York: Academic Press, 1982.
- HSU, M.; WOODY, R. W. The Origin of the Heme Cotton Effects in Myoglobin und Hemoglobin. *Journal of the American Chemical Society*, [S.l.], v. 93, n. 14, p. 3515–3525, 1971.
- KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, [S.l.], v. 1751, n. 2, p. 119–139, 2005.
- KELLY, S.; PRICE, N. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Current Protein & Peptide Science*, [S.l.], v. 1, n. 4, p. 349–384, 2000.
- KEY, J.; MOFFAT, K. Crystal Structures of Deoxy and CO-Bound bj FixLH Reveal Details of Ligand. *Biochemistry*, [S.l.], v. 44, p. 4627–4635, 2005.
- LANDFRIED, D. A. *et al.* Structural and thermodynamic consequences of b heme binding for monomeric apoglobins and other apoproteins. *Gene*, [S.l.], v. 398, p. 12–28, 2007.
- LATYPOV, R. F. *et al.* Structural Characterization of an Equilibrium Unfolding Intermediate in Cytochrome c. *Journal of molecular biology*, [S.l.], v. 357, p. 1009–1025, 2006.
- LEE, A. J. *et al.* Guanidine Hydrochloride-Induced Unfolding of the Three Heme Coordination States of the CO-Sensing Transcription Factor, CooA. *Biochemistry*, [S.l.], v. 48, n. 28, p. 6585–6597, 2009.
- LU, Z. *et al.* Truncation of the unique N-terminal domain improved the thermostability and specific activity of alkaline α -amylase. *Nature Scientific Reports*, [S.l.], p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep22465>>.
- MIYATAKE, H. *et al.* Iron Coordination Structures of Oxygen Sensor FixL Characterized by Fe K-edge Extended X-ray Absorption Fine Structure and Resonance Raman Spectroscopy. *The Journal of Biological Chemistry*, [S.l.], v. 274, n. 33, p. 23176–23184, 1999.
- MIYATAKE, H. *et al.* Sensory mechanism of oxygen sensor FixL from *Rhizobium meliloti*: crystallographic, mutagenesis and resonance raman spectroscopic studies. *Journal of Molecular Biology*, [S.l.], v. 301, n. 2, p. 415–431, 2000.
- MONSON, E. K. *et al.* The FixL protein of *Rhizobium meliloti* can be separated into a heme-binding oxygen-sensing domain and a functional C-terminal kinase domain. *Biochemistry*, [S.l.], v. 89, p. 4280–4284, 1992.

MOREIRA, L. M. *et al.* Hemoglobina Extracelular Gigante de *Glossoscolex paulistus*: um extraordinário sistema supramolecular hemoproteico. *Quimica Nova*, [S.l.], v. 34, n. 1, p. 119–130, 2011.

MORJANA, N. A.; MCKEONE, B. J.; GILBERT, H. F. Guanidine hydrochloride stabilization of a partially unfolded intermediate during the reversible denaturation of protein disulfide isomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [S.l.], v. 90, n. 6, p. 2107–11, 1993.

MYERS, J. K.; PACE, C. N.; SCHOLTZ, J. M. Denaturant m values and heat capacity changes : Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein science*, [S.l.], v. 4, p. 2138–2148, 1995.

NAGAI, M. *et al.* Involvement of Propionate Side Chains of the Heme in Circular Dichroism of Myoglobin: Experimental and Theoretical Analyses. *The journal of physical Biochemistry*, [S.l.], v. 119, p. 1275–1287, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *LEHNINGER Principles of Biochemistry*. Fourth ed.[S.l.]: W. H. Freeman, 2004.

OSWALD, VICTORIA F.; CHEN, WEITING ; HARVILLA, PAUL B.; MAGYAR, J. S. Overexpression, purification, and enthalpy of unfolding of ferricytochrome c552 from a psychrophilic microorganism. *Journal Inorganic Biochemistry*, [S.l.], v. 18, n. 9, p. 1199–1216, 2013.

OWENS, J. W.; CONNOR, C. J. O. Characterization of some Low Spin Complexes of Ferric Hemeoctapeptide From Cytochrome c. *Inorganica Chimica Acta*, [S.l.], v. 151, p. 107–116, 1988.

PAIN, R. Determining the CD spectrum of a protein. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]*, [S.l.], v. Chapter 7, n. Cd, p. Unit 7.6, 2005.

PARK, H. *et al.* Insights into Signal Transduction Involving PAS Domain Oxygen-Sensing Heme Proteins from the X-ray Crystal Structure of Escherichia Coli Dos Heme Domain (Ec DosH). *Biochemistry*, [S.l.], v. 43, n. 10, p. 2738–2746, 2004.

POKKULURI, P. R. *et al.* Structures and Solution Properties of Two Novel Periplasmic Sensor Domains with c-Type Heme from Chemotaxis Proteins of *Geobacter sulfurreducens* : Implications for Signal Transduction, *Journal of Molecular Biology*, [S.l.], v. 377, p. 1498–1517, 2008.

POWL, A. M.; MILES, A. J.; WALLACE, B. A. Transmembrane and extramembrane contributions to membrane protein thermal stability : Studies with the NaChBac sodium channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, [S.l.], v. 1818, n. 3, p. 889–895, 2012.

PUETT, D. The Equilibrium Unfolding Parameters of Horse and Sperm Whale Myoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, [S.l.], v. 248, n. 13, p. 4623–4634, 1973.

- QI, X. L. *et al.* Thermal denaturation of fl-lactoglobulin: effect of protein concentration at pH 6.75 and 8.05. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, [S.l.], v. 1248, p. 43–49, 1995.
- RAFFERTY, S. P.; DAYER, G. Heme proteins of *Giardia intestinalis*. *Experimental Parasitology*, [S.l.], v. 159, p. 13–23, 2015.
- REYNOLDS, M. F. *et al.* Role of conserved F a -helix residues in the native fold and stability of the kinase-inhibited oxy state of the oxygen-sensing FixL protein from *Sinorhizobium meliloti*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, [S.l.], v. 485, n. 2, p. 150–159, 2009.
- ROBERTS, D. M. *et al.* Two Sensor Kinases Contribute to the Hypoxic Response of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, [S.l.], v. 279, n. 22, p. 23082–23087, 2004.
- ROSENBERG, I. M. *Protein Analysis and Purification*. Second ed. Boston: [s.n.], 1996.
- ROSKOSKI, R. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*, [S.l.], v. 100, p. 1–23, 2015.
- RUMFELDT, J. A. O. *et al.* Conformational stability and folding mechanisms of dimeric proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, [S.l.], v. 98, n. 1, p. 61–84, 2008.
- SAINI, D. K. *et al.* DevR – DevS is a bona fide two-component system of *Mycobacterium tuberculosis* that is hypoxia-responsive in the absence of the DNA-binding domain of DevR. *Microbiology*, [S.l.], v. 150, p. 865–875, 2004.
- SAINI, D. K.; MALHOTRA, V.; TYAGI, J. S. Cross talk between DevS sensor kinase homologue , Rv2027c , and DevR response regulator of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Letters*, [S.l.], v. 565, p. 75–80, 2004.
- SCHARNAGL, C.; REIF, M.; FRIEDRICH, J. Stability of proteins : Temperature , pressure and the role of the solvent. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, [S.l.], v. 1749, p. 187–213, 2005.
- SIERON, A. L. *et al.* Deletion of a Large Domain in Recombinant Human Procollagen II Does Not Alter the Thermal Stability of the Triple Helix *. *The Journal of Biological Chemistry*, [S.l.], v. 268, n. 28, p. 21232–21237, 1993.
- SILVA, M. A *et al.* Protein folding modulates the swapped dimerization mechanism of methyl-accepting chemotaxis heme sensors. *PLoS one*, [S.l.], v. 7, n. 9, p. e46328, 2012.
- SOUSA, E. H. S. *et al.* DosT and DevS are oxygen-switched kinases in *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein science : a publication of the Protein Society*, [S.l.], v. 16, n. 8, p. 1708–1719, 2007.

SOUSA, E. H. S. *et al.* Signal transduction and phosphoryl transfer by a FixL hybrid kinase with low oxygen affinity: Importance of the vicinal PAS domain and receiver aspartate. *Biochemistry*, [S.l.], v. 52, n. 3, p. 456–465, 2013.

SPIZIZEN, J. Transformation of Biochemically Deficient Strains of *Bacillus subtilis* by Deoxyribonucleate. *Proc. N. A. S.*, [S.l.], v. 44, p. 1072–1078, 1968.

SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S. Y.; WOODY, R. W. Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein science : a publication of the Protein Society*, [S.l.], v. 8, n. 2, p. 370–380, 1999.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical biochemistry*, [S.l.], v. 287, n. 2, p. 252–260, 2000.

STOCK, A. M.; ROBINSON, V. L.; GOUDREAU, P. N. Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, [S.l.], v. 69, p. 183–215, 2000.

TEDESCO, D.; BERTUCCI, C. Induced circular dichroism as a tool to investigate the binding of drugs to carrier proteins: Classic approaches and new trends. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, [S.l.], v. 113, p. 34–42, 2015.

THORSTEINSSON, M. V *et al.* Characterization of Variants Altered at the N-terminal Proline , a Novel Heme-Axial Ligand in *CooA* , the CO-sensing Transcriptional Activator *. *The Journal of biological chemistry*, [S.l.], v. 275, n. 50, p. 39332–39338, 2000.

TUCKERMAN, J. R. *et al.* Ligand and Oxidation-State Specific Regulation of the Heme-Based Oxygen Sensor FixL from *Sinorhizobium meliloti*. *Biochemical pharmacology*, [S.l.], v. 41, p. 6170–6177, 2002.

TUCKERMAN, J. R.; GONZALEZ, G.; GILLES-GONZALEZ, M.-A. Complexation precedes phosphorylation for two-component regulatory system FixL/FixJ of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Molecular Biology*, [S.l.], v. 308, n. 3, p. 449–455, 2001.

VAN STOKKUM, I. H. *et al.* Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Analytical biochemistry*, [S.l.], v. 191, n. 1, p. 110–118, 1990.

WINKLER, W. C. *et al.* Nonsteric factors dominate binding of nitric oxide, azide, imidazole, cyanide, and fluoride to the rhizobial heme-based oxygen sensor FixL. *Chemistry & biology*, [S.l.], v. 3, n. 10, p. 841–50, 1996.

YANO, S. *et al.* Ultraviolet resonance Raman observations of the structural dynamics of rhizobial oxygen sensor FixL on ligand recognition. *The journal of physical Biochemistry*, [S.l.], v. 117, n. 49, p. 15786–91, 2013.

