



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

GIAMWEMBERG DE ALMEIDA BARRETO

Influência de ligantes, força iônica e pH sobre o potencial redox da proteína DevS do
Mycobacterium tuberculosis

FORTALEZA

2018

GIAMWEMBERG DE ALMEIDA BARRETO

Influência de ligantes, força iônica e pH sobre o potencial redox da proteína DevS do
Mycobacterium tuberculosis

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.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Izaura Cirino Nogueira Diógenes.

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

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B262i Barreto, Giamwemberg de Almeida.
Influência de ligantes, força iônica e pH sobre o potencial redox da proteína recombinante DevS do *Mycobacterium tuberculosis* / Giamwemberg de Almeida Barreto. – 2018.
68 f. : il. color.

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

Orientação: Profa. Dra. Izaura Cirino Nogueira Diógenes.

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

1. Hemeproteínas sensoras. 2. Latência. 3. Proteína DevS. 4. Tuberculose. I. Título.

CDD 540

GIAMWEMBERG DE ALMEIDA BARRETO

Influência de ligantes, força iônica e pH sobre o potencial redox da proteína DevS do
Mycobacterium tuberculosis

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.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Izaura Cirino Nogueira Diógenes.

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

Aprovado em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Izaura Cirino Nogueira de Diógenes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^º. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^º. Dr. Bruno Anderson da Matias da Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^º. Dr. Pedro de Lima Neto
Universidade Federal do Ceará (UFC)

FORTALEZA

2018

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelos dias abençoados que me proporcionastes.

A meus pais, Aldenor e Sandra, pelo amor, esforço, incentivo, dedicação e educação que me deram, tornando assim possível a realização de um sonho.

À professora Izaura Diógenes, por aceitar ser minha orientadora, contribuindo bastante em minha formação acadêmica, profissional e pelo grande incentivo que me deste neste período de minha vida.

Ao Professor Eduardo Henrique, pelos conhecimentos transmitidos, por estar sempre disposto a tentar solucionar qualquer dúvida e pela inspiração transmitida por ser alguém tão engajado na pesquisa e na docência.

Aos demais companheiros da “Bioquímica da Bioinorgânica”: Josiane, Wellinsson, Nathalie, Ana Claudia, Mikael e Marta, pela colaboração em muitas etapas do trabalho, além do aluno Dieric, por me auxiliar em momentos de grandes dificuldades e aos grandes colegas de laboratório que me ajudaram de forma direta ou indireta para a realização deste sonho.

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.

À minha família e aos grandes amigos que tive o privilégio de conhecer ao longo da vida e que hoje fazem parte de meu cotidiano.

Muito obrigado a todos vocês!

“É loucura odiar todas as rosas porque uma te espetou. Entregar todos os teus sonhos porque um deles não se realizou, perder a fé em todas as orações porque em uma não foi atendido, desistir de todos os esforços porque um deles fracassou. É loucura condenar todas as amizades porque uma te traiu, descrer de todo amor porque um deles te foi infiel. É loucura jogar fora todas as chances de ser feliz porque uma tentativa não deu certo. Espero que na tua caminhada não cometas estas loucuras. Lembrando que sempre há uma outra chance, uma outra amizade, um outro amor, uma nova força. Para todo fim um recomeço!”
(Zirtaeb Onamaac)

RESUMO

Hemeproteínas sensoras são uma classe de proteínas que vem despertando grande interesse da comunidade científica, estando envolvidas em diversos importantes processos. O microorganismo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) é o agente patógeno responsável por causar a doença conhecida como tuberculose, atualmente presente em um terço da população mundial na forma latente. Esta bactéria apresenta algumas hemeproteínas sensoras, dentre as quais a proteína DevS que, juntamente com seu regulador de resposta (DevR), são responsáveis pela entrada desta bactéria em estado persistente de não replicação dentro do hospedeiro, conhecido como estado de latência, difícil de ser eliminada. Atualmente, existe um conflito na literatura com respeito à função fisiológica da hemeproteína DevS, sendo sugerido por certos grupos ser um sensor de oxigênio enquanto outros acreditam ser um sensor redox. Este trabalho tem como objetivo determinar o papel sensorial da proteína DevS por espectroeletrólise associando as técnicas de eletrólise a potencial controlado com espectroscopia de absorção eletrônica permitindo a determinação do potencial de ponto médio, E_m . Esse estudo foi realizado em diferentes condições: na ausência e presença de ligantes (íon cianeto, imidazol, monóxido de carbono e óxido nítrico); em diferentes concentrações salinas: 100, 200 e 500 mmol L⁻¹ NaCl; e em soluções de diferentes valores de pH (6 a 10). Os espectros, obtidos na presença de diferentes mediadores redox, permitiram o cálculo dos seguintes valores de E_m : +11, +96, +392, -147 e -327 mV vs Eletrodo Padrão de Hidrogênio para a proteína DevS na ausência de ligantes e ligada a CO, NO, imidazol e CN⁻, respectivamente. Adicionalmente, pôde-se estimar a faixa de potencial referente à proteína ligada a O₂, entre +10 e +195 mV. Utilizando-se titulação química, foi medida a constante de dissociação (K_d) da proteína ligada a imidazol; $K_d = 112 \times 10^{-3}$ e 300×10^{-6} para as formas reduzida e oxidada, respectivamente. Nossos resultados indicaram que o potencial redox da proteína DevS torna-se mais positivo com o aumento da força dos ligante, tal como previsto pela Teoria de Campo Ligante. Adicionalmente, o valor de E_m determinado para a proteína DevS não ligada é significativamente mais elevado que aqueles estimados para o citosol do *Mycobacterium tuberculosis* sendo consistente, portanto, com a função sensora de oxigênio e descartando, termodinamicamente, a possibilidade de atuar como sensor redox.

Palavras-chave: Hemeproteínas sensoras. Latência. Proteína DevS. Tuberculose.

ABSTRACT

Heme-based sensors are a family of proteins that has caught great interest of the scientific community due to their role in several important biological processes. *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) is the pathogen responsible for causing tuberculosis, currently found in one quarter of the world population in its latent form. This bacterium presents some heme-based sensor proteins including the protein DevS which, together with its response regulator (DevR), are responsible for the entrance of this bacterium into a persistent state of non-replication, known as latency, which is difficult to eliminate. Currently, there is a conflict in the literature regarding the physiological function of the heme protein DevS, being suggested by certain groups to work as an oxygen sensor while others indicated as a redox sensor. Here, we present the results of heterologous expression and purification of *Mycobacterium tuberculosis* DevS protein along with the measurements of the redox potential, E_m , at different conditions, such as absence and presence of ligands (CN^- , imidazole, CO and NO), different salt concentrations (100, 200 and 500 mmol L^{-1} NaCl), and pH (6 to 10). The calculated redox potentials were of +11, +96, +392, -147 and -327 mV vs Standard Hydrogen Electrode (SHE) for DevS in the absence of ligands, and bound to CO, NO, imidazole and CN^- , respectively. In addition to that, it was estimated the range of redox potential for DevS bound to O_2 , from +10 to +195 mV. Nonetheless, dissociation constants (K_d) for the imidazole bound to DevS were also calculated by chemical titration, where $K_d = 112 \times 10^{-3}$ and 300×10^{-6} were found for the reduced and oxidized forms of the protein, respectively. Our results indicated that the redox potential of DevS redox potentials are increasingly positive as the ligand strength is intensified, as predicted by the Ligand Field Theory. Furthermore, the redox potential for unbound DevS was shown to be significantly higher than those estimated for *Mycobacterium tuberculosis* cytosol being consistent, therefore, with the assignment of oxygen sensor function and discarding, thermodynamically, the role as a redox sensor.

Keywords: Heme-based sensors proteins. Latency. DevS protein. Tuberculosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmulas estruturais dos diferentes tipos de grupos heme.....	15
Figura 2 – Esquema genérico do sistema sensorial de dois componentes.....	18
Figura 3 – Representação esquemática do efeito do oxigênio no sistema DevS-DevR contido no <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	19
Figura 4 – Sequência primária da proteína DevS.....	20
Figura 5 – Representação esquemática dos domínios da proteína DevS.....	20
Figura 6 – Materiais que compõem a célula espectroeletroquímica.....	33
Figura 7 – Perfil de purificação da proteína DevS.....	36
Figura 8 – Espectros da proteína DevS obtidos na titulação espectroeletroquímica nos sentidos redutivo e oxidativo de uma solução tampão tris 35 mmol L ⁻¹ / NaCl 100 mmol L ⁻¹ (pH 8) contendo proteína DevS 30 μmol L ⁻¹ e os mediadores C a (25 μmol L ⁻¹). <i>Inset</i> : perfil da absorvância (em 406 nm) <i>versus</i> potencial aplicado para a proteína durante as titulações redutiva e oxidativa.....	39
Figura 9 – Espectros da proteína DevS obtidos na titulação espectroeletroquímica nos sentidos redutivo e oxidativo de uma solução tampão tris 35 mmol L ⁻¹ / NaCl 100 mmol L ⁻¹ (pH 8) contendo proteína DevS 30 μmol L ⁻¹ , imidazol 150 mmol L ⁻¹ e os mediadores C a G (25 μmol L ⁻¹). <i>Inset</i> : perfil da absorvância (em 413 nm) <i>versus</i> potencial aplicado para a proteína durante as titulações redutiva e oxidativa.....	41

- Figura 10 – Espectros da proteína DevS obtidos na titulação espectroeletroquímica nos sentidos redutivo e oxidativo de uma solução tampão tris 35 mmol L⁻¹ / NaCl 100 mmol L⁻¹ (pH 9,5) contendo proteína DevS 30 μmol L⁻¹, KCN 4 mmol L⁻¹ e os mediadores A a D (25 μmol L⁻¹). *Inset*: perfil da absorvância (em 419 nm) *versus* potencial aplicado para a proteína durante as titulações redutiva e oxidativa..... 43
- Figura 11 – Espectros da proteína DevS obtidos na titulação espectroeletroquímica nos sentidos redutivo e oxidativo de uma solução tampão tris 35 mmol L⁻¹ / NaCl 100 mmol L⁻¹ (pH 8) contendo proteína DevS 30 μmol L⁻¹ em solução saturada de CO (0,93 mmol L⁻¹) e os mediadores D a G (25 μmol L⁻¹). *Inset*: perfil da absorvância (em 421 nm) *versus* potencial aplicado para a proteína durante as titulações redutiva e oxidativa..... 44
- Figura 12 – Espectros da proteína DevS obtidos na titulação espectroeletroquímica nos sentidos redutivo e oxidativo de uma solução tampão tris 35 mmol L⁻¹ / NaCl 100 mmol L⁻¹ (pH 8) contendo proteína DevS 25 μmol L⁻¹, em solução aquosa de DEANONOate (500 μmol L⁻¹) e os mediadores D a G (20 μmol L⁻¹). *Inset*: perfil da absorvância (em 418 nm) *versus* potencial aplicado para a proteína durante as titulações redutiva e oxidativa..... 46
- Figura 13 – Mudança na posição do glutamato nas formas ativa e inativa da proteína DevS. A) Sobreposição da forma Fe³⁺ (cinza) sobre a forma Fe²⁺ (azul); B) Sobreposição da forma Fe²⁺ - CO (amarela) sobre a forma Fe²⁺ (azul) e C) Sobreposição da forma Fe²⁺ - NO (rosa) sobre a forma Fe²⁺ (azul)..... 47
- Figura 14 – A) Espectros da proteína DevS obtidos na titulação espectroeletroquímica nos sentidos redutivo e oxidativo de uma solução tampão tris 35 mmol L⁻¹ / NaCl 200 mmol L⁻¹ (pH 8) contendo proteína

DevS $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ e os mediadores C a G ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$). *Inset*: perfil da absorvância (em 406 nm) *versus* potencial aplicado para a proteína durante as titulações redutiva e oxidativa. B) Espectros eletrônico na região do UV-Vis da proteína DevS totalmente oxidada (vermelho) e totalmente reduzida (preto)..... 49

Figura 15 – A) Espectros da proteína DevS obtidos na titulação espectroeletróquímica nos sentidos redutivo e oxidativo de uma solução tampão tris 35 mmol L^{-1} / NaCl 500 mmol L^{-1} (pH 8) contendo proteína DevS $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ e os mediadores C a G ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$). *Inset*: perfil da absorvância (em 406 nm) *versus* potencial aplicado para a proteína durante as titulações redutiva e oxidativa. B) Espectros eletrônico na região do UV-Vis da proteína DevS totalmente oxidada e reduzida 50

Figura 16 – Gráfico do potencial de meia onda da proteína DevS *versus* força iônica do meio..... 51

Figura 17 – Espectros da proteína DevS obtidos na titulação espectroeletróquímica nos sentidos redutivo e oxidativo de uma solução tampão tris 35 mmol L^{-1} / NaCl 100 mmol L^{-1} contendo proteína DevS $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ e os mediadores C a G ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) em pH: A) 6; B) 7; C) 9 e D) 10. *Inset*: perfil da absorvância (em 406 nm) *versus* potencial aplicado para a proteína durante as titulações redutiva e oxidativa..... 53

Figura 18 – Perfil do potencial de meia onda da proteína DevS *versus* pH do meio... 55

Figura 19 – Espectros da proteína DevS obtidos nas titulações química da proteína DevS na presença de imidazol em suas formas: A) reduzida e B) oxidada. *Inset*: Curvas de titulações de absorvância em 431 nm (A) e 408 nm (B) *vs* concentração de imidazol utilizada..... 56

Figura 20 – Espectros da proteína DevS na ausência de ligantes (vermelho) e presença dos mediadores: E (10 mV) por 20 min (azul claro), F (195 mV) por 20 min (preto) e durante 1 h (rosa). *Inset*: amplificação dos espectros mencionados..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do tampão de lise.....	26
Tabela 2 – Composição dos géis utilizados na eletroforese (SDS-PAGE).....	29
Tabela 3 – Composição do tampão de amostra.....	30
Tabela 4 – Valores de potenciais de meia-onda (E_m) dos mediadores redox utilizados nos experimentos eletroquímicos.....	34
Tabela 5 – Relação das bandas <i>Soret</i> obtidas para a proteína DevS em suas diferentes formas e atividade quinase correspondente.....	38
Tabela 6 – Potenciais do ponto médio (E_m) calculados para a proteína DevS na presença de diferentes ligantes.....	48
Tabela 7 – Potenciais do ponto médio para algumas hemeproteínas.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	adenosina 5'-trifosfato
<i>BjFixL</i>	proteína FixL do organismo <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
CooA	domínio CO <i>oxidation activator</i>
C-terminal	porção carboxi terminal
DEAE	resina cromatográfica aniônica dietilaminoetil
DEANONOate	<i>diethylammonium (Z)-1-(N,N-diethylamino)diazenium-1,2-diolate</i>
<i>devS</i>	gene que codifica a proteína DevS
DevS	<i>differentially expressed in virulent strain sensor protein</i>
DevR	<i>differentially expressed in virulent strain response regulator protein</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
DosR	<i>dormancy survival response regulator, same protein as DevR</i>
DosT	<i>dormancy survival response sensor T</i>
<i>E. coli</i>	bactéria <i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EPH	eletrodo padrão de hidrogênio
E_m	potencial de ponto médio
E_{ox}	potencial de oxidação
E_{red}	potencial de redução
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GAF	domínio <i>cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases e Fh1A</i>
HATPase	subdomínio de ligação ao ATP
HisKA	domínio histidina quinase
HNOB	domínio Heme-NO- <i>Binding</i>
Imz	imidazol
Kd	constante de dissociação
LBD	domínio de associação ao ligante (<i>ligand binding domain</i>)
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
N-terminal	porção amino terminal
OD	densidade óptica
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAS	domínio <i>Period, Arnt, e Sim</i>

PMSF	<i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
ReFixL	proteína FixL do organismo <i>Rhizobium etli</i>
RR	regulador de resposta
Rz	razão de pureza
SCHIC	<i>Sensor-Containing Haem Instead of Cobalamin</i>
SDS	dodecilsulfato de sódio
sGC	guanilato ciclase solúvel (<i>soluble guanylate cyclase</i>)
TEMED	tetrametiletilenodiamina
Tris	hidroximetil-aminometano
UV-Vis	ultravioleta – visível

Abreviatura dos aminoácidos

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutâmico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina

SUMÁRIO

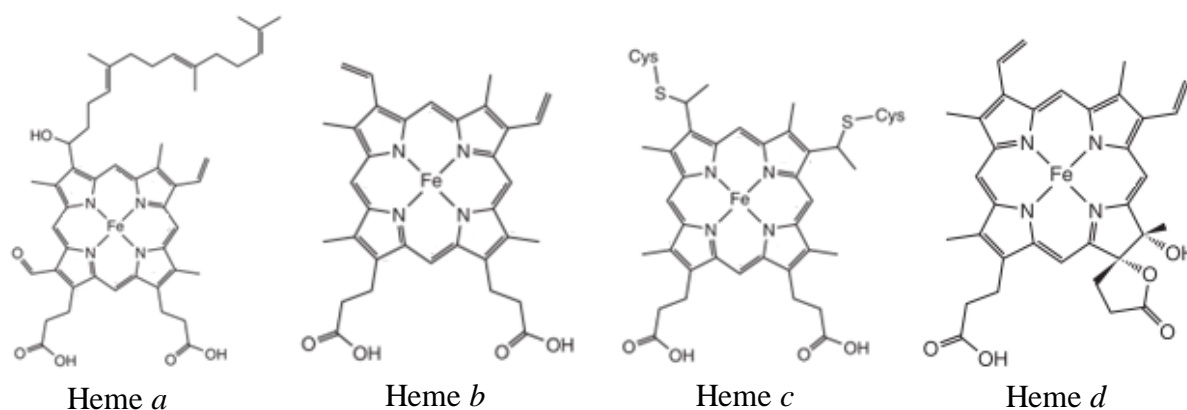
1	INTRODUÇÃO.....	15
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	23
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	25
3.1	Expressão da Proteína DevS.....	25
3.2	Purificação.....	25
3.2.1	<i>Partição das células</i>	<i>25</i>
3.2.2	<i>Precipitação da Fração Proteica</i>	<i>26</i>
3.2.3	<i>Coluna de Interação Hidrofóbica (Fenil-SepharoseTM).....</i>	<i>27</i>
3.2.4	<i>Coluna de Troca Aniônica (DEAE).....</i>	<i>27</i>
3.2.5	<i>Eletroforese</i>	<i>28</i>
3.2.6	<i>Espectroeletróquímica.....</i>	<i>30</i>
3.2.7	<i>Afinidade da proteína DevS ao Imidazol.</i>	<i>34</i>
3.2.8	<i>Potencial estimado da proteína DevS ligada a oxigênio molecular.....</i>	<i>35</i>
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1	Expressão e Purificação da Proteína DevS do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>....	36
4.2	Espectroeletróquímica.....	38
4.2.1	<i>Influência dos Ligantes</i>	<i>38</i>
4.2.2	<i>Efeito da Força Iônica</i>	<i>48</i>
4.2.3	<i>Efeito do pH</i>	<i>52</i>
4.3	Afinidade da proteína DevS a Imidazol.....	55
4.4	DevS na Presença de Oxigênio	57
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* que existe há milênios como patógeno em humanos. Ela atinge principalmente os pulmões, mas pode afetar outros locais extrapulmonares. Acredita-se que 1,7 bilhão de pessoas no mundo estão infectadas com esta bactéria e cerca de 5 a 15% desenvolverão a doença em algum momento de suas vidas, enquanto outros portarão o bacilo em sua forma dormente ou latente. A tuberculose está entre as 10 maiores causas de morte em todo o mundo, vitimando, por exemplo em 2016, cerca de 1,3 milhões de pessoas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). A característica deste micro-organismo de entrar no estado de latência (dormência) impossibilita a perspectiva de erradicação da doença, bem como a redução no tempo de tratamento da tuberculose; atualmente de, no mínimo, 6 meses. Constatou-se que algumas proteínas são as principais reguladoras do processo de latência que ocorre na bactéria, tais como DevS e DevR (DASGUPTA et al., 2000).

As proteínas que apresentam, além da cadeia polipeptídica como sua estrutura, um grupo prostético heme, são chamadas de heme proteínas. Diversos tipos de grupos heme podem ser encontrados nessas proteínas, sendo denominados, por exemplo, como heme *a*, *b*, *c*, *d*, tal como ilustrado na Figura 1. Estas estruturas apresentam em comum um anel tetrapirrólico, mas diferem pelos substituintes periféricos (BOWMAN; BREN, 2008).

Figura 1 – Fórmulas estruturais dos diferentes tipos de grupos heme.



Fonte: Adaptado de BERTINI *et al.*, 2006.

O íon de ferro nessas proteínas encontra-se penta ou hexacoordenado, sendo que quatro dessas ligações provêm dos nitrogênios do anel porfirínico, como ilustrado na Figura 1. A quinta ligação é fornecida, geralmente, por resíduos histidina, cisteína ou metionina da

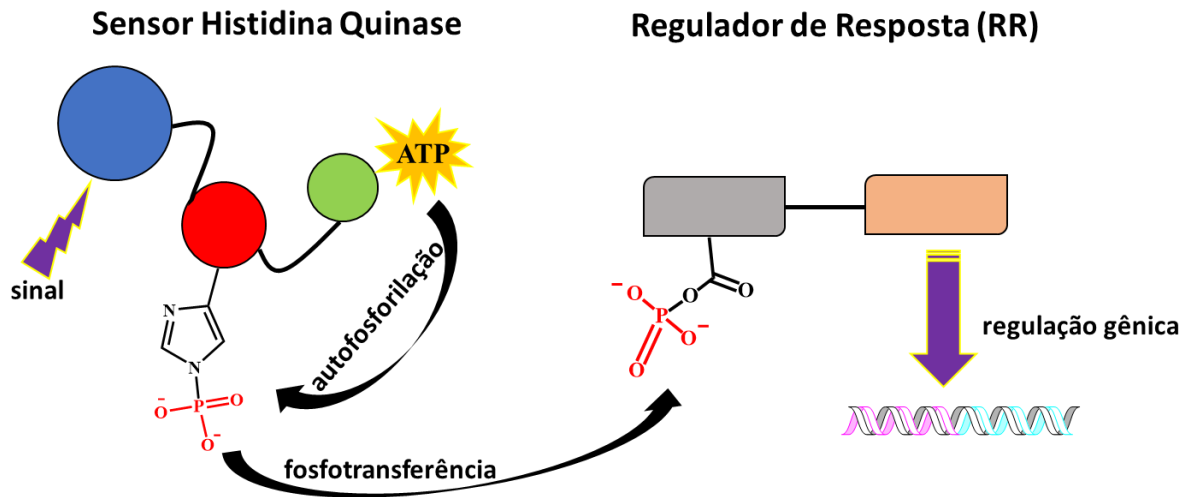
própria cadeia proteica que está localizada na região proximal ao grupo heme; enquanto o sexto ligante, surge na posição distal (ou axial), normalmente H₂O, O₂, CO, NO ou CN⁻. Há alguns casos em que o ferro se mostra hexacoordenado empregando nessa sexta coordenação, resíduos da própria cadeia proteica, como por exemplo no caso do citocromo c. A coordenação de um resíduo proximal empregando a histidina, por exemplo, é típica das hemoglobinas, mioglobinas e citocromos b (protoporfirina IX). As hemoproteínas são bastante importantes, pois são responsáveis por desempenhar diversas funções biológicas essenciais para a vida, tais como: transporte e armazenamento de gás (hemoglobina e mioglobina), catálise (citocromo P450), transferência eletrônica (citocromo c), sensor biológico (FixL e guanilato ciclase solúvel) (SHIMIZU et al., 2015), dentre outras.

Uma hemoproteína sensora é, geralmente, composta por domínios, apresentando um deles contendo o grupo heme que controla uma outra região transmissora contida na mesma proteína (domínio resposta), por exemplo, domínio quinase (GONZALEZ, GONZALO.; GILLES-GONZALEZ, 2005). Proteínas quinases catalisam a transferência de um grupo fosforil a partir da adenosina trifosfato (ATP) para determinados resíduos de outras proteínas, geralmente serina, tirosina e treonina (LIU et al., 2014). Dentre as quinases, tem-se, ainda, as histidinas quinases cuja fosforilação ocorre no resíduo histidina. Essas proteínas quinases mediam a maior parte da transdução de sinal em células eucarióticas através da modificação da atividade do seu substrato. Essa atividade permite controlar vários processos celulares, incluindo transcrição, metabolismo, movimento celular, apoptose celular e outros (MANNING et al., 2002; ZHANG; LIU; XIA, 2013). De maneira similar, as histidinas quinases atuam em micro-organismos auxiliando sua percepção e adaptação às mudanças ambientais. Alterações nas atividades das quinases têm sido associadas a diversas doenças, tais como câncer, distúrbios metabólicos e inflamações (PROCTOR et al., 2014). Nas bactérias, por sua vez, as histidinas quinases podem ser usadas como alvos biológicos no desenvolvimento de antibióticos. Estas proteínas, em conjunto com (di)guanilato ciclases, são as principais reguladoras de respostas adaptativas à ligação de moléculas diatômicas, tais como O₂, CO e NO, que são consideradas importantes mensageiros fisiológicos (SHIMIZU et al., 2015) gerando respostas como exemplificado a seguir. A proteína FixL da bactéria *Rhizobium meliloti*, participa da expressão de genes responsáveis pela fixação de nitrogênio e respiração microaeróbica, processo controlado pelos níveis de oxigênio (GILLES-GONZALEZ; GONZALEZ, 1993). A proteína guanilato ciclase solúvel controla a relaxação do músculo liso e agregação plaquetária (DIERKS, E.A.; BURSTYN, 1996) em resposta à interação com monóxido de nitrogênio

produzido biologicamente. Estudos sugerem que a proteína SenX3, encontrada no *Mycobacterium tuberculosis*, induz a expressão de genes envolvidos na regulação da replicação dessas bactérias (virulência) e metabolismo em resposta aos níveis de oxigênio, podendo garantir a sobrevivência das mesmas numa saída do estado dormente (SINGH; KUMAR, 2015).

Em relação aos sensores hemeprotéicos, se conhece atualmente pelo menos sete grandes famílias que foram organizadas de acordo com as estruturas dos domínios hémicos: PAS, CooA, HNOB, Globina, GAF, LBD e SCHIC (SHIMIZU et al., 2015; SOUSA et al., 2012, 2017). Alguns desses sensores, como a FixL, podem fazer parte de um sistema de dois componentes que é formado por uma hemeproteína sensora histidina quinase e um regulador de resposta. Nesse tipo de sistema, primeiramente, o sensor quinase interage com um ligante sinalizador, que no caso de hemeproteínas sensoras pode ser O₂, NO ou CO, sendo desencadeada uma mudança conformacional que resulta na ativação ou inativação do domínio enzimático histidina quinase. A reação de autofosforilação, que usa ATP como fosfo-doador a um resíduo histidina no sensor histidina quinase, é regulada pelo domínio heme sob interação com a molécula gasosa sinalizadora, por exemplo O₂. Em seguida, a autofosforilação ocorre uma reação de transferência do grupo fosforil do resíduo histidina do sensor histidina quinase (autofosforilado) para um resíduo aspartato do regulador de resposta (RR). Este regulador, quando é fosforilado, age como um fator de transcrição gênica (Figura 2). Desta forma, a fosforilação do domínio regulador de resposta ativa as funções de regulação da transcrição gênica através de sua interação com o DNA. Os reguladores de respostas são considerados "interruptores" biológicos e apresentam um papel de "liga-desliga" neste sistema, dependendo do seu estado de fosforilação, conforme ilustrado na Figura 2. Todo esse processo é regulado ou controlado pelo domínio heme contido no sensor histidina quinase e dependente do sinal gasoso.

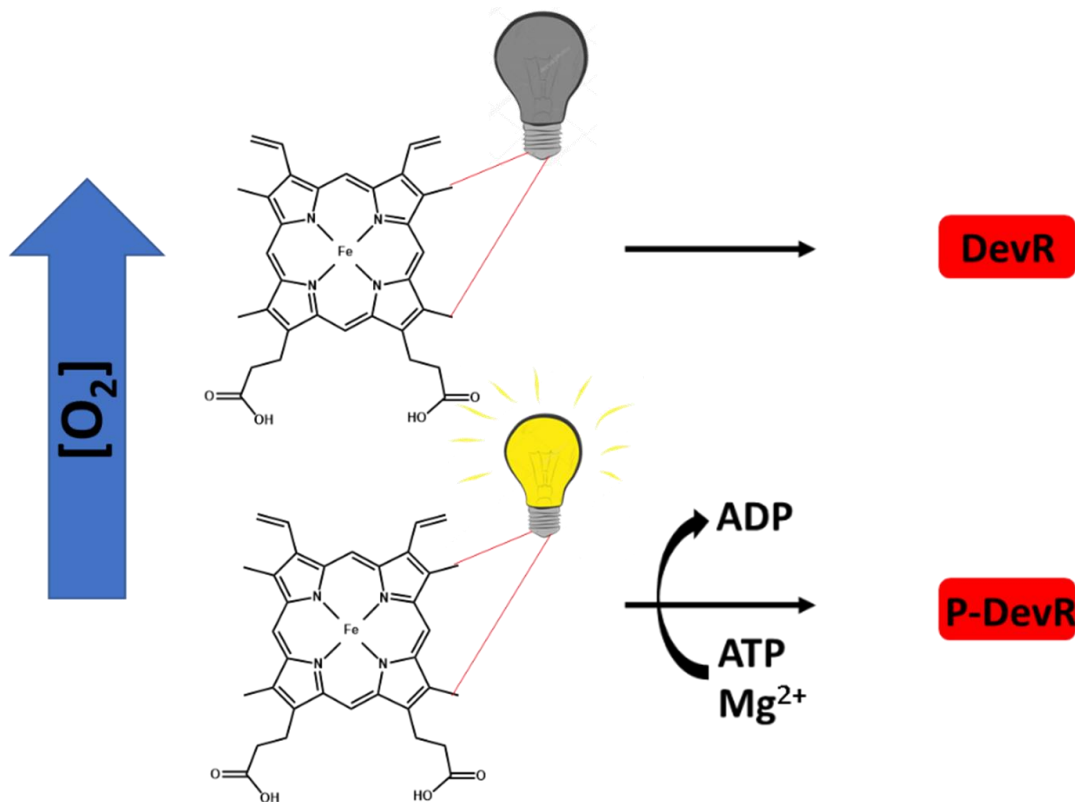
Figura 2 – Esquema genérico de um sistema sensorial de dois componentes.



Fonte: O autor.

Bactérias patogênicas, como o *Mycobacterium tuberculosis*, utilizam esse tipo de sistema para se ajustar às alterações ambientais e responderem a estas condições, coordenando a regulação gênica através destes sistemas. Os sensores histidina quinase DevS (também conhecido como DosS) e DosT, juntamente com o regulador de resposta DevR (ou DosR), têm sido descritos como um sistema de dois componentes (DevS-DevR ou DosT-DevR) que atua no processo de resposta celular a anaerobiose submetida ao *Mycobacterium tuberculosis* (DASGUPTA et al., 2000; ROBERTS et al., 2004; SOUSA; TUCKERMAN; GONZALEZ, 2007), como se pode observar na Figura 3. Esta bactéria pode existir em um estado normal de replicação, típico quando a doença é manifestada, ou em um estado latente que pode ser induzido pela ausência de oxigênio. A condição de latência está presente em granulomas que são formados pelo sistema de defesa humano. Há várias evidências que levam a crer que este sistema de dois componentes é responsável por perceber um estado de hipóxia e, assim, ativar a entrada em latência da bactéria causadora da tuberculose levando a bactéria, portanto, a um estado não replicador, também chamado estado dormente ou latente. Este estado permite que a bactéria sobreviva dentro do hospedeiro por décadas e tem sido considerado um dos principais entraves para qualquer perspectiva de erradicação da tuberculose no mundo.

Figura 3 – Representação esquemática do efeito da concentração de oxigênio molecular (O_2) no sistema DevS-DevR contido no *Mycobacterium tuberculosis*. P indica grupo fosforil ($-OPO_3^{2-}$).



Fonte: O autor.

A proteína DevS possui 578 resíduos de aminoácidos, que estão apresentados em sua sequência primária, Figura 4, totalizando uma massa molar de 62,24 kDa. Outra característica bastante importante é seu ponto isoelétrico, que é de 4,91 (SIB SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS).

Figura 4 – Sequência primária da proteína DevS.

```

      10      20      30      40      50      60
MTTGGGLVDEN DGAAMRPLRH TLSQLRLHEL LVEVQDRVEQ IVEGRDRLDG LVEAMLVVTA

      70      80      90     100     110     120
GLDLEATLRA IVHSATSLVD ARYGAMEVHD RQHRVLHFVY EGIDEETVRR IGHLPKGLGV

     130     140     150     160     170     180
IGLLIEDPKP LRLDDVSAHP ASIGFPPYHP PMRTFLGVFV RVRDESFRTL YLTDKTNQGP

     190     200     210     220     230     240
FSDDDEVLVQ ALAAAAGIAV ANARLYQQAK ARQSWIEATR DIATELLSGT EPATVFRLLVA

     250     260     270     280     290     300
AEALKLTAAD AALVAVPVDE DMPAADVGEL LVIETVGSAA ASIVGRTIPV AGAVLREVFV

     310     320     330     340     350     360
NGIPRRVDRV DLEGLDELAD AGPALLPLR ARGTVAGVVV VLSQGGPGAF TDEQLEMMAA

     370     380     390     400     410     420
FADQAALAWQ LATSQRRMRE LDVLTDRDRI ARDLHDHVIQ RLFAIGLALQ GAVPHERNPE

     430     440     450     460     470     480
VQQRLSDVVD DLQDVIQEIR TTIYDLHGAS QGITRLRQRI DAAVAQFADS GLRTSVQFVG

     490     500     510     520     530     540
PLSVVDSALA DQAEAVVREA VSNAVRHAKA STLTVRVKVD DDLCEIVTDN GRGLPDEFTG

     550     560     570
SGLTNLRQRA EQAGGEPTLA SVPGASGTVL RWSAPLSQ

```

Fonte: ProParam (*SIB Swiss Institute of Bioinformatics*).

A proteína DevS é composta por dois domínios GAF e um domínio enzimático histidina quinase formado pelos subdomínios fosfo-aceptor (HisKA) e ATPase (HATPase), os quais estão representados na Figura 5. No primeiro domínio GAF encontra-se o grupo heme, responsável pela percepção do sinal gasoso, no caso, a oxigênio molecular, enquanto que no domínio HisKA ocorre a autofosforilação promovida pelo subdomínio HATPase que se liga ao ATP. A função do segundo domínio GAF, todavia, ainda é desconhecida, mas sugere-se que intermedia o processo de transdução de sinal (CHO, H.Y.; LEE, Y.H.; BAE, Y.S.; KIM, E.; KANG, 2013; YUKL et al., 2007).

Figura 5 – Representação esquemática dos domínios da proteína DevS.



Fonte: O autor.

A variação no estado de oxidação, distorção do anel porfirínico e o microambiente no qual está inserido o grupo heme podem ser determinantes para a sinalização molecular das hemeproteínas sensoras, resultando no controle da atividade enzimática da proteína (GILLES-GONZALEZ; GONZALEZ, 1993; GONZALEZ, GONZALO.; GILLES-GONZALEZ, 2005; HONORIO-FELÍCIO et al., 2016). As energias das absorções eletrônicas associadas à porfirina do grupo heme, atribuídas às transições do tipo $\pi - \pi^*$, denominada banda Soret, e as bandas de transferência de carga, denominadas bandas Q, são empregadas na investigação do efeito destas perturbações na atividade de hemeproteínas sensoras (BERTINI, I.; GRAY, H.B.; STIEFEL, E.I.; VALENTINE, 2006; SASAKURA et al., 2002). Adicionalmente, há evidências de que o potencial eletroquímico atribuído ao processo redox $Fe^{III/II}$ do grupo heme pode estar relacionado à atividade das hemeproteínas sensoras, pelo menos para o sensor FixL (HONORIO-FELÍCIO et al., 2016).

Estudos eletroquímicos de proteínas redox podem fornecer diversas informações importantes, tais como propriedades termodinâmicas intrínsecas, além de propriedades cinéticas e estruturais destes sistemas. As informações obtidas podem contribuir para uma melhor compreensão de seu papel fisiológico, bem como dos detalhes das reações biológicas de transferência de elétrons envolvidas. Várias dessas proteínas encontram-se na membrana plasmática estando sujeitas a diferenças de potenciais transmembranar. Assim, essas proteínas experimentam efeitos de campo elétrico que são, em certos casos, semelhantes à uma interface eletroquímica (eletrodo/solução). A análise de proteínas através de técnicas eletroquímicas convencionais (voltametria cíclica com eletrodo de trabalho metálico, por exemplo) pode tornar-se inviável devido ao baixo coeficiente de difusão e à possibilidade de adsorção que, geralmente, resulta em desnaturação (ARMSTRONG, 1990). Uma estratégia experimental utilizada para esses estudos é a técnica de espectroeletroquímica com uso de mediadores redox.

A espectroeletroquímica é um método que, geralmente, combina técnicas ópticas e eletroquímicas, sendo frequentemente empregado para monitorar processos redox em proteínas. Sua utilização em meio eletrolítico contendo mediadores redox surgiu com o intuito de sanar algumas dificuldades encontradas no estudo de reações heterogêneas de transferência de elétrons de proteínas, já que muitas dessas reações sobre eletrodos se tornavam irreversíveis ou indetectáveis. A irreversibilidade pode ser atribuída à adsorção da proteína sobre a superfície do eletrodo metálico, o que pode levar a alterações estruturais ou desnaturação da mesma (ARMSTRONG, 1990; DONG, S.; NIU, J.; COTTON, 1995). Na eletroquímica de proteínas, o processo é lento devido ao baixo coeficiente de difusão dessas moléculas que dificulta o

acesso à interface eletrodo/solução. Essa dificuldade pode ser superada com a utilização de mediadores redox, que são substâncias que facilitam o fluxo eletrônico entre a proteína e a superfície metálica. Para que uma dada substância possa atuar como mediador redox, algumas características são imprescindíveis, a saber: (i) apresentar estabilidade química na faixa de potencial empregada, (ii) experimentar reações rápidas de transferência de elétrons com o eletrodo e com a proteína, (iii) não interagir com o sistema em estudo (BERNHARDT, P.V.; CHEN; SHARPE, 2006). O experimento consiste na aplicação de potencial e acompanhamento de alterações espectroscópicas que permitem calcular o potencial do ponto médio (termo utilizado em sistemas biológicos referente ao potencial redox) de proteínas redox ativas de maneira indireta, já que a reação redox destas é induzida por mediadores redox, os quais experimentam, efetivamente, o processo de transferência de elétrons na interface eletrodo/solução (BARD et al., 1944).

A variação das condições do meio onde se encontra uma proteína redox ativa, como pH, temperatura e concentração salina podem afetar a conformação e interferir no potencial redox da mesma. Além desses fatores, sabe-se que o estado redox é sensível à interação com moléculas, tais como CO, NO, O₂, CN⁻ (HONORIO-FELÍCIO et al., 2016). Adicionalmente, vale ressaltar que há uma controvérsia na literatura que perdura por mais de 10 anos, com respeito a proteína sensora DevS. Alguns pesquisadores a consideram um sensor redox (KUMAR *et al.*, 2007), enquanto outros, um sensor de oxigênio (SOUSA; TUCKERMAN; GONZALEZ, 2007). Proteínas sensoras redox, geralmente, são rapidamente oxidadas quando expostas ao oxigênio molecular. Por outro lado, proteínas sensoras de oxigênio se ligam a esta molécula de forma bastante estável e podem apresentar reação de oxidação lenta. Esse comportamento, todavia, não pode ser generalizado, uma vez que a proteína sensora de oxigênio FixL apresenta uma rápida reação de auto-oxidação ao ar (meia vida de cerca de 15 minutos), juntamente com baixa afinidade a oxigênio molecular (GILLES-GONZALEZ, 2006). Para uma validação de seu papel como sensor de oxigênio ou redox, deve-se levar em consideração a fisiologia do micro-organismo e qual o seu potencial redox citossólico. Assim, é possível inferir, para uma dada condição, se a proteína apresenta condição termodinâmica (espontaneidade) para responder a uma diferença de potencial. Existindo a possibilidade de resposta do ponto de vista termodinâmico, deve-se avaliar a cinética da reação, ou seja, se esta ocorreria em uma janela de tempo razoável para a necessidade de resposta da bactéria.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As hemeproteínas sensoras são uma das principais reguladoras de respostas adaptativas provocadas por suas ligações às moléculas consideradas mensageiras fisiológicas, como O₂, CO e NO. A alteração no ambiente do grupo heme é determinante na sinalização molecular das hemeproteínas sensoras, resultando no controle de suas atividades enzimáticas ou interações com biomoléculas. A proteína DevS, juntamente com a DevR, forma um sistema de dois componentes que, dependendo das condições, por exemplo sob hipóxia, regula genes responsáveis pela entrada do *Mycobacterium tuberculosis* no estado de latência, facilitando a sobrevivência deste patógeno no hospedeiro. As reações redox de hemeproteínas fornecem informações importantes que podem contribuir para a melhor compreensão de processos biológicos de transferência de elétrons, bem como validar a forma biologicamente relevante daquela proteína. No ano de 2007, demonstrou-se que a proteína DevS atua como sensor de oxigênio por Sousa e colaboradores (SOUSA; TUCKERMAN; GONZALEZ, 2007). Neste mesmo ano, Kumar e colaboradores propuseram a função de sensor redox para esta proteína, uma vez que não conseguiram obtê-la ligada ao oxigênio molecular de forma estável, além de observarem uma rápida reação de auto-oxidação que leva à inativação (KUMAR et al., 2007). Apesar desta controvérsia, estudos de cinética de oxidação mostraram que a proteína DevS se liga reversivelmente ao oxigênio molecular, e experimenta uma reação de oxidação bastante lenta. Ainda assim, o conflito de sua função biológica se mantém na literatura. Para avaliar se tal proteína teria potencial redox capaz de atuar como sensor de oxigênio ou redox, deve-se levar em consideração a fisiologia do micro-organismo, e qual o seu potencial redox citosólico.

Desta forma, o objetivo principal deste trabalho foi elucidar o papel de sensor da hemeproteína DevS, utilizando desta forma um método espectroeletróquímico, onde se associou as técnicas de eletrólise a potencial controlado com a espectroscopia de absorção eletrônica nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis). Especificamente, contemplou-se os seguintes objetivos:

- expressar e purificar a proteína DevS em sistema heterólogo *E. coli*;
- medir o potencial redox da proteína DevS pelo uso de técnica espectroeletróquímica em soluções:
 1. contendo ou não os ligantes CO, NO, CN⁻, O₂ e imidazol;
 2. de diferentes concentrações salinas: 100, 200 e 500 mmol⁻¹ de NaCl;
 3. de diferentes valores de pH (6 a 10);

- medir a constante de afinidade do imidazol pela proteína DevS nas formas oxidada e reduzida.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O gene *devS* do *Mycobacterium tuberculosis* amplificado a partir do DNA genômico foi clonado no plasmídeo pGGNKT derivado do pUC19, sob controle do promotor *tac*, contendo gene de resistência a ampicilina para seleção em *Escherichia coli*, posteriormente foi realizado o processo de transformação e preparo de pré-inóculo das células, como descrito por SOUSA et al., 2007. Foi utilizada água ultrapura obtida pelo sistema de purificação MiliporeDirect Q® 3UV, apresentando resistividade maior que 18 MΩ cm em todos os procedimentos que envolviam soluções aquosas.

3.1 Expressão da Proteína DevS

O crescimento inicial do inóculo bacteriano foi realizado em incubadora tipo *shaker* orbital (TE-420 TECNAL®). Inicialmente, preparou-se um pré-inóculo transferindo-se o inóculo previamente armazenado no ultrafreezer para um tubo Falcon contendo 5 mL de meio de cultura LB (Miller) (FISHER SCIENTIFIC), previamente autoclavado e preparado de acordo com as especificações do fabricante (25 g L⁻¹ em água deionizada) e ampicilina sódica (SIGMA®) na concentração de 100 µg 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 4 L de meio de cultura recém preparado (1 mL de pré-inóculo para cada litro de LB separados em 4 erlenmeyers de 2 L) contendo ampicilina (100 µg mL⁻¹). Este foi crescido a 37°C sob agitação a 200 rpm, até que a densidade óptica medida em 600 nm (OD_{600nm}) atingisse 1,0. Para acompanhar a densidade óptica, empregou-se um espectrofotômetro *Hewlett-Packard*, modelo 8453 *Diode-Array*, sendo feito branco com meio de cultura LB. Quando o inóculo atingiu a densidade óptica desejada, baixou-se a temperatura do shaker para 30°C e deixou-se por 24 h. Em seguida, manteve-se os erlenmeyers em gelo e as células foram centrifugadas durante 15 minutos a 3500 x *g* em centrífuga (NT820 Novatecnica®). O *pellet* das células foi armazenado a -86°C até ser iniciado o procedimento de purificação.

3.2 Purificação

3.2.1 Partição das células

O processo de purificação se inicia com o acesso ao citosol bacteriano, onde encontra-se a proteína expressa na sua forma solúvel. Desta forma é realizado o rompimento da parede celular e centrifugação para remoção do extrato bruto. Este procedimento é realizado

através de ultrasonicação e o uso de uma enzima que catalisa a digestão da parede celular da célula bacteriana, no caso específico a lisozima. Inicialmente o pellet celular foi ressuspensionado em tampão de lise (composição apresentada na Tabela 1) em uma proporção de 2 gramas de *pellet* para cada 5 mL de tampão lise em temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi ultrasonificada sob agitação branda em uma temperatura de 4°C por 1 hora a 40% da amplitude máxima com ciclos alternados de 1 minuto de pulso e 1 minuto em repouso empregando-se o sonicador de sonda Vibracell™ SONICS (U.S.A.). Durante o processo de ultrasonicação a temperatura foi mantida em aproximadamente 10 °C. Logo após esse procedimento, centrifugou-se o material a 40.000 x g por 40 minutos, mantida a temperatura de 4°C, em uma centrífuga 3-30K SIGMA® (Alemanha). O *pellet* de resíduo foi descartado e guardou-se o sobrenadante de coloração avermelhada para posterior precipitação com sulfato de amônio.

Tabela 1 – Composição do tampão de lise.

Composição	Concentração	Procedência
Tris-HCl pH 8	50 mmol L ⁻¹	Sigma-Aldrich
NaCl	137 mmol L ⁻¹	SERVA
KCl	5 mmol L ⁻¹	Amresco
Glicerol	5%	Sigma-Aldrich
EDTA	1 mmol L ⁻¹	Sigma-Aldrich
2-mercaptoetanol	10 mmol L ⁻¹	Sigma-Aldrich
PMSF	0,17 mg mL ⁻¹	Sigma-Aldrich
Lisozima	0,1 mg mL ⁻¹	Sigma-Aldrich

Fonte: O autor.

3.2.2 Precipitação da Fração Proteica

A fração solúvel coletada anteriormente foi adicionado lentamente uma solução contendo (NH₄)₂SO₄ 4 mol L⁻¹ (100% saturada), tris 10 mmol L⁻¹ e EDTA 1 mmol L⁻¹ até

alcançar 40% da concentração de saturação, mantida sob gelo e agitação moderada, o que provocou a precipitação de uma fração proteica que inclui a proteína de interesse. Centrifugou-se a mistura a 40.000 x g por 40 minutos, a 4°C, sendo o sobrenadante levemente amarelo descartado, enquanto o precipitado vermelho intenso foi rapidamente congelado e mantido a -86°C para dar sequência as próximas etapas de purificação.

3.2.3 Coluna de Interação Hidrofóbica (*Fenil-Sepharose*TM)

O precipitado obtido na etapa anterior foi ressuspenso em tampão 10 mmol L⁻¹ Tris HCl pH 8 em uma proporção de 15 g de precipitado para 100 mL de tampão. Logo após foi centrifugado a mistura a 40.000 x g por 15 minutos, sendo descartado o precipitado e mantida em gelo o sobrenadante, cuja coloração era fortemente avermelhada. Esta fração solúvel foi lentamente aplicada na coluna *fenil-Sepharose*TM (d = 2,8 cm; h = 15 cm, volume = 62 mL), previamente equilibrada com 10% (NH₄)₂SO₄ da solução saturada (0,4 mol L⁻¹). Após a total interação da proteína com a coluna, realizou-se lavagens sucessivas usando 4 volumes de coluna de 10% (NH₄)₂SO₄ (0,4 mol L⁻¹) e 6 volumes de coluna de 5% NH₄SO₄ (0,2 mol L⁻¹), por último, utilizou uma solução aquosa contendo 10% de etilenoglicol (v/v) para fazer a eluição da proteína. A fim de se estimar a razão de pureza foi obtido o espectro eletrônico nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis) de cada fração eluída. Esta razão é obtida empregando-se os valores dos máximos de absorbância em 280 e 412 nm, que estão relacionados, respectivamente, às transições eletrônicas provocadas pela absorção de radiação eletromagnética dos grupos aromáticos da proteína (fenilalanina, tirosina e triptofano) e da transição eletrônica do grupo heme. A razão (Rz), Ab_{S280nm}/Ab_{Soret} , relaciona a concentração de proteínas totais à concentração de hemoproteínas, desta forma, quanto menor for o valor desta razão maior será o grau de pureza da proteína DevS. Todas as frações com razão de pureza maiores que 0,90 foram descartadas, enquanto as que tinham valores inferiores foram combinadas, totalizando um volume de 140 mL. Dialisou-se essa fração de interesse em 3 L de tampão 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 8, por 16 horas a 4 °C, ou seja, apresentando uma diálise contra 21,5 vezes de diluição para remoção do excesso de sais remanescentes.

3.2.4 Coluna de Troca Aniônica (DEAE)

A fração dialisada foi injetada na coluna de DEAE Sepharose® (fast-flow, d=3,2 cm; h = 14 cm), que foi pré-equilibrada com tampão 10 mmol L⁻¹ Tris HCl pH 8. Durante o processo de lavagem e eluição utilizou-se as soluções tampões contendo 10 mmol L⁻¹ Tris HCl

pH 8 sendo adicionado 100, 125, 175, 200 e 250 mmol L⁻¹ de NaCl, em fluxo de 2 mL min⁻¹, na qual a proteína foi eluída com a concentração máxima de NaCl. Um cromatógrafo de baixa pressão FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) BIO-RAD (USA) controlou o fluxo e as concentrações que foram utilizadas. Através de um cromatograma gerado pelo FPLC monitorando absorvância em 280 nm, foi possível controlar a eluição da proteína coletando em pequenas frações de 2 mL num total de 80 mL. Novamente, em cada uma das frações eluídas foi obtido seu espectro eletrônico na região do UV-Vis, assim sendo analisado as razões de pureza Abs_{280nm}/Abs_{412nm} (Rz). As melhores frações obtidas apresentaram Rz entre 0,42 e 0,59. Estas frações foram combinadas e concentradas até uma concentração final de cerca de 162 $\mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando-se um concentrador de proteína Millipore Amicon® 8050 sob pressão de argônio e agitação, utilizando uma membrana Amicon YM-30 (massa molar limite de corte de 30 kDa), sendo adicionado 5% de glicerol. Em seguida foram separadas em alíquotas de 100, 200, 500 e 800 μL . Essas amostras foram congeladas rapidamente com uso de nitrogênio líquido, e armazenadas a -86°C . Evitou-se o descongelamento e recongelamento destas amostras por mais de uma vez.

3.2.5 Eletroforese

Para confirmar a pureza final da amostra de proteína, foi realizado eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). O detergente dodecil sulfonato de sódio (SDS) se liga as proteínas, levando-as a sua forma desnaturada e contribuindo com uma grande quantidade de cargas negativas, tornando a carga das proteínas insignificante, proporcionando que as proteínas sejam separadas em razão de sua massa molecular. A percentagem de acrilamida no gel determina o tamanho dos poros e a faixa de separação. Utilizou-se acrilamida/bis-acrilamida, 37:1 (SIGMA®), na concentração de 10% no gel de separação. Os componentes dos géis estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição dos géis utilizados na eletroforese (SDS-PAGE).

Composição dos géis	Volume (μL) de:	
	<i>gel alinhamento</i> (<i>stacking gel</i>)	<i>gel separação</i> (<i>resolving gel</i>)
<i>Stacking gel buffer</i> ($0,375\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8,8)	450	---
<i>Resolution gel buffer</i> ($0,125\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 6,8)	---	1250
Acrilamida/Bis-acrilamida, 37:1	225	1250
10% Dodecil sulfato de sódio (SDS)	18	50
H ₂ O	1110	2450
10% Persulfato de amônio	13,5	38
TEMED (tetrametiletilenodiamina)	2	2,5

Fonte: O autor.

Foi utilizado o suporte de montagem BIO-RAD e placas com 1 mm de espaçamento para o preparo do gel e para a corrida eletroforética utilizou-se uma cuba de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® Tetra System (BIO-RAD) e fonte para eletroforese FB300 (FISHER SCIENTIFIC). No preparo da amostra foi adicionado a cada 5 μL de volume cerca de 7 μL de tampão de amostra; posteriormente estas amostras foram aquecidas em banho-maria a 100 °C durante 4 minutos, deixando resfriar a temperatura ambiente para sua aplicação no gel. A composição final do tampão de amostra pode ser visualizada na Tabela 3. Utilizou-se como marcador molecular *Protein Ladder* (New England BioLabs), uma mistura comercial contendo 12 proteínas com massa molecular entre 10 e 250 kDa submetida ao mesmo tratamento das amostras. Em seguida as amostras foram aplicadas nos poços do gel de poliacrilamida, sendo então aplicado potencial de 150 V por cerca de 50 min. Após esse processo eletroforético, o gel foi corado por 30 minutos sob agitação em solução corante (5g/L azul de *Coomassie*, 7,5 % ácido acético glacial (v/v) e 45% metanol (v/v)), em seguida foi descorado por 3 horas em solução descorante (7,5% ácido acético glacial (v/v) e 45% metanol (v/v)). Subsequentemente registrou-se uma foto do gel utilizando um fotodocumentador BIO-RAD.

Tabela 3 – Composição do tampão de amostra.

Composição	Concentração
Tampão Tris-HCl pH 6,8	0,125 mol L ⁻¹
2-mercaptoetanol	700 mmol L ⁻¹
Glicerol	10%
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	4%
Azul de bromofenol	0,2 mg mL ⁻¹

Fonte: O autor.

3.2.6 Espectroeletróquímica

A determinação dos potenciais dos processos redox dos sistemas estudados foi realizada pela associação das técnicas de eletrólise a potencial controlado com a espectroscopia de absorção eletrônica nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis). Para tanto, foi utilizado o tratamento matemático descrito abaixo.

O potencial de ponto médio, E_m , da proteína foi calculado a partir da Equação 1, que relaciona a equação de Nernst com a Lei de Lambert-Beer (Material suplementar: (BERNHARDT, P.V.; CHEN; SHARPE, 2006):

$$Abs = \frac{A_{ox} \times 10^{\frac{n(E-E_m)}{59}} + A_{red}}{1 + 10^{n(E-E_m)/59}} \quad (1)$$

O E_m é obtido através de vários *fitting* dos valores de Abs x E, onde:

Abs: absorvância máxima do espectro no potencial aplicado;

A_{ox} : Absorvância máxima da proteína totalmente oxidada;

A_{red} : Absorvância máxima da proteína totalmente reduzida;

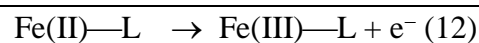
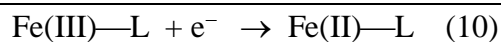
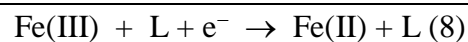
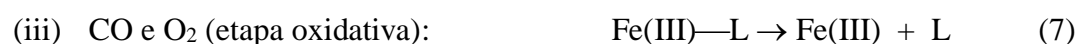
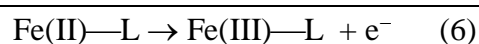
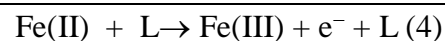
n: número de elétrons = 1;

E: potencial aplicado em mV;

E_m : potencial de ponto médio da proteína.

Os dados obtidos foram analisados e tratados pelos programas OriginPro 8 e ReactLab Redox, utilizando-se a Equação 1.

O processo redox da proteína DevS envolve etapas químicas que dependem do ligante considerado, conforme descrito abaixo:



Para a proteína ligada a imidazol foram medidas, também, as constantes de dissociação nos estados oxidado e reduzido, uma vez que esta espécie permanece ligada ao centro metálico em ambos os estados de oxidação, conforme explicitado nas Equações 11 e 13. Os dados foram analisados e ajustados usando o software Prism (GraphPad) empregando uma equação de equilíbrio considerando um sítio de ligação, Equação 14 (CHENPRAKHON et al., 2010).

$$\frac{\text{Abs}}{\text{Abs}_{\text{max}}} = \frac{[\text{L}]}{K_d + [\text{L}]} \quad (14)$$

Em que Abs é a absorvância medida a cada concentração do ligante L usado ([L]) e Abs_{max} é a variação máxima de absorvância quando saturada. Posteriormente, o valor de K_d

calculado através da Equação 14 é aplicado em uma equação de Nernst adaptada, Equação 15, para calcular os valores de potencial do ponto médio (E_m) (BERRY et al., 2007) .

$$E_m = E_L^\circ - E^\circ = - \left(\frac{RT}{nF} \right) \ln \left(\frac{K_d^{\text{II}}}{K_d^{\text{III}}} \right) \quad (15)$$

Sendo E_L° e E° os potenciais da proteína DevS nas formas DevS-imz e deoxi-DevS, respectivamente; K_d^{II} e K_d^{III} são as constantes de dissociação medidas para a proteína ligada ao imidazol nos estados reduzido e oxidado, respectivamente; R é a constante dos gases ideais ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); T é a temperatura do ambiente momento da realização do experimento (valor médio de 298 K); n é o número de elétrons que participa da reação, $n = 1$; F é a constante de Faraday, $F = 96485 \text{ C mol}^{-1}$.

Várias medidas espectroeletróquímicas foram realizadas em meio anaeróbico utilizando a proteína recombinante DevS do *Mycobacterium tuberculosis* na presença de mediadores redox inorgânicos. Dessa forma, foi possível determinar o potencial redox desta proteína em diferentes condições: 1) na ausência e presença dos ligantes CN^- , imidazol, CO e NO; 2) em concentrações variadas de NaCl (100, 200 e 500 mmol L^{-1}) e 3) em diferentes valores de pH (6, 7, 8, 9 e 10).

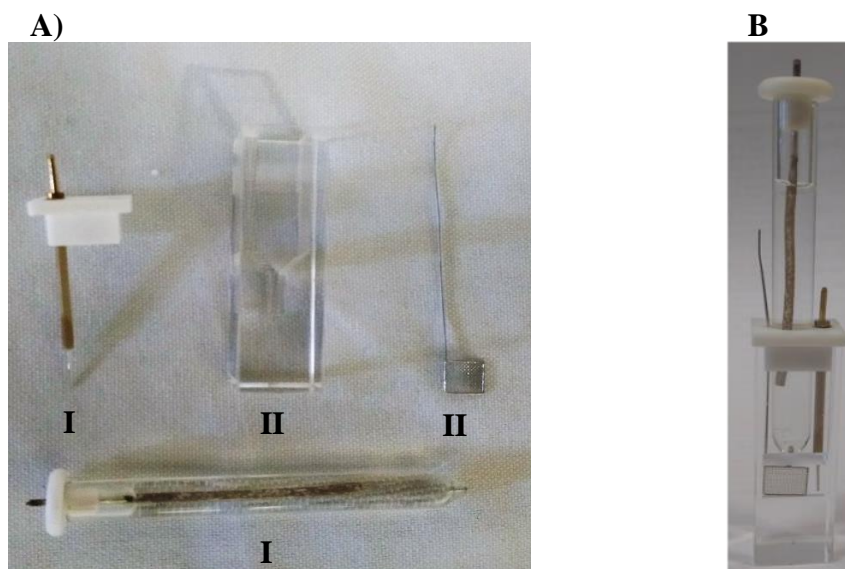
Nos experimentos realizados em diferentes concentrações salinas, utilizou-se a Equação 16 (NØRBY; ESMANN, 1997) para transformar a concentração de NaCl em força iônica (I) do meio.

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2 \quad (16)$$

Onde I é a força iônica do meio; C_i é a concentração de cada íon que forma o sal; e Z a carga do íon.

As medidas espectroeletróquímicas foram realizadas em meio anaeróbico, exceto os experimentos com CO e O_2 , utilizando uma câmara anaeróbica (COY laboratory), um potenciostato 910 PSTAT mini (Metrohm Autolab) e um espectrofotômetro UV-Vis de fibra óptica Ocean Optics USB2000. A célula espectroeletróquímica era composta de uma cubeta OTTLE (*optically transparent thin-layer*) de caminho óptico de 0,1 cm contendo uma rede fina de platina, um fio de platina e Ag|AgCl|Cl^- (saturado) (196 mV vs Eletrodo Padrão de Hidrogênio), como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência (196 mV vs Eletrodo Padrão de Hidrogênio), tal como ilustrado na Figura 6.

Figura 6 – Materiais que compõem a célula espectroeletroquímica: A) eletrodo auxiliar (I), cubeta OTTLE (II), eletrodo de trabalho (Pt) (III) e eletrodo de referência (Ag|AgCl|Cl⁻) (IV); B) célula completa.



Fonte: O autor.

Os experimentos espectroeletroquímicos foram realizados na presença dos mediadores eletroquímicos: [Co(*trans*-diammac)]Cl₃, [Co(AMMEsar)]Cl₃, [Co(AMME-N₅S-sar)]Cl₃, [Co(CLMEN₄S₂sar)]Cl₃, [Co(NMe₃)₂sar]Cl₅, Fe(NOTA), Ferrocenometanol (Tabela 4; 25 μmol L⁻¹) em solução eletrolítica 35 mmol L⁻¹ de tampão Tris contendo NaCl e 30 μmol L⁻¹ da proteína DevS. A concentração de NaCl, assim como o pH do meio foram, também, estudados como variáveis de trabalho. Três condições experimentais foram utilizadas para a obtenção dos dados de espectroeletroquímica:

1) DevS em 35 mmol L⁻¹ de tampão Tris e 100 mmol L⁻¹ NaCl, a) sem ligantes (pH 8,0), na presença dos ligantes b) imidazol (150 mmol L⁻¹, pH 8,0), c) CN⁻ (4 mmol L⁻¹, pH 9,5), d) CO (pH 8,0) e e) NO (DEA NONOate 500 μM, pH 8,0);

2) DevS em 35 mmol L⁻¹ de tampão Tris pH 8,0, na ausência de ligantes e em diferentes concentrações de NaCl: 100, 200 e 500 mmol L⁻¹;

3) DevS em 35 mmol L⁻¹ de tampão Tris e 100 mmol L⁻¹ NaCl, na ausência de ligantes e em diferentes valores de pH, de 6 a 10. Na Tabela 4 estão descritos os compostos utilizados como mediadores com os respectivos potenciais redox.

Importante ressaltar que o experimento com CN⁻ foi realizado em pH 9,5, ou seja, diferentes dos outros experimentos, pois o íon CN⁻ se torna protonado em pH abaixo de 9,2,

levando a uma diminuição de concentração dessa substância, já que ocorre formação de ácido cianídrico (HCN), que é volátil.

O experimento com monóxido de carbono foi realizado através de borbulhamento de CO na solução, este proveniente de um cilindro de gás.

Tabela 4 – Valores de potenciais de meia-onda ($E_{1/2}$) dos mediadores redox utilizados nos experimentos eletroquímicos. Os mediadores de A a F foram sintetizados e descritos por (BERNHARDT, P.V.; CHEN; SHARPE, 2006). O mediador G é de procedência Sigma-Aldrich.

Item	Mediadores	$E_{1/2}$ vs EPH (mV)
A)	[Co(<i>trans</i> -diammac)]Cl ₃	-555
B)	[Co(AMMEsar)]Cl ₃	-380
C)	[Co(AMME-N ₅ S-sar)]Cl ₃	-220
D)	[Co(CLMEN ₄ S ₂ sar)]Cl ₃	-134
E)	[Co(NMe ₃) ₂ sar]Cl ₅	10
F)	Fe(NOTA)	195
G)	Ferrocenometanol	447

Fonte: O autor.

Inicialmente, o eletrodo de trabalho era polarizado em +396 mV vs EPH até que se observasse o máximo da banda atribuída à forma oxidada (DevS - Fe^{III}) em 406 nm. Em seguida, aplicava-se potencial no sentido de redução do sistema para obtenção da forma reduzida da proteína (DevS - Fe^{II}). Após a conversão completa para a forma reduzida, a aplicação de potencial era invertida a fim de checar a reversibilidade do sistema. Os potenciais foram aplicados, tipicamente, em intervalos de 100, 50 e 25 mV, dependendo, todavia, da variação de absorbância apresentada nos espectros. Cada potencial aplicado levou, em média, 30 minutos para apresentar um espectro estável.

3.2.7 Afinidade da proteína DevS ao Imidazol

A medição da afinidade da proteína DevS por imidazol foi realizada em condições tais que a proteína se apresentasse nas formas oxidada (férica) e reduzida (ferrosa, meio

anaeróbico). Dentro da câmara anaeróbia, uma solução estoque concentrada de DevS foi quimicamente reduzida com um excesso de cerca de 20 vezes em mol de ditionito de sódio. As alíquotas foram, então, retiradas e levadas para a cubeta de quartzo onde os experimentos foram realizados. Nesta cubeta contendo a proteína numa concentração final de $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão Tris 35 mmol L^{-1} , 100 mmol L^{-1} de NaCl, foram realizados os procedimentos de titulação adicionando pequenas alíquotas das soluções estoques de imidazol (pH ajustado para 8,0) armazenadas em meio anaeróbico. Para as medidas em meio aerado, as amostras da proteína DevS foram preparadas fora da câmara anaeróbica, sendo então rapidamente oxidadas usando um excesso de 4 vezes em mol de ferricianeto de potássio. Em seguida, uma alíquota desta proteína na forma férrica (met-DevS) foi transferida para uma cubeta e titulada com imidazol (pH ajustado para 8,0), de forma semelhante ao procedimento realizado dentro da câmara.

3.2.8 Potencial estimado da proteína DevS ligada a oxigênio molecular

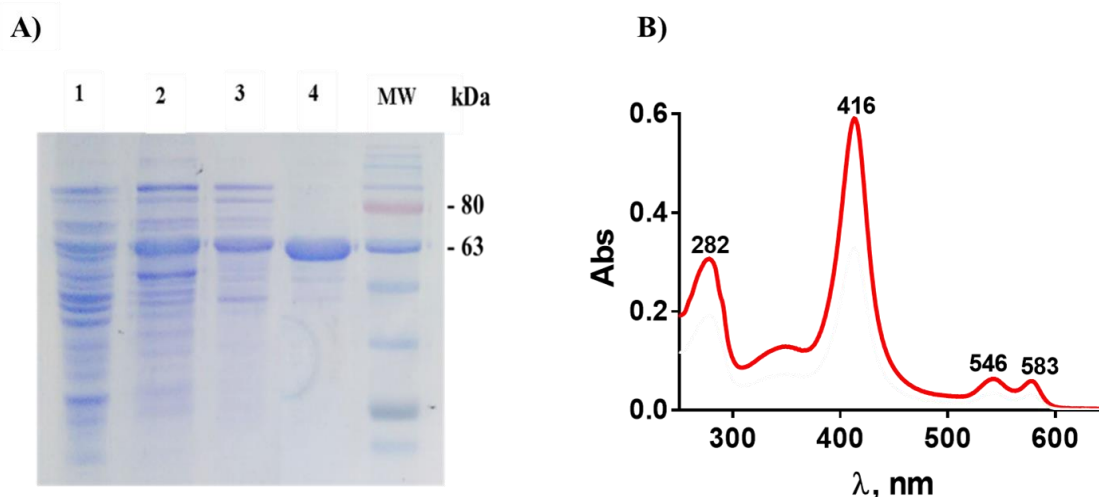
Checou-se o comportamento eletroquímico da proteína DevS na presença de oxigênio com uso de mediadores redox. Infelizmente, não foi possível a realização de medidas espectroeletroquímicas nesse caso, pois a proteína DevS ligada a O_2 parece experimentar dissociação à medida que potenciais eram aplicados ao sistema. Desta forma, buscou-se avaliar a oxidação direta da proteína oxi-DevS empregando os mediadores nas suas formas oxidadas. O experimento foi realizado em meio aeróbico empregando-se o espectrofotômetro Cary 5000 UV-Vis-NIR e uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm contendo os seguintes mediadores: $[\text{Co}(\text{CLMEN}_4\text{S}_2\text{sar})]\text{Cl}$, $[\text{Co}(\text{NMe}_3)_2\text{sar}]\text{Cl}_5$, $\text{Fe}(\text{NOTA})$ e ferrocenometanol em concentração de $10 \mu\text{M}$, DevS $7 \mu\text{M}$, tampão Tris 35 mM e NaCl 100 mM . Os espectros obtidos depois da adição dos mediadores não apresentaram mudanças significativas, mesmo após 20 min. A proteína DevS foi, também, monitorada sem a adição dos mediadores nas mesmas condições a fim de servir de controle negativo. Essas medidas forneceram uma estimativa do potencial da proteína DevS na presença de oxigênio.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão e Purificação da Proteína DevS do *Mycobacterium tuberculosis*

Após os processos de crescimento bacteriano e indução de expressão, realizou-se o rompimento das células, isolamento do citosol e posterior precipitação da fração solúvel com sulfato de amônio. Em seguida, empregou-se procedimentos cromatográficos usando coluna de interação hidrofóbica (fenil-Sepharose) e troca aniônica (dietilaminoetil (DEAE)), as quais foram suficientes para obtenção da proteína recombinante com elevada razão de pureza (Rz). A Figura 7A apresenta a imagem do gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE) após cada uma das várias etapas de purificação da proteína DevS, enquanto a Figura 7B apresenta o espectro eletrônico obtido nas regiões do UV-Vis após a última etapa de purificação (coluna DEAE).

Figura 7 – Perfil de purificação da proteína DevS. A) Gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) contendo as frações proteicas das diversas etapas de purificação da proteína DevS. Poços: 1- fração solúvel (citosol); 2- precipitado com sulfato de amônio; 3- isolado da coluna de fenil-Sepharose; 4- isolado da coluna de troca aniônica (DEAE); MW- marcador molecular padrão (New England BioLabs). B) Espectro de absorção eletrônica nas regiões do UV-Vis da proteína DevS após a última etapa de purificação (coluna de troca aniônica).



Fonte: O autor.

É possível observar no poço 1 da Figura 7A que, após o rompimento e centrifugação das células, há uma grande quantidade de outras proteínas como contaminantes. Na etapa da precipitação com 40% de sulfato de amônio há uma leve, mas significativa, remoção de parte

destes contaminantes, como pode ser observado no poço 2. Isso ocorre devido alguns contaminantes permanecerem solúveis mesmo na presença desta concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. No poço 3, todavia, percebe-se a remoção de grande parte dos contaminantes, processo este que ocorre após o uso da coluna com resina de interação hidrofóbica. A última etapa cromatográfica (coluna de troca aniônica) tem o objetivo de refinar o processo de purificação da proteína DevS. De fato, após essa etapa (poço 4) se observa uma banda nítida próxima a 63 kDa do marcador molecular indicando a presença da proteína DevS, cuja massa molecular é 62,24 kDa.

A razão de pureza (Rz) de uma hemeproteína é calculada através da razão das absorbâncias em 280 nm, referente aos grupos aromáticos da proteína, e em 400 – 440 nm, atribuída às transições no grupo heme (banda *Soret*). As amostras de proteína DevS são consideradas satisfatoriamente puras quando o valor de Rz é observado entre 0,5 e 0,7 (SAINI et al., 2002). Neste trabalho, constatou-se, através da eletroforese em gel de poliacrilamida e do espectro eletrônico adquirido nas regiões UV-Vis, que a proteína DevS foi obtida com um elevado grau de pureza, tendo um valor de Rz igual a 0,52. Adicionalmente, a proteína DevS recém purificada apresentou o máximo da banda *Soret* em 414 nm (Figura 7B), podendo-se afirmar que o átomo de ferro do grupo heme está na forma Fe^{2+} , baixo *spin* e hexacoordenado, tendo-se oxigênio molecular como sexto ligante na posição axial do grupo heme (SOUSA; TUCKERMAN; GONZALEZ, 2007). A banda *Soret* e as bandas alfa (α) e beta (β) que aparecem em 414, 546 e 583 nm, respectivamente, são atribuídas às transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ no anel porfirínico do grupo heme. Os valores dessas bandas podem ser alterados dependendo do estado de oxidação e da ausência ou presença de ligantes coordenados ao átomo de ferro funcionando, assim, como identificador dos estados ligados e não ligados (OWENS; CONNOR, 1988). A relação dos comprimentos de onda das bandas *Soret* da proteína DevS em diferentes formas obtidas neste estudo encontra-se listada na Tabela 5.

Tabela 5 – Relação das bandas *Soret* obtidas para a proteína DevS em suas diferentes formas e atividade quinase correspondente.

DevS	$\lambda_{\text{máx}}\text{Soret}$ (nm)	Atividade Quinase
Fe ³⁺ -H ₂ O (met)	406	Inativa ^a
Fe ²⁺ (deoxi)	429	Ativa ^a
Fe ³⁺ -CN ⁻ (cianomet)	419	Inativa ^b
Fe ³⁺ -imidazol	413	-
Fe ²⁺ -imidazol	426	-
Fe ³⁺ -NO	408	Inativa ^c
Fe ²⁺ -NO	418	Ativa ^a
Fe ²⁺ -CO (carboxi)	421	Ativa ^a
Fe ²⁺ -O ₂ (oxi)	414	Inativa ^a

a) (SOUSA; TUCKERMAN; GONZALEZ, 2007); b) (MADRONA et al., 2016); c) (KUMAR et al., 2007).

4.2 Espectroeletróquímica

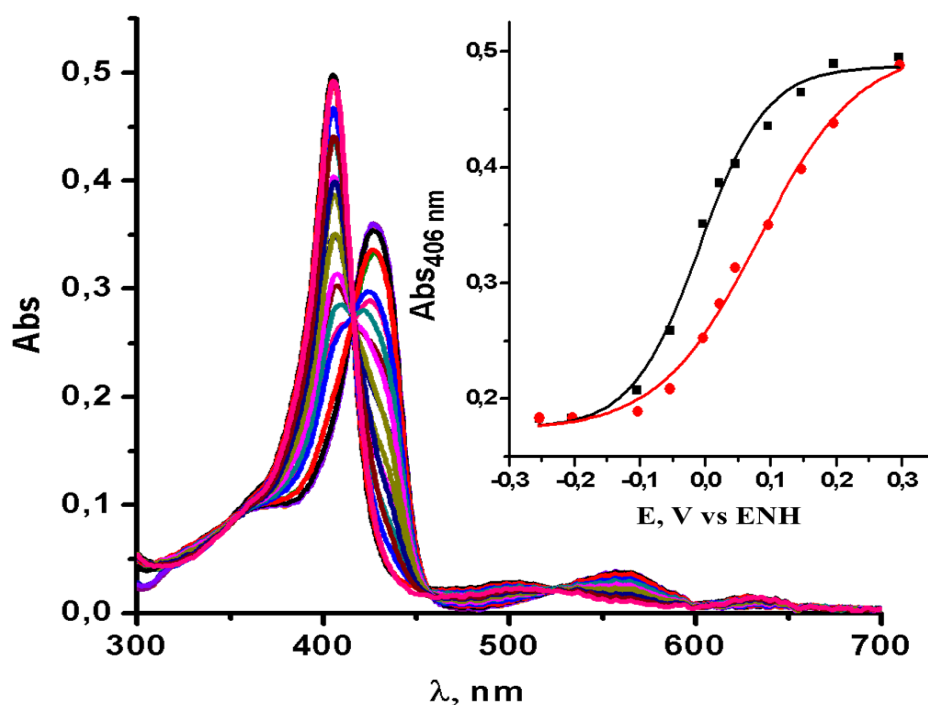
4.2.1 Influência dos Ligantes

A proteína DevS, quando no estado ferroso e na ausência de ligantes, apresenta-se pentacoordenada, como descrita na literatura (BASUDHAR et al., 2016). No estado férrico, por sua vez, a proteína encontra-se hexacoordenada tendo uma molécula de água ocupando a posição axial. Este comportamento a difere, por exemplo, da hemoproteína sensora FixL, que se apresenta pentacoordenada em ambos os estados de oxidação. Curiosamente, a proteína DevS na forma reduzida e sob condição anaeróbica, encontra-se enzimaticamente ativa, enquanto que na sua forma oxidada é inativa. Essa característica também a difere de algumas proteínas FixL, ex.: *BjFixL* e *ReFixL*, as quais são enzimaticamente ativas em ambos estados de oxidação (GILLES-GONZALEZ, 2006; SOUSA et al., 2012).

Neste trabalho, inicialmente realizou-se uma titulação espectroeletróquímica da proteína DevS na ausência de ligantes externos, já que a mesma encontra-se ativa quando na forma deoxi (DevS/Fe^{II}) e inativa na forma met (DevS/Fe^{III} – H₂O). Foi aplicado uma varredura de potencial de + 296 a – 254 mV vs EPH até a completa redução da proteína. Após sua redução, o sentido de aplicação de potencial foi invertido. Cada potencial era aplicado por cerca de 25 minutos, tempo necessário para a observação de valores constantes de absorvância. Ao iniciar

a titulação espectroeletróquímica, a proteína DevS apresentava uma banda Soret com máximo em 406 nm, atribuído à forma oxidada ($\text{DevS/Fe}^{\text{III}} - \text{H}_2\text{O}$). À medida que os potenciais de redução eram aplicados, o processo de redução era visualizado pelo deslocamento da banda Soret de 406 para 429 nm, região atribuída ao estado deoxi ($\text{DevS/Fe}^{\text{II}}$). Durante a titulação oxidativa, verificou-se a diminuição de intensidade da banda em 429 nm e o reaparecimento da banda em 406 nm indicando a reversibilidade do sistema. Os espectros registrados após a aplicação de cada potencial estão apresentados na Figura 8.

Figura 8 – Espectros da Proteína DevS obtidos na titulação espectroeletróquímica nos sentidos redutivo e oxidativo de uma solução tampão tris 35 mmol L^{-1} / NaCl 100 mmol L^{-1} (pH 8) contendo proteína DevS 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e os mediadores C a G (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$). *Inset*: perfil da absorbância (em 406 nm) *versus* potencial aplicado para a proteína durante as titulações redutiva (■) e oxidativa (●).



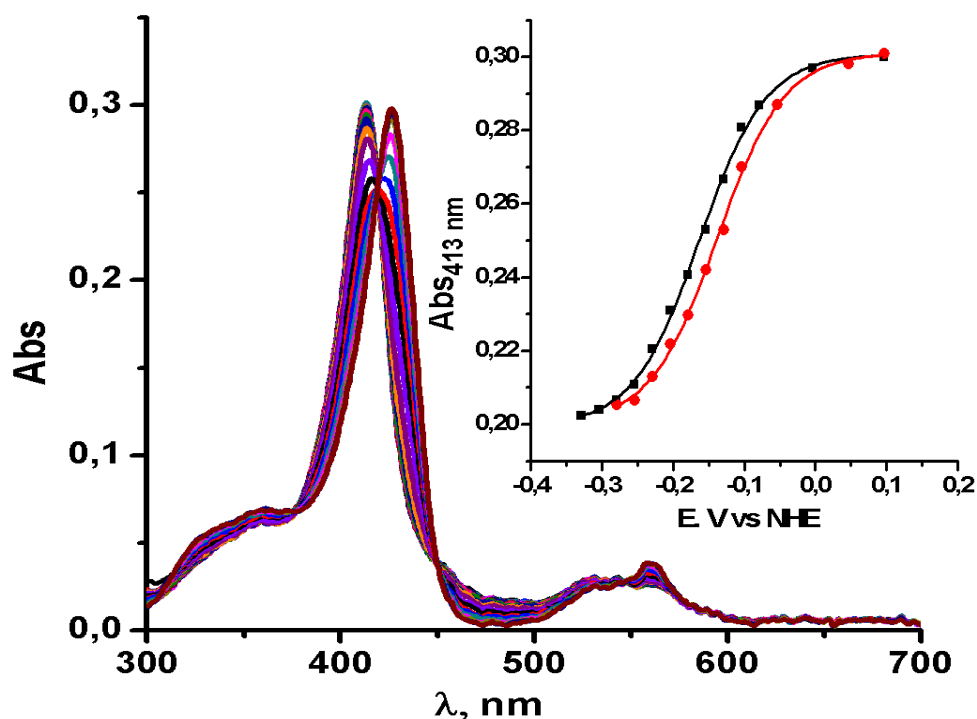
Fonte: O autor.

Empregando-se a lei de Lambert Beer e a Equação de Nernst, foi possível calcular o potencial redox da proteína nessas condições, $E_m = +11\text{mV} \pm 1\text{ mV vs EPH}$. Foi observado, todavia, uma histerese significativa com diferença de 89 mV, já que o potencial de redução ($E_{\text{red}} = -10\text{ mV}$) e ($E_{\text{ox}} = +79\text{ mV vs EPH}$), conforme ilustrado na Figura 8 (*inset*).

Comparativamente à proteína *BjFixL* (+67 mV) que apresenta um estado pentacoordenado (BALLAND, 2006), o valor de E_m da proteína DevS, +11 mV (contendo uma molécula de água na sexta posição), é bem menos positivo. Na proteína FixL, todavia, o grupo heme está inserido em um domínio PAS, enquanto na DevS, ele está em um domínio GAF, podendo este ser o fator primordial para a diferença de potencial entre ambas. Comparando proteínas que apresentam o mesmo tipo de domínio como, por exemplo, as proteínas DevS e All4978 que possuem o domínio GAF, observa-se uma grande diferença nos valores de potencial redox: +11 e - 449 mV para DevS e All4978 (TANG et al., 2015), respectivamente. Comparando-se, ainda, a proteína DevS com a proteína *ReFixL* ($E_m = +19$ mV; HONORIO-FELÍCIO et al., 2016), percebe-se que o valor de potencial é bem mais próximo, apesar de ambas apresentarem domínios significativamente diferentes; GAF para DevS e PAS para *ReFixL*. Parece evidente, portanto, que não é apenas o tipo de domínio que determina o valor do potencial redox da proteína, mas, possivelmente, uma combinação de fatores, podendo-se citar: o efeito direto ocasionado pelos ligantes, o enovelamento dos domínios, além das distorções que ocorrem no grupo heme e nas cadeias laterais dos resíduos na posição distal (TANG et al., 2015).

O efeito sobre o potencial redox da ligação do imidazol à proteína DevS foi estudado em condição de saturação (150 mmol L^{-1}) em meio anaeróbico, aplicando-se potencial na faixa de +96 a -329 mV vs EPH em sentido redutivo, seguido da aplicação em sentido inverso. Ao se aplicar, inicialmente, um potencial de + 96 mV vs EPH para que a proteína fosse totalmente oxidada, observou-se a banda *Soret* com máximo em 413 nm indicando que se obteve a forma oxidada (DevS/ Fe^{3+} -imidazol) ligada ao imidazol. O experimento prosseguiu com aplicação de potenciais no sentido negativo levando a obtenção da proteína na forma reduzida ligada ao imidazol (DevS/ Fe^{2+} -imidazol). Isso foi constatado pelo desaparecimento da banda *Soret* em 413 nm e o surgimento de uma nova banda em 427 nm, além das bandas alfa e beta, 531 e 560 nm, respectivamente, com perfis típicos de hemeproteínas bis-imidazólicas (MOLITOR et al., 2013), conforme ilustrado na Figura 9.

Figura 9 – Espectros da Proteína DevS obtidos na titulação espectroeletróquímica nos sentidos redutivo e oxidativo de uma solução tampão tris 35 mmol L⁻¹ / NaCl 100 mmol L⁻¹ (pH 8) contendo proteína DevS 30 μmol L⁻¹, imidazol 150 mmol L⁻¹ e os mediadores C a G (25 μmol L⁻¹). *Inset*: perfil da absorvância (em 413 nm) *versus* potencial aplicado para a proteína durante as titulações redutiva (■) e oxidativa (●).



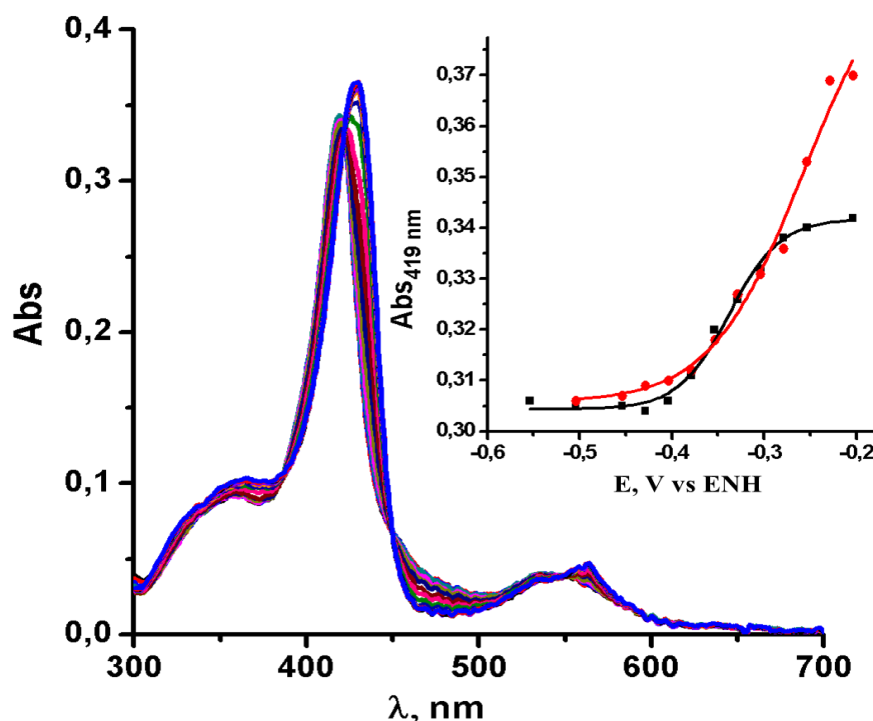
Fonte: O autor.

O potencial calculado para a proteína DevS ligada ao imidazol foi bem mais negativo do que na ausência de ligantes, $E_m = -147$ mV vs EPH, o que corresponde a um deslocamento superior a 150 mV devido a coordenação. Esperava-se um deslocamento positivo de potencial redox da proteína, caso fosse levado em consideração apenas o tipo de ligante, ou seja, a molécula de imidazol, por ser classificada como um ligante de campo forte, comparativamente à água, induziria uma maior estabilização do centro metálico no estado reduzido. A observação de deslocamento negativo, entretanto, reforça a ideia de que fatores conformacionais, dentre outros, podem influenciar o processo redox da proteína, tal como já reportado na literatura para as proteínas *ReFixL* (HONORIO-FELÍCIO et al., 2016), microperoxidase-8 (MARQUES; CUKROWSKI; VASHI, 2000a), hemoglobina (KRAUS; WITTENBERG, 1990) e citocromo c (CAI; TIMKOVICH, 1992) quando ligadas a imidazol. Adicionalmente, o deslocamento negativo de potencial é consistente com a coordenação

preferencial do ligante imidazol à proteína no estado oxidado, o que é tipicamente observado para hemoproteínas. Assim, o grupo imidazólico funcionaria essencialmente como doador sigma estabilizando estados de oxidação mais elevados. Como observado no *inset* da Figura 9, constatou-se uma pequena histerese com diferença de 23 mV, já que os valores de E_{red} e E_{ox} foram calculados em -162 e -139 mV *vs* EPH, respectivamente.

Em outro experimento, realizou-se medidas espectroeletróquímicas da proteína DevS na presença de cianeto (CN^-); outro ligante que, de acordo com a literatura (HONORIO-FELÍCIO et al., 2016; MARQUES; CUKROWSKI; VASHI, 2000b), se liga essencialmente na forma férrica de hemoproteínas. Foi utilizado neste experimento uma solução de pH diferente (9,5), a fim de minimizar a protonação do cianeto ($pK_a = 9,2$) e sua diminuição de concentração por evaporação devido à volatilidade da espécie formada, HCN. Iniciou-se a aplicação de potencial em -204 mV *vs* EPH, sendo toda a proteína levada a sua forma cianomet ($DevS/Fe^{3+}-CN^-$), como evidenciado pela banda *Soret* em 419 nm. Ao se aplicar potencial ainda mais negativo, foi possível observar que uma parte da proteína perdia o ligante assumindo características da forma reduzida deoxi ($DevS/Fe^{2+}$), até que toda a titulação redutiva se completasse. Somente no potencial de -554 mV *vs* EPH foi possível manter toda a proteína DevS na forma reduzida, como evidenciado pelo deslocamento da banda *Soret* de 419 para 429 nm, Figura 10, consistente com a forma reduzida da DevS sem ligantes na sexta posição de coordenação. Só então, foi iniciada a titulação oxidativa com aplicação de potencial de -504 a -204 mV, observando-se o deslocamento da banda *Soret* de 429 para 419 nm que indica a forma oxidada ligada ao cianeto, Figura 10. O potencial redox da proteína DevS ligada ao cianeto foi o mais negativo dentre os ligantes, $E_m = -327$ mV *vs* EPH. Constatou-se, nesse experimento, uma forte histerese com diferença de 80 mV, já que os valores de E_{red} e E_{ox} foram calculados em -338 e -258 mV *vs* EPH, respectivamente, podendo ser visualizado no *inset* da Figura 10.

Figura 10 – Espectros da Proteína DevS obtidos na titulação espectroeletróquímica nos sentidos redutivo e oxidativo de uma solução tampão tris 35 mmol L⁻¹ / NaCl 100 mmol L⁻¹ (pH 9,5) contendo proteína DevS 30 μmol L⁻¹, KCN 4 mmol L⁻¹ e os mediadores A a D (25 μmol L⁻¹). *Inset*: perfil da absorvância (em 419 nm) *versus* potencial aplicado para a proteína durante as titulações redutiva (■) e oxidativa (●).



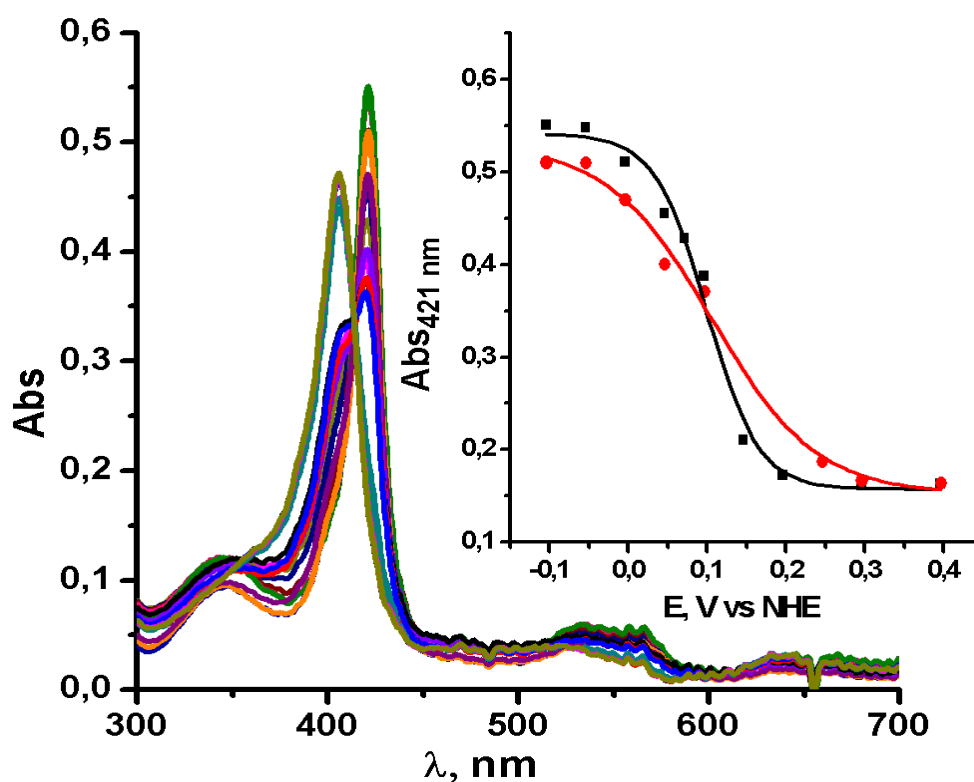
Fonte: O autor.

Honório *et al.* (HONORIO-FELÍCIO *et al.*, 2016), ao estudar a hemoproteína sensora *ReFixL*, determinou os valores de potencial redox de +19, -57 e -156 mV *vs* EPH na ausência de ligantes, ligada a imidazol e cianeto, respectivamente. Tendência semelhante foi observada para a proteína DevS, isto é, deslocamento negativo de potencial com respeito a forma reduzida não ligada (+11 mV) para -147 e -327 mV, quando ligada a imidazol e cianeto, respectivamente. Curiosamente, para a proteína DevS observou-se um deslocamento de potencial ainda maior, comparativamente à proteína *ReFixL*, sendo que a ligação ao cianeto resultou em uma diferença de 340 mV.

Com o objetivo de determinar o potencial redox da proteína DevS contendo ligante que promova a forma ativa, realizou-se a titulação espectroeletróquímica desta proteína em uma solução tampão saturada de CO. Inicialmente, aplicou-se um potencial de -104 mV *vs* EPH por cerca de 30 minutos obtendo, desta maneira, a proteína em sua forma totalmente reduzida e ligada a CO (DevS/Fe²⁺-CO), cuja banda *Soret* encontra-se em 421 nm, Figura 11. Em seguida,

realizou-se a titulação no sentido oxidativo aplicando potencial de - 104 a +396 mV vs EPH com incrementos de potencial de 50 e 100 mV. Após a obtenção da forma met-DevS ($\text{DevS}/\text{Fe}^{3+} - \text{H}_2\text{O}$), constatada pelo deslocamento da banda *Soret* para 406 nm, foi iniciada a titulação no sentido redutivo, utilizando os mesmos incrementos de potenciais da titulação oxidativa. A Figura 11 apresenta os espectros das titulações redutiva e oxidativa da proteína DevS na presença de CO e seu *inset* exhibe o perfil de absorbância vs potencial aplicado em ambas as titulações.

Figura 11 – Espectros da Proteína DevS obtidos na titulação espectroeletróquímica nos sentidos redutivo e oxidativo de uma solução tampão tris 35 mmol L⁻¹ / NaCl 100 mmol L⁻¹ (pH 8) contendo proteína DevS 30 μmol L⁻¹ em solução saturada de CO (0,93 mmol L⁻¹) e os mediadores D a G (25 μmol L⁻¹). *Inset*: perfil da absorbância (em 421 nm) versus potencial aplicado para a proteína durante as titulações redutiva (■) e oxidativa (●).



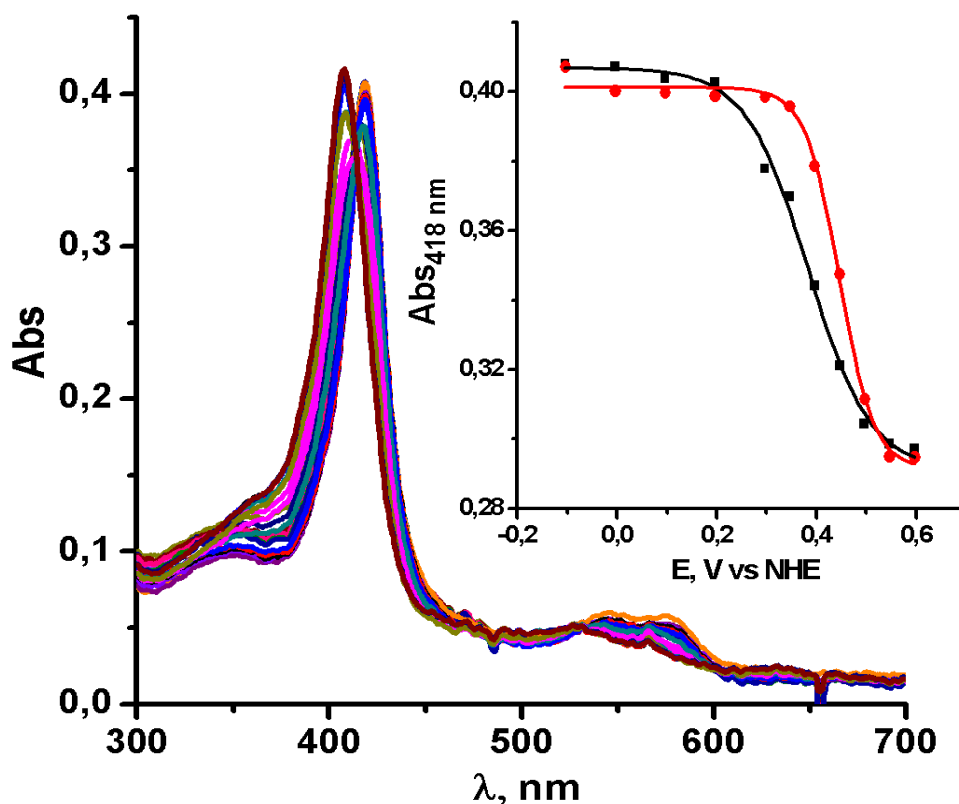
Fonte: O autor.

Os dados de titulação espectroeletróquímica foram tratados como descrito na Equação 8 e resultaram em um potencial redox de +96 mV, ou seja, houve um aumento de 85 mV se comparada com o potencial obtido da DevS na ausência de ligantes. O sistema

praticamente não apresentou histerese, com diferença de 6 mV entre os potenciais, $E_{\text{red}} = 98$ mV vs $E_{\text{ox}} = 104$ mV. O potencial elevado, no entanto, é consistente com a forte característica π -receptora do ligante CO, o qual participa de maneira eficiente em interações de retro-doação. Curiosamente, esse comportamento foi bastante diferente daquele reportado para a proteína *ReFixL*, em que o potencial calculado para a forma *ReFixL*-CO não apresentou variação significativa em comparação com a proteína não ligada (19 e 21 mV para *ReFixL* e *ReFixL*-CO, respectivamente) (HONORIO-FELÍCIO et al., 2016). A grande diferença de potencial observada entre as proteínas DevS e FixL deve-se, provavelmente, aos diferentes efeitos dominantes em ambos os sistemas. Para a proteína DevS, os efeitos eletrônicos dos ligantes (tipo de ligação química) parecem dominar a tendência dos potenciais redox calculados. Já para a proteína *ReFixL*, os efeitos conformacionais prevalecem sobre as interações químicas. Adicionalmente, a maior afinidade da proteína DevS por CO, comparativamente à proteína *ReFixL*, pode, também, justificar as observações experimentais comentadas acima (*DevS*-CO $K_d = 36$ nmol L⁻¹) (SOUSA; TUCKERMAN; GONZALEZ, 2007); *ReFixL*-CO, $K_d = 8$ μ mol L⁻¹; (SOUSA et al., 2013).

Por saber que o *Mycobacterium tuberculosis* pode sobreviver a exposição ao gás NO, condição esta que ocorreria dentro do hospedeiro, macrófago. Foram realizadas medidas espectroeletróquímicas da proteína DevS na presença de óxido nítrico (NO). De acordo com a literatura, a proteína mantém a atividade quinase ao se ligar a NO em sua forma reduzida (*DevS*/Fe²⁺-NO), mas se torna inativa ao se ligar a NO no estado oxidado (*DevS*/Fe³⁺-NO) (YUKL et al., 2011). Foi utilizado o composto (NONOate) como fonte de NO a fim de manter um nível de NO em excesso durante o tempo de medida, evitando a necessidade de grandes adições de NO gasoso, cuja produção e emprego nesses experimentos seria bem mais laboroso. Aplicou-se um potencial inicial de -96 mV vs EPH para reduzir totalmente a proteína e permitindo, assim, sua ligação a NO, como evidenciado pela banda Soret em 418 nm. A partir deste valor de potencial, iniciou-se a titulação oxidativa, utilizando uma faixa de potencial de -96 a 596 mV, com incrementos de potencial de 50 e 100 mV. No potencial de 596 mV, foi possível manter toda a proteína em seu estado oxidado ligado ao NO, como evidenciado pelo deslocamento da banda Soret de 418 para 408 nm. Em seguida, a titulação prosseguiu no sentido redutivo utilizando a mesma faixa de potencial da titulação oxidativa. Foi observado o deslocamento da banda Soret de 408 para 418 nm, indicando a reversibilidade dos processos que estão representados na Figura 12, juntamente com perfil de absorvância vs potencial (*inset*).

Figura 12 – Espectros da Proteína DevS obtidos na titulação espectroeletróquímica nos sentidos redutivo e oxidativo de uma solução tampão tris 35 mmol L⁻¹ / NaCl 100 mmol L⁻¹ (pH 8) contendo proteína DevS 25 μmol L⁻¹, em solução aquosa de DEANONOate (500 μmol L⁻¹) e os mediadores D a G (20 μmol L⁻¹). *Inset*: perfil da absorbância (em 418 nm) *versus* potencial aplicado para a proteína durante as titulações redutiva (■) e oxidativa (●).



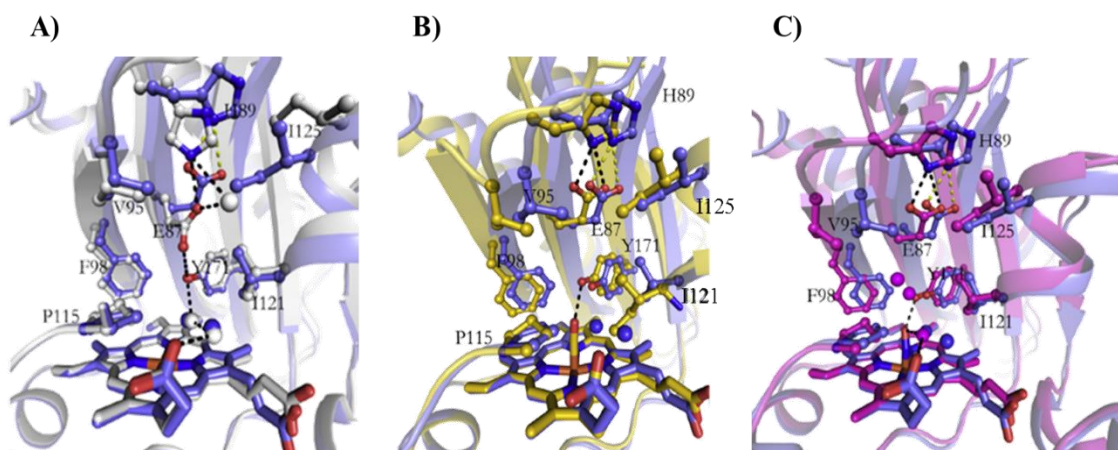
Fonte: O autor.

O potencial redox da proteína DevS ligada ao NO foi o mais positivo entre todos os experimentos realizados, $E_m = 392 \text{ mV vs EPH}$. Constatou-se uma histerese significativa com diferença de 62 mV, já que os potenciais de redução e oxidação foram medidos em 364 e 426 mV vs EPH, conforme ilustrado no *inset* da Figura 12.

Como foi relatado, a proteína DevS mantém-se ativa, ou seja, experimenta autofosforilação e subsequentemente transfere o grupo fosforil para a proteína DevR quando encontra-se nas formas Fe^{2+} , $\text{Fe}^{2+}\text{---CO}$ e $\text{Fe}^{2+}\text{---NO}$, enquanto é inativa nas formas Fe^{3+} e $\text{Fe}^{2+}\text{---O}_2$. A partir de estruturas cristalográficas da proteína DevS (MADRONA et al., 2016), sugere-se que o domínio GAF, que contém o grupo heme, está em equilíbrio dinâmico entre os estados ativos e inativos. Acredita-se que um dos fatores para este comportamento está relacionado com o aminoácido glutamato 87 (E87) localizado próximo à cavidade do grupo

heme. Considera-se que este aminoácido atua como um modulador do equilíbrio influenciando a atividade catalítica, dependendo da molécula que está ligada ao átomo de ferro do grupo heme (MADRONA et al., 2016), como apresentado na Figura 13.

Figura 13 – Mudança na posição do glutamato nas formas ativa e inativa da proteína DevS. A) Sobreposição das formas Fe^{3+} (cinza) e Fe^{2+} (azul); B) Sobreposição das formas Fe^{2+} —CO (amarela) e Fe^{2+} (azul) e C) Sobreposição das formas Fe^{2+} —NO (rosa) e Fe^{2+} (azul).



Fonte: Referência (MADRONA et al., 2016).

Vale ressaltar, ainda, que o resíduo tirosina 171 está inserido em uma rede de ligação de hidrogênio que se forma a partir de uma molécula de H_2O ligada a proteína DevS oxidada na superfície do domínio GAF através de interações com os resíduos glutamato 87 e histidina 89 (MADRONA et al., 2016). Quando a proteína é reduzida, essa rede de ligação de hidrogênio é desfeita, como representada na Figura 13. Assim, a proteína passa de um estado inativo (Fe^{3+} — H_2O) para um estado ativo (Fe^{2+} , Fe^{2+} —CO e Fe^{2+} —NO). Para a proteína *ReFixL*, foi observada uma relação entre o potencial redox e sua atividade quinase, sendo que a mesma apresenta potenciais positivos em suas formas ativas e potenciais negativos em suas formas inativas (HONORIO-FELÍCIO et al., 2016). A proteína DevS, por sua vez, apresenta um comportamento eletroquímico dependente apenas da natureza dos ligantes, sendo consistente com o tipo de interação química e independente do efeito de ativação ou inativação que estes possam induzir. Esse fenômeno, todavia, deve ser analisado com cuidado, pois o único ligante que deve ter um papel diferencial é o oxigênio, uma vez que todos os outros somente mantêm a atividade enzimática do estado ao qual se ligam. A esclarecer, os ligantes que interagem com a forma férrica, que já é inativa, vão continuar se mostrando inativos, tal como

CN⁻, NO e, possivelmente, imidazol. Aqueles que se ligam à forma ferrosa, que é ativa, mantem essa atividade tal como CO e NO. Dessa forma, somente oxigênio molecular é, efetivamente, a espécie que altera o padrão de atividade da proteína, uma vez que se liga a forma ferrosa, ativa, provocando sua inativação. Assim, o efeito eletrônico esperado para o oxigênio, que se liga somente na forma ferrosa, seria de estabilizar este estado promovendo retro-doação e, conseqüentemente, aumentando o potencial redox, Tabela 6. No caso da FixL, essa expectativa não foi confirmada e, na verdade, houve deslocamento pra regiões negativas, seguindo a tendência dos estados inativos.

Tabela 6 – Potenciais do ponto médio (E_m) calculados para a proteína DevS na presença de diferentes ligantes.

DevS	Potencial Redox (E_m), mV vs EPH
CN ⁻	- 327
Imidazol	- 147
H ₂ O	+ 11
O ₂	entre 10 e 195
CO	+ 96
NO	+ 392

Fonte: O autor.

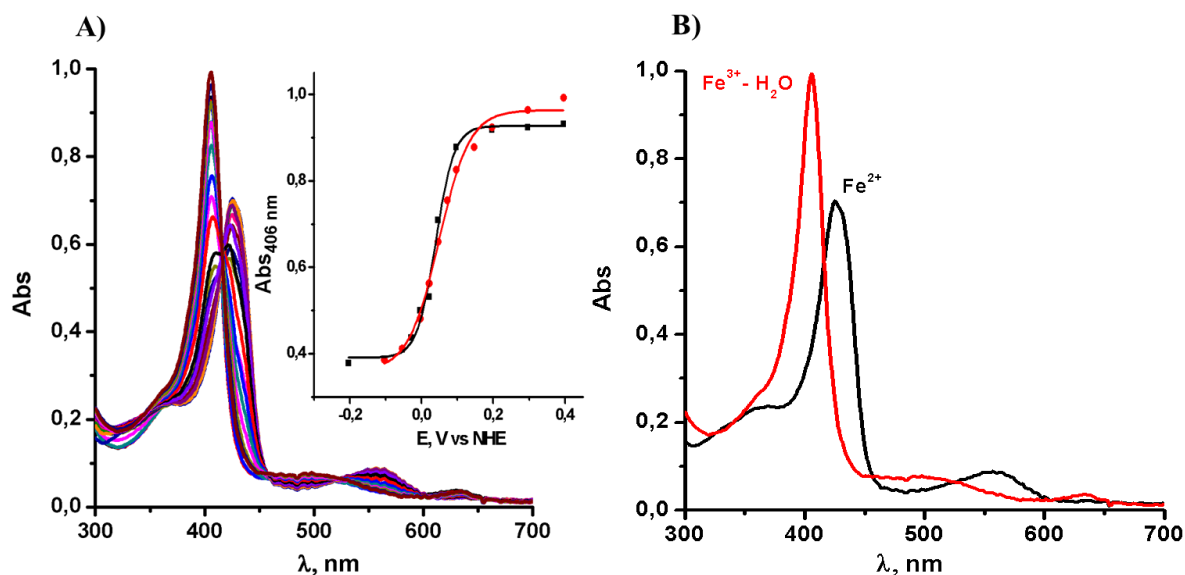
4.2.2 Efeito da Força Iônica

A concentração salina no meio onde se encontram as moléculas de uma dada proteína pode contribuir para uma atração ou repulsão entre as mesmas, bem como de suas subunidades, provavelmente devido a variação na distribuição de cargas superficiais (DUMETZ, A.C.; BRIEN, A.M.S.; KALER; LENHOFF, 2007).

Neste trabalho, foi estudado o efeito da concentração salina sobre o potencial redox da proteína DevS na ausência de ligantes. Inicialmente, realizou-se a titulação espectroeletróquímica em solução contendo NaCl 100 mmol L⁻¹, espectros estes já apresentados na Figura 8.

As medidas espectroeletróquímicas obtidas para a proteína DevS em solução contendo NaCl 200 mmol L⁻¹ foram realizadas na faixa de potencial de +396 a -204 mV, iniciando em +396 mV no sentido redutivo. A banda observada em 406 nm no início da titulação indica a forma oxidada da proteína (DevS/Fe³⁺-H₂O). Conforme ilustrado na Figura 14, à medida em que potenciais mais negativos eram aplicados, observou-se a diminuição de intensidade desta banda e o surgimento da banda com máximo em 429 nm, característica da proteína na forma reduzida (DevS/Fe²⁺). A reversibilidade do sistema foi constatada com o desaparecimento da banda em 429 nm e o surgimento da banda em 406 nm, ou seja, a forma oxidada foi recuperada em +396 mV após completa redução da proteína em -204 mV. O potencial calculado para a proteína DevS nessas condições, E_m = + 45 mV, foi mais positivo, comparativamente aquele calculado em solução 100 mmol L⁻¹ de NaCl, E_m = + 11 mV. Adicionalmente, nesta condição não foi observada ocorrência significativa de histerese, como se pode verificar no *inset* da Figura 14A. A diferença de potencial da espécie oxidada nas titulações redutiva e oxidativa é de apenas 9 mV, com valores de E_{red} e E_{ox} calculados em +38 e +47 mV, respectivamente.

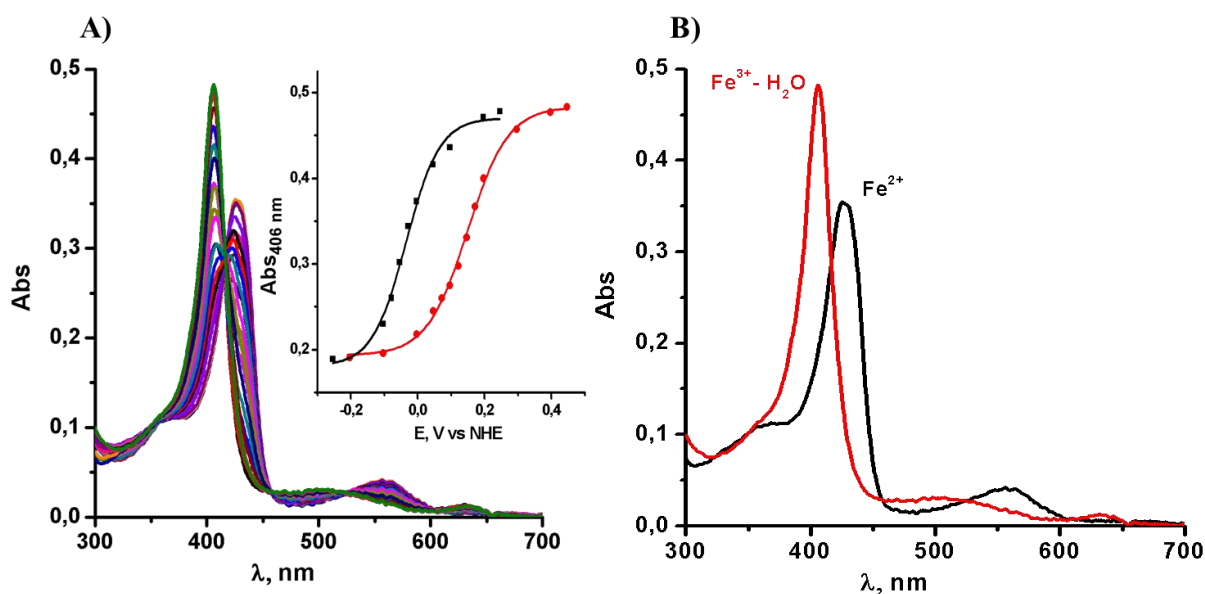
Figura 14 – A) Espectros da Proteína DevS obtidos na titulação espectroeletróquímica nos sentidos redutivo e oxidativo de uma solução tampão tris 35 mmol L⁻¹ / NaCl 200 mmol L⁻¹ (pH 8) contendo proteína DevS 30 μmol L⁻¹ e os mediadores C a G (25 μmol L⁻¹). *Inset*: perfil da absorbância (em 406 nm) *versus* potencial aplicado para a proteína durante as titulações redutiva (■) e oxidativa (●). B) Espectros de absorção eletrônica nas regiões do UV-Vis da proteína DevS totalmente oxidada (vermelho) e totalmente reduzida (preto).



Fonte: O autor.

A titulação espectroeletróquímica em solução tampão contendo NaCl 500 mmol L⁻¹ se deu de forma semelhante a anterior, sendo que foi iniciada em +446 mV onde a proteína encontrava-se na forma totalmente oxidada, como pode ser visto através da banda Soret em 406 nm na Figura 15. A finalização da titulação deu-se em -254 mV, após aplicações sucessivas de potencial no sentido redutivo, sendo que o equilíbrio aparente entre as espécies (DevS/Fe³⁺-H₂O) e (DevS/Fe²⁺) foi atingido em cada potencial aplicado. A obtenção da forma reduzida da proteína foi constatada com o surgimento da banda em 429 nm.

Figura 15 – A) Espectros da Proteína DevS obtidos na titulação espectroeletróquímica nos sentidos redutivo e oxidativo de uma solução tampão tris 35 mmol L⁻¹ / NaCl 500 mmol L⁻¹ (pH 8) contendo proteína DevS 30 μmol L⁻¹ e os mediadores C a G (25 μmol L⁻¹). *Inset*: perfil da absorvância (em 406 nm) *versus* potencial aplicado para a proteína durante as titulações redutiva (■) e oxidativa (●). B) Espectros de absorção eletrônica nas regiões do UV-Vis da proteína DevS totalmente oxidada (vermelho) e totalmente reduzida (preto).

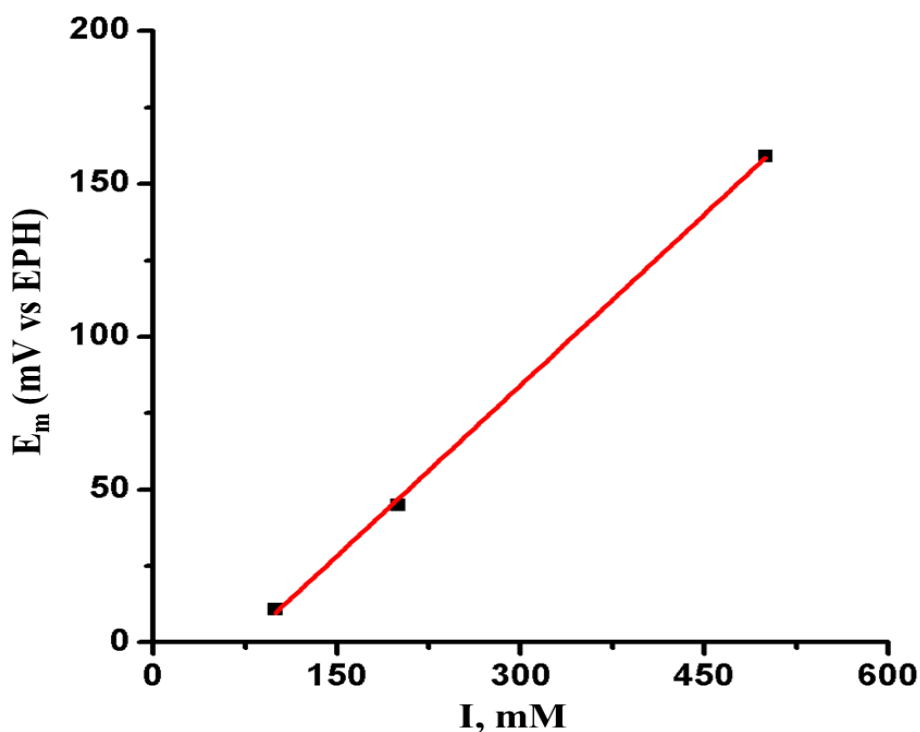


Fonte: O autor.

O potencial redox calculado para a proteína DevS nessas condições, foi de +159. Neste experimento foi observado uma histerese significativa, como ilustrado no *inset* da Figura 15. A diferença de potencial entre as titulações redutiva e oxidativa foi de 187 mV, com valores de E_{red} e E_{ox} calculados em -38 e +150 mV, respectivamente. As diferentes concentrações de NaCl foram transformadas para força iônica através da Equação 16, desta forma percebeu-se

que o aumento da força iônica induz um deslocamento positivo do potencial redox da proteína DevS, podendo ser observado através da Figura 16. Os valores passaram de +11 para +45 e +159 mV, quando a força iônica passou de 100 para 200 e 500 mmol L⁻¹, respectivamente.

Figura 16 – Gráfico de E_m vs Força Iônica (I) mostrando a dependência do potencial do ponto médio com a salinidade do meio.



Fonte: O autor.

A estabilidade das proteínas é, geralmente, afetada por sais. Variações nas concentrações de NaCl, por exemplo, afetam sua estabilidade por modificar a força iônica da solução, resultando em fortes interações coulombianas na superfície das proteínas (DOMINY, B.N.; PERL, D.; SCHMID, F.X.; BROOKS, 2002). Comportamento semelhante foi observado para a hemoproteína citocromo c-552, ou seja, deslocamento positivo de potencial com o aumento da força iônica do meio, há um aumento em seu potencial redox, resultados obtidos em pH superior ao ponto isoelétrico da proteína (GOLDKORN; SCHEJTER, 1976). Para a proteína estreptavidina, foi relatado um deslocamento positivo de potencial com o aumento da força iônica em soluções cujos valores de pH encontram-se acima do ponto isoelétrico (pI) da proteína. Quando $\text{pH} < \text{pI}$, os autores observaram uma inversão na tendência, ou seja, um deslocamento negativo de potencial com o aumento da concentração salina (AZZARONI, O.;

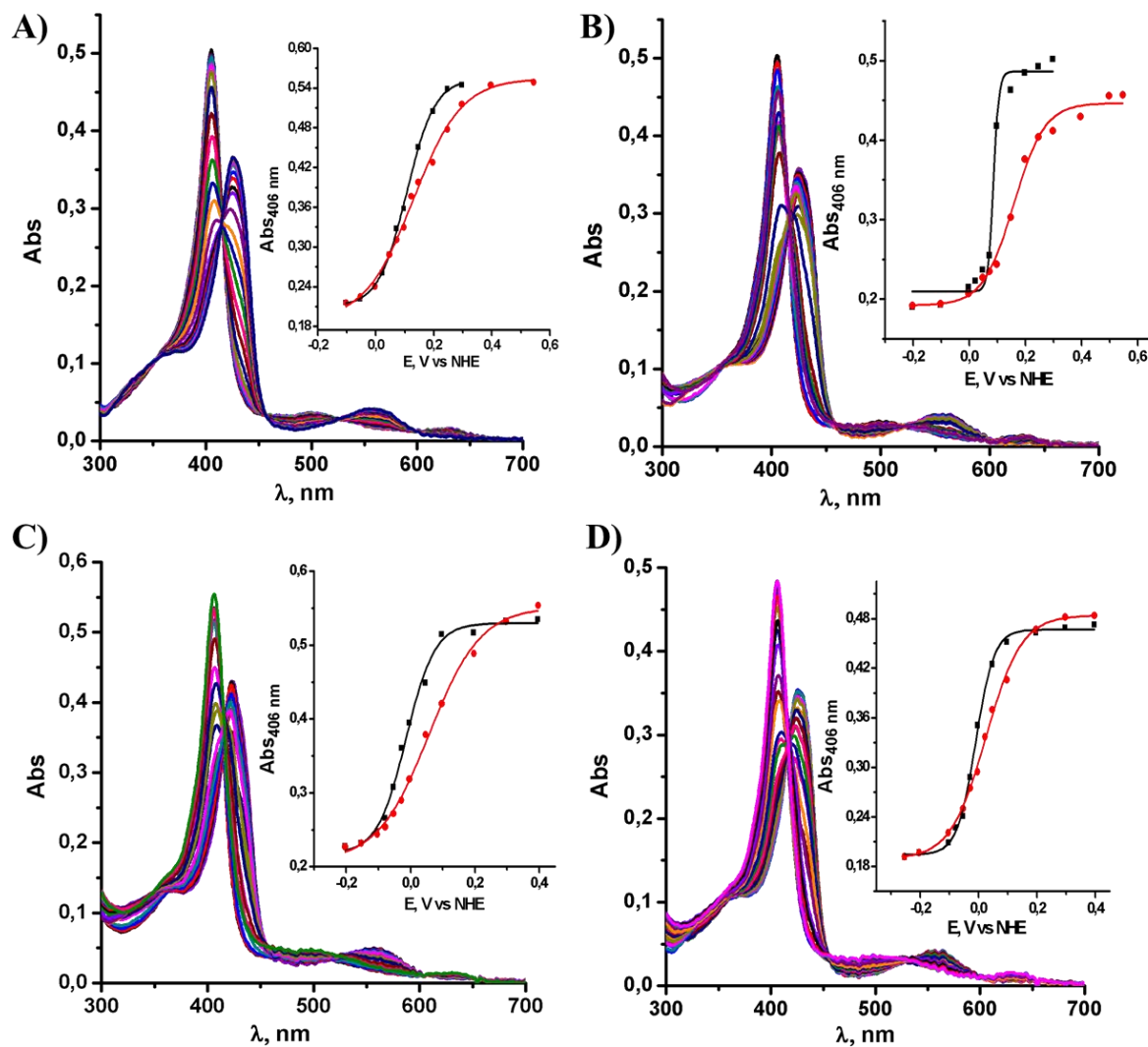
YAMEEN, B.; KNOLL, 2008). No caso da proteína DevS, em solução de pH 8, houve um deslocamento positivo de potencial com a elevação da força iônica. Sabendo que o valor de pI da proteína DevS é de 4,91, ou seja, menor que o pH do meio, esse resultado é consistente com os dados relatados na literatura para sistemas similares (AZZARONI, O.; YAMEEN, B.; KNOLL, 2008).

4.2.3 Efeito do pH

Realizou-se um estudo complementar com o intuito de avaliar a dependência do potencial redox da proteína DevS na ausência de ligantes com o pH do meio, variando-se de 6 a 10. Tentativas foram realizadas, também, em solução de pH 5, mas não foram bem-sucedidas. A proteína experimenta desnaturação, provavelmente por este valor ser próximo ao seu ponto isoelétrico (4,91). O papel do pH do meio na estabilidade de proteínas é bastante evidente, devido ao efeito causado sobre a protonação de aminoácidos carregados, nos grupos carboxilato e amino terminais e na superfície (DUMETZ et al., 2008).

Nos experimentos realizados em soluções de diferentes pH, seguiu-se o seguinte procedimento: aplicação inicial de potencial para oxidar totalmente a proteína, (DevS/Fe^{III} – H₂O), cerca de 346 mV, sendo o estado oxidado evidenciado pela banda Soret em 406 nm. Logo em seguida, a titulação espectroeletróquímica redutiva era iniciada, variando-se o potencial da região positiva para negativa até – 204 mV, onde a forma totalmente reduzida (DevS/Fe^{II}) era evidenciada através da observação da banda Soret em 429 nm. Posteriormente, era iniciada a titulação oxidativa, cobrindo a mesma faixa de potencial, porém em sentido inverso. O deslocamento da banda Soret de 429 para 406 nm indicou a a forma oxidada da proteína ligada a molécula de água, representada na Figura 17.

Figura 17 – Espectros da Proteína DevS obtidos na titulação espectroeletróquímica nos sentidos redutivo e oxidativo de uma solução tampão tris 35 mmol L⁻¹ / NaCl 100 mmol L⁻¹ contendo proteína DevS 30 μmol L⁻¹ e os mediadores C a G (25 μmol L⁻¹) em pH: A) 6; B) 7; C) 9 e D) 10. *Inset*: perfil da absorvância (em 406 nm) *versus* potencial aplicado para a proteína durante as titulações redutiva (■) e oxidativa (●).

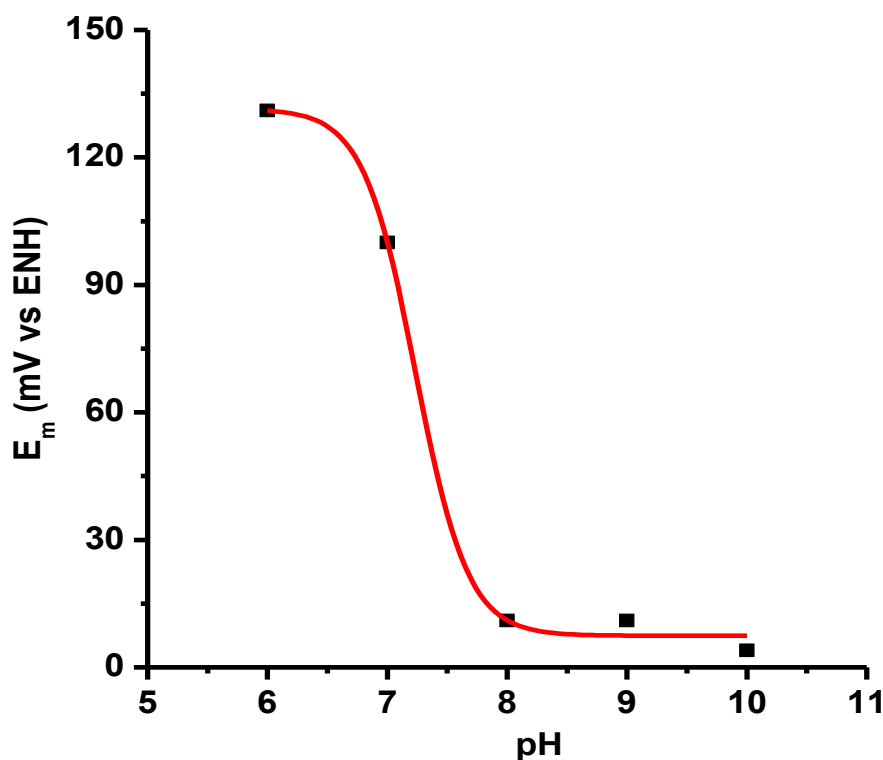


Fonte: O autor.

Para as soluções de pH 6 e 7, os potenciais foram calculados em 131 e 100 mV respectivamente. Comparando esses valores com aquele calculado em solução de pH 8 (+11 mV), Figura 8, percebe-se um deslocamento positivo considerável nos valores de potencial. Acima de pH 8, todavia, os valores de potencial não apresentam variação significativa: +11 e +4 mV em soluções de pH 9 e 10, respectivamente.

Os resíduos aminoácidos em proteínas podem exibir valores de pKa bastante distintos se comparados aos aminoácidos livres devido ao microambiente bastante variável criado pelas proteínas (HARMS et al., 2009). A cadeia lateral da lisina, por exemplo, pode ter uma redução do valor de pKa em mais de 5 unidades de pH, dependendo do microambiente em que ela se encontra (ISOM et al., 2011). De fato, a literatura relata uma tendência de mudança de pKa uma vez que os resíduos são encontrados em microambientes menos polares ou polarizáveis. Assim, quando no microambiente de uma proteína, aminoácidos que contêm grupos ácidos e básicos apresentam variações crescentes e decrescentes de valores de pKa, respectivamente, comparativamente às suas formas livres. (HARMS et al., 2009) (ISOM et al., 2011). Essas variações de pKa permitem que os grupos ácido-base permaneçam ainda neutros nesses microambientes. Além disso, as hemoproteínas hospedam um importante grupo extra ácido-base: os propionatos da porfirina do grupo heme. Estes grupos propionatos também apresentam uma vasta gama de valores de pKa, podendo variar de 8,6 para 3,0 (CAI; TIMKOVICH, 1992)(KRAUS; WITTENBERG, 1990). A proteína DevS tem seu grupo heme inserido em uma região bastante hidrofóbica e encontra-se voltado para a posição proximal Ile-103, Ile-111, Phe-145, Pro-146 e Met-152. Na sua posição distal, encontram-se os resíduos Ala-85, Phe-98, Ile-121, Leu-114, Pro-115, Phe-155 e Tyr-171. Com respeito, particularmente aos fragmentos propionatos do grupo heme, um deles participa da ligação de hidrogênio que envolve a amida da cadeia principal de Lys-116, Gly-117 e Leu-118, enquanto o outro participa da ligação com o fragmento amida da Val-120 e hidroxila da Ser-142 (CHO et al., 2009). O equilíbrio ácido-base de água-hidroxila pode ser desconsiderado nesse estudo, visto que não foram observadas alterações nos espectros eletrônicos da proteína DevS em soluções de pH 6 a 10. Por outro lado, a nítida dependência do potencial com o pH do meio, perfil sigmoidal observado na Figura 18, indica um equilíbrio ácido-base cujo valor de pKa foi calculado em 7,3. Esse equilíbrio, no entanto, parece envolver um fragmento muito próximo ao grupo heme, visto que implica em mudanças nos valores de potencial do átomo de ferro. Na verdade, é bastante provável que este valor de pKa seja devido aos fragmentos propionatos do grupo heme. Valores próximos foram reportados para outras hemoproteínas, podendo-se citar: cyt c-551 (*P. aeruginosa*) (pKa = 7,2) e Mb (*Aplysia*) (pKa = 8,6)(CAI; TIMKOVICH, 1992) (BRUNORI et al., 1968).

Figura 18 – Perfil do potencial de meia onda da proteína DevS *versus* pH do meio.



Fonte: O autor.

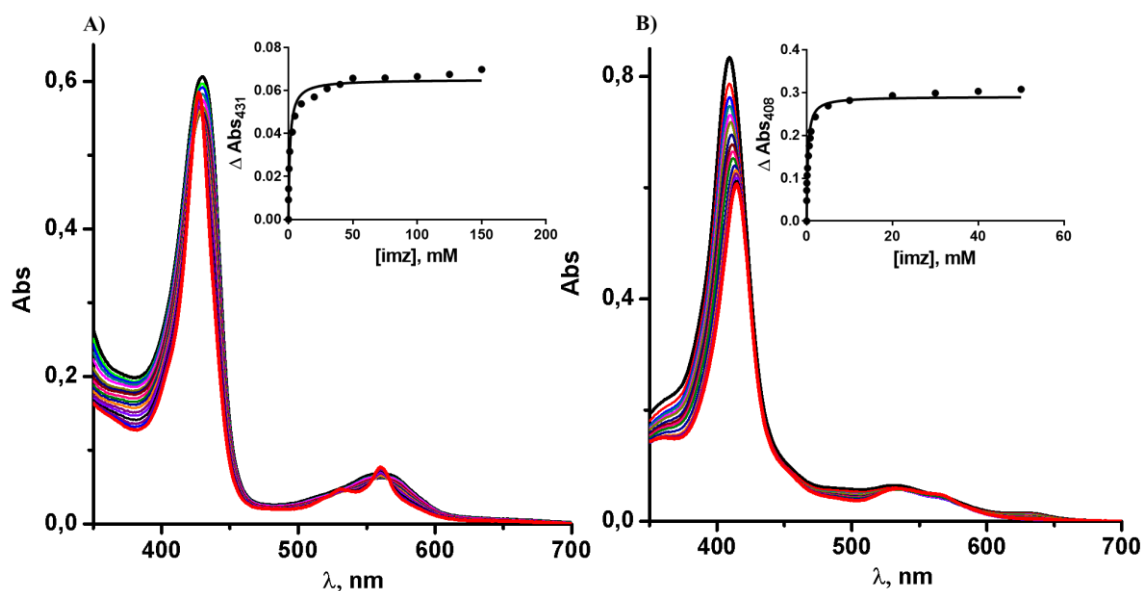
4.3 Afinidade da proteína DevS a Imidazol

Durante a titulação espectroeletroquímica da DevS na presença de imidazol, observou-se que, em condições redutoras, a proteína apresentou um espectro eletrônico com a banda Soret, e as bandas α e β em 426, 530 e 560 nm, respectivamente, visualizada na Figura 9. Esse espectro é bastante distinto daquele obtido para a forma deoxi-DevS (Soret em 429 nm e uma banda Q larga em 558 nm), Figura 8. As bandas α e β apresentaram, ainda, uma inversão de intensidade relativa, sendo a banda α mais intensa que a β , sugerindo o estado ligado mesmo no estado ferroso. Tal comportamento é bastante incomum, sendo raramente descrito para hemoproteínas (MOLITOR et al., 2013). Com o objetivo de validar esse resultado, a titulação com imidazol, Figura 19A, foi realizada usando a proteína no estado deoxi-DevS (FeII) preparada quimicamente dentro de uma câmara anaeróbia. Inicialmente, foi registrado o espectro eletrônico da solução contendo somente a proteína na sua forma deoxi, Soret em 430 nm (curva preta na Figura 19A). Em seguida, foram adicionadas alíquotas de imidazol em concentrações crescentes, de 0,05 a 200 mmol L⁻¹. No limite superior de concentração, observa-se a banda Soret em 427 nm e bandas α e β nas mesmas regiões daquelas observadas durante a

titulação espectroeletróquímica (Figura 9). A partir dos espectros ilustrados na Figura 19A, e usando a Equação 14 (um único sítio de coordenação) a constante termodinâmica de dissociação foi calculada, $K_d = 112 \times 10^{-3} \pm 6$ ($R^2 = 0,97$).

De forma análoga, realizou-se a titulação química da proteína DevS na sua forma oxidada com imidazol. Nesse caso, a forma oxidada da proteína foi obtida utilizando-se hexacianoferrato(III) como agente oxidante, Figura 19B. Similarmente, registrou-se inicialmente o espectro da proteína em sua forma oxidada na ausência de imidazol, banda *Soret* em 406 nm (curva preta na Figura 19B). Posteriormente, iniciou-se a titulação adicionando alíquotas de soluções de imidazol até valores constantes de absorvância. Nesse instante do experimento, a banda *Soret* foi observada em 413 nm com perfil atribuído à hemeoproteínas coordenadas a imidazol na forma férrica. A constante de dissociação foi calculada em $0,300 \times 10^{-3} \pm 0,018$ ($R^2 = 0,98$).

Figura 19 – Espectros da Proteína DevS obtidos nas titulações química da proteína DevS na presença de imidazol em suas formas: A) reduzida e B) oxidada. *Inset*: Curvas de titulações de absorvância em 431 nm (A) e 408 nm (B) vs concentração de imidazol utilizada.



Fonte: O autor.

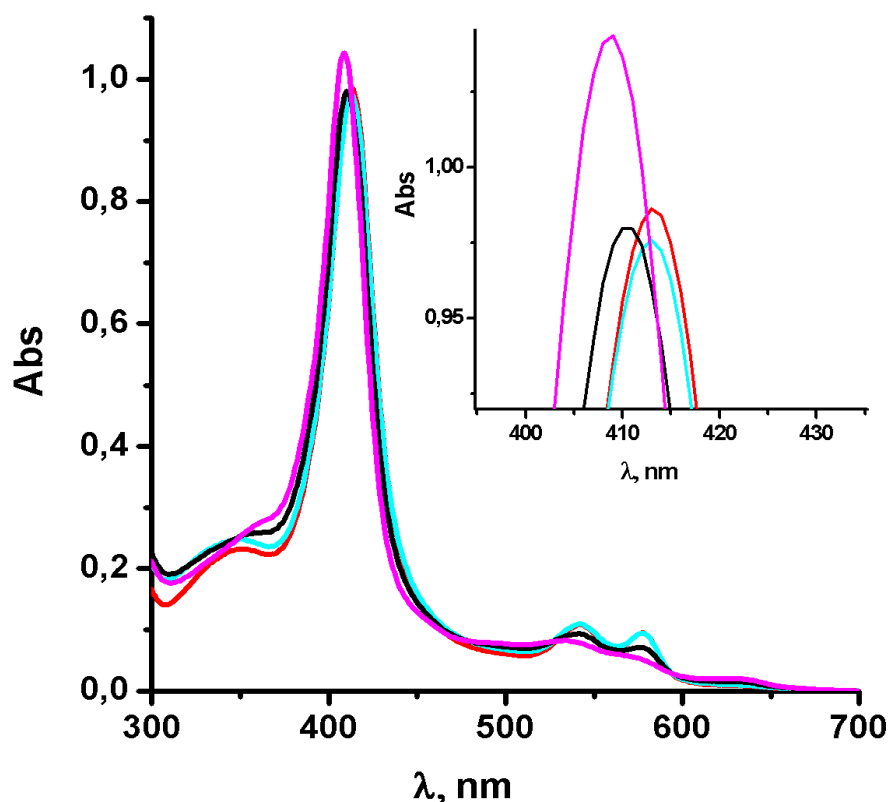
Utilizando os valores de constante de dissociação química nos dois estados de oxidação, é possível estimar o valor do potencial redox da proteína, de acordo com a Equação 15. (BERRY et al., 2007). O valor do E_m calculado obtido pela titulação química para a proteína

DevS ligada a imidazol foi de -143 mV, o que é muito próximo ao valor medido experimentalmente através da titulação espectroeletroquímica ($E_m = -147$ mV).

4.4 DevS na Presença de Oxigênio

As tentativas de medição do potencial eletroquímico da oxi-DevS foram infrutíferas. À medida que eram aplicados potenciais redutivos, os espectros da proteína na forma oxi-DevS passavam a apresentar o perfil típico da forma deoxi-DevS. Sugere-se que esse resultado deve-se à redução eletroquímica do oxigênio molecular durante o processo de titulação redutiva. Dessa forma, foi possível apenas estimar uma faixa de potencial para a proteína oxi-DevS usando, para isso, os mediadores redox que se encontram na forma oxidada. Inicialmente, foram utilizados os seguintes mediadores: $[\text{Co}(\text{CLMEN}_4\text{S}_2\text{sar})]\text{Cl}_3$: -134 mV, $[\text{Co}(\text{NMe}_3)_2\text{sar}]\text{Cl}_5$: 10 mV, $\text{Fe}(\text{NOTA})$: 195 mV e ferrocenometanol: 447 mV (mediadores D a G, respectivamente). Percebeu-se que a proteína permanecia ligada a O_2 e na forma reduzida, mesmo na presença dos mediadores D (-134 mV) e E (+10 mV). Já na presença do mediador F (195 mV), observou-se o início do processo de oxidação. A utilização do mediador G (447 mV) tornou esse processo mais evidente. Assim, um novo experimento foi realizado estreitando a faixa de potencial utilizando-se apenas os mediadores E (+10 mV) e F (195 mV). A proteína na presença do mediador E permaneceu reduzida e ligada a oxigênio molecular ($\text{DevS}/\text{Fe}^{2+} - \text{O}_2$), Figura 20, com banda *Soret* em 413 nm e alfa e betas típicas desta forma. Ressalte-se que a ausência de oxidação indica que o potencial de redução da proteína oxi-DevS deve ser, portanto, maior que o potencial do mediador eletroquímico utilizado, ou seja, superior a 10 mV. Por outro lado, a proteína oxi-DevS na presença do mediador F (195 mV) experimentou oxidação indo à forma met-DevS, conforme indicado pelo deslocamento da banda *Soret* para 409 nm, em conjunto com alteração das bandas Q observadas em 442 e 577 nm, Figura 19. Percebe-se, dessa maneira, que a proteína oxi-DevS na presença do mediador F (195 mV) é completamente oxidada, ou seja, seu potencial redox deve se encontrar abaixo deste valor, possivelmente entre 10 e 195 mV.

Figura 20 – Espectros de absorção eletrônica nas regiões do UV-Vis da proteína DevS na ausência de ligantes (vermelho) e presença dos mediadores: E (10 mV) por 20 min (azul claro), F (195 mV) por 20 min (preto) e durante 1 h (rosa). *Inset*: amplificação dos espectros mencionados.



Fonte: O autor.

Além destas observações, convém mencionar que as células dispõem de ambientes bastante redutores. O potencial redox mitocondrial, por exemplo, fica em torno de -360 mV (HANSON et al., 2004), enquanto o potencial no citosol de eucariotos é de ~ -265 mV (LÓPEZ-MIRABAL; WINTHER, 2008).

O potencial redox da proteína DevS é bastante elevado com relação aqueles reportados nos ambientes intracelulares; $E_m = +10$ mV na ausência de ligantes externos e ~ 195 mV quando ligada a O_2 . Esses valores são consistentes com uma hemoproteína que deve se manter reduzida em meio biológico em sua forma deoxi ($DevS/Fe^{2+}$) ou oxi ($DevS/Fe^{2+} - O_2$), uma vez que o potencial redox do *Mycobacterium tuberculosis* dentro do macrófago ativado apresenta um valor entre -275 e -240 mV (BHASKAR, A.; CHAWLA, M.; MEHTA; PARIKH; KUMAR, 2014). Considerando-se que grandes quantidades de imidazol, CO, ou

mesmo NO, não são consistentes com a condição fisiológica, estas formas servem apenas para estudos bioquímicos e não devem representar condição fisiológica dentro da célula.

A proposta de alguns grupos de que a proteína DevS possa funcionar como sensor redox (KUMAR et al., 2007) é, dessa forma, termodinamicamente insustentável. O mais provável é que essa proteína atue como sensor específico para oxigênio. Na verdade, há poucos exemplos de sistemas de hemeoproteínas sensoras que responderiam ao potencial redox, nesses casos os potenciais destas proteínas se mostram extremamente negativos, como por exemplo das seguintes hemeoproteínas: RrCooA, All4978, GSU935 e GSU582, cujos potenciais redox foram de -290 mV, -449 mV, -251 mV e -156 mV, respectivamente. (NAKAJIMA et al., 2001; TANG et al., 2015; POKKULURI et al., 2008). Ainda assim, mesmo diante de valores elevados de potenciais, há aqueles que sugerem a função de sensor redox, como é o caso da proteína MA4561. A Tabela 7 relaciona algumas hemeoproteínas com seus respectivos potenciais redox e as atribuições como sensor redox ou de oxigênio.

Tabela 7 – Potenciais do ponto médio (E_m em mV vs EPH) para algumas hemeoproteínas.

Hemeoproteínas	E_m , mV vs EPH	Tipo de Sensor	Referência
Heme – GAF			
DevS (full length)	+ 11		
+ CO	+ 96		
+ NO	+ 392	O ₂	Este trabalho
+ CN ⁻	- 327		
+ imidazol	- 147		
MA4561	- 85	Redox	(MOLITOR et al., 2013)
All4978	- 449	Redox	(TANG et al., 2015)
Heme – PAS			
ReFixL	+ 19		
+ CO	+ 21		
+ O ₂	- 51	O ₂	(HONORIO-FELÍCIO et al., 2016)
+ CN ⁻	- 156		
+ imidazol	- 57		
BjFixL	+ 68	O ₂	(BALLAND, 2006)

DosP (EcDOS)	+ 67	O ₂	(SASAKURA et al., 2002)
NPAS2	- 115	CO	(EFIMOV et al., 2014)
CLOCK	- 111	CO	(EFIMOV et al., 2014)
Heme – HNOB			
sGC (<i>Manduca sexta</i>)	+ 234	NO	(FRITZ et al., 2011)
sGC <i>bovine</i>	+ 187	NO	(MAKINO et al., 2011)
Tt H-NOX	+ 167	NO	(OLEA et al., 2008)
Heme – Globin			
DosC (YddV)	- 22	O ₂	(KITANISHI et al., 2010)
Heme – CooA			
Ch-CooA	+ 190	CO	(INAGAKI et al., 2005)
Rr-CooA	- 290	Redox	(NAKAJIMA et al., 2001)
Heme – Citocromo c			
GSU582	- 156	Redox	(POKKULURI et al., 2008)
GSU935	- 251	Redox	(POKKULURI et al., 2008)
Outras Hemeproteínas não Sensoras			
Nitroforina NP1	- 303		
+ NO	+ 127		(DING et al., 1999)
+ imidazol	- 361	–	(BERRY et al., 2004)
+ histamina	- 403		
Mioglobina (cavalo)	+ 46		(KING; HAWKRIDGE;
+ CN ⁻	- 385	–	HOFFMAN, 1992)
Citocromo P450 CYP2C9	- 41		
+ CO	+ 8	–	(JOHNSON et al., 2005)
+ O ₂	+ 9		
Microperoxidase-8	- 139		(MARQUES; CUKROWSKI;
+ CN ⁻	- 176	–	VASHI, 2000)
+ imidazol	- 203		
PSM	- 283		
+ CO	0	–	(COWLEY et al., 2006)

Fonte: O autor.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, ilustramos o emprego da técnica de espectroeletróquímica, sendo possível calcular o potencial redox da proteína DevS em diferentes condições. Estes resultados nos levaram a perceber que há uma dependência do potencial redox da proteína com a natureza das moléculas ligadas ao grupo heme, além de outros fatores, como o enovelamento dos domínios que compõem a proteína, as distorções que ocorrem no grupo heme e nas cadeias laterais dos resíduos nas posições próximas a ele. Aparentemente, não há uma conexão entre o potencial redox da proteína e sua atividade histidina quinase, tal como foi mostrada para a proteína *ReFixL*, uma vez que o ligante chave, oxigênio, que desativa a proteína, não segue mesmo comportamento de outros ligantes que também bloqueiam essa atividade, como cianeto. Na verdade, oxigênio deve provocar um aumento de potencial, encontrando-se na proximidade ao dos ligantes que mantem a atividade enzimática, como CO e NO. A ausência de significativas alterações no microambiente do grupo heme da DevS em condições ativas e inativas, uma diferença marcante com respeito a *FixL*, devem justificar em parte esse comportamento. Adicionalmente, o meio também interfere no potencial redox, como foi observado no estudo da proteína DevS nas diferentes concentrações salinas e pHs.

Em resumo, podemos concluir que há fortes evidências, através desse estudo, que a proteína DevS não se comporta como sensor redox, já que a mesma apresenta um potencial de +11 mV vs EPH na ausência de ligantes. Esse valor é bastante diferente do encontrado no meio celular micobacteriano (~ -270 mV vs EPH), ambiente este que a proteína deve se manter em sua forma reduzida. As proteínas que são consideradas sensores redox, apresentam um potencial bastante negativo e próximos ao potencial citosólico bacteriano de forma a poderem responder a suas pequenas flutuações, o que não é o caso da DevS. Desta forma, o DevS deve ser um sensor direto de oxigênio no *Mycobacterium tuberculosis*, tal como seu sensor ortólogo DosT.

REFERÊNCIAS

- ARMSTRONG, F. A. Probing metalloproteins by voltammetry. **Bioinorganic Chemistry**. Department of Chemistry, University of California, Irvine, California, USA, p. 137–221, 1990.
- AZZARONI, O.; YAMEEN, B.; KNOLL, W. Effect of the electrostatic microenvironment on the observed redox potential of electroactive supramolecular bioconjugates. **Physical Chemistry**. University of Chicago, USA, v. 10, n. 46, p. 7031–7038, 2008.
- BALLAND, V. ET AL. Functional Implications of the Propionate 7 - Arginine 220 Interaction in the FixLH Oxygen Sensor from Bradyrhizobium japonicum. **Biochemistry**. Orsay Cedex, France, v. 45, p. 2072–2084, 2006.
- BARD, A. J. et al. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. University of Texas at Austin, USA, 1944.
- BASUDHAR, D. et al. Distal Hydrogen-Bonding Interactions in Ligand Sensing and Signaling by Mycobacterium tuberculosis DosS. **Journal of Biological Chemistry**. University of California, San Francisco, USA, 2016.
- BERNHARDT, P.V.; CHEN, K. I. .; SHARPE, P. C. Transition metal complexes as mediator-titrants in protein redox potentiometry. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**. University of Queensland, Australia, v. 11, n. 7, p. 930–936, 2006.
- BERRY, R. E. et al. Axial ligand complexes of the Rhodnius nitrophorins: Reduction potentials, binding constants, EPR spectra, and structures of the 4-iodopyrazole and imidazole complexes of NP4. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**. University of Arizona, USA, v. 9, n. 2, p. 135–144, 2004.
- BERRY, R. E. et al. Effect of the N-terminus on heme cavity structure, ligand equilibrium, rate constants, and reduction potentials of nitrophorin 2 from Rhodnius prolixus. **Biochemistry**. University of Arizona, USA, v. 46, n. 23, p. 6830–6843, 2007.
- BERTINI, I.; GRAY, H.B.; STIEFEL, E.I.; VALENTINE, J. S. **Biological Inorganic Chemistry: Structure and Reactivity**. California, USA, 2006.
- BHASKAR, A.; CHAWLA, M.; MEHTA, M. .; PARIKH, P. .; KUMAR, D. et al. Reengineering Redox Sensitive GFP to Measure Mycothiol Redox Potential of Mycobacterium tuberculosis during Infection. **PLOS Pathogens**. International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, New Delhi, India, v. 10, n. 1, 2014.
- BOWMAN, S. E. J.; BREN, K. L. The chemistry and biochemistry of heme c: functional bases for covalent attachment. **Natural Product Reports**. Department of Chemistry, University of Rochester, Rochester, NY, USA, v. 25, n. 6, p. 1118, 2008.
- BRUNORI, M. et al. The transition between “acid” and “alkaline” ferric heme proteins. **BBA - Protein Structure**. University of Rome, Italy, v. 154, n. 2, p. 315–322, 1968.

CAI, M.; TIMKOVICH, R. Ionization of the heme propionate substituents in pseudomonad cytochromes c-551. **FEBS Letters**. University of Alabama, USA, v. 311, n. 3, p. 213–216, 1992.

CHENPRAKHON, P. et al. Measuring binding affinity of protein-ligand interaction using spectrophotometry: Binding of neutral red to riboflavin-binding protein. **Journal of Chemical Education**. Mahidol University, Bangkok, Thailand, v. 87, n. 8, p. 829–831, 2010.

CHO, H.Y.; LEE, Y.H.; BAE, Y.S.; KIM, E.; KANG, B. S. Activation of ATP Binding for the Autophosphorylation of DosS , a Mycobacterium tuberculosis Histidine Kinase Lacking an ATP Lid Motif. **The Journal of Biological Chemistry**. Yonsei University, Seoul, South Korea, v. 288, n. 18, p. 12437–12447, 2013.

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

COWLEY, A. B. et al. Insight into heme protein redox potential control and functional aspects of six-coordinate ligand-sensing heme proteins from studies of synthetic heme peptides. **Inorganic Chemistry**. North Dakota State University, Fargo, North Dakota, v. 45, n. 25, p. 9985–10001, 2006.

DASGUPTA, N. et al. Characterization of a two-component system, devR-devS, of Mycobacterium tuberculosis. **Tubercle and Lung Disease**. Departments of Biotechnology, New Delhi, India, v. 80, n. 3, p. 141–159, 2000.

DIERKS, E.A.; BURSTYN, J. N. Nitric Oxide (NO), the Only Nitrogen Monoxide Redox Form Capable of Activating Soluble Guanylyl Cyclase. **Biochemical Pharmacology**. Department of Chemistry, University of Wisconsin, Madison, v. 51, n. 12, p. 1593–1600, 1996.

DING, X. D. et al. Nitric oxide binding to the ferri- and ferroheme states of nitrophorin 1, a reversible NO-binding heme protein from the saliva of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. **Journal of the American Chemical Society**. Department of Chemistry, University of Arizona, v. 121, n. 1, p. 128–138, 1999.

DOMINY, B.N.; PERL, D.; SCHMID, F.X.; BROOKS, C. L. The effects of ionic strength on protein stability: The cold shock protein family. **Journal of Molecular Biology**. Department of Molecular Biology, North Torrey Pines Road La Jolla, USA v. 319, n. 2, p. 541–554, 2002.

DONG, S.; NIU, J.; COTTON, T. M. Ultraviolet/Visible Spectroelectrochemistry of Redox Proteins. **Methods in Enzymology**, v. 246, n. 1958, p. 701–732, 1995.

DUMETZ, A.C.; BRIEN, A.M.S.; KALER, E. W. .; LENHOFF, A. M. Patterns of protein – protein interactions in salt solutions and implications for protein crystallization. **Protein Science**. University of Delaware, Newark, Delaware, USA v. 16, p. 1867–1877, 2007.

DUMETZ, A. C. et al. Effects of pH on protein-protein interactions and implications for

protein phase behavior. **Biochimica et biophysica acta**. Department of Chemical Engineering, University of Delaware, Newark, USA v. 1784, n. 4, p. 600–610, 2008.

EFIMOV, I. et al. A simple method for the determination of reduction potentials in heme proteins. **FEBS Letters**. University of Leicester, United Kingdom, v. 588, n. 5, p. 701–704, 2014.

FRITZ, B. G. et al. Oxidation and Loss of Heme in Soluble Guanylyl Cyclase from *Manduca Sexta*. **Biochemistry**. Department of Chemistry and Biochemistry, University of Arizona, Tucson, Arizona, USA, v. 50, n. 26, p. 5813–5815, 2011.

GIACCIA, A.; SIMON, M.; JOHNSON, R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. **Genes & Development**. Department of Radiation Oncology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA, v. 18, p. 2183–2194, 2004.

GILLES-GONZALEZ, M. A. ET AL. A Proximal Arginine R206 Participates in Switching of the *Bradyrhizobium japonicum* FixL Oxygen Sensor. **Journal of Molecular Biology**. Department of Biochemistry, University of Texas, USA, v. 360, n. 1, p. 80–89, 2006.

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**. Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, United Kingdom, v. 268, n. 22, p. 16293–16297, 1993.

GOLDKORN, T.; SCHEJTER, A. The Redox Potential of Cytochrome c-552 from *Euglena gracilis*: A Thermodynamic Study. **Archives of biochemistry and biophysics**. Tel-Aviv University, Israel, v. 177, n. 1, p. 39–45, 1976.

GONZALEZ, GONZALO.; GILLES-GONZALEZ, M. A. Heme-based sensors : defining characteristics, recent developments and regulatory hypotheses. **Journal of Inorganic Biochemistry**. University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA, v. 99, p. 1–22, 2005.

HANSON, G. T. et al. Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-sensitive Green Fluorescent Protein Indicators. **Journal of Biological Chemistry**. v. 279, n. 13, p. 13044–13053, 2004.

HARMS, M. J. et al. The pKa Values of Acidic and Basic Residues Buried at the Same Internal Location in a Protein Are Governed by Different Factors. **Journal of Molecular Biology**. Department of Biophysics, Johns Hopkins University, North Charles Street, Baltimore, USA, v. 389, n. 1, p. 34–47, 2009.

HONORIO-FELÍCIO, N. et al. The Heme-Based Oxygen Sensor *Rhizobium etli* FixL : Influence of Auxiliary Ligands on Heme Redox Potential and Implications on the Enzyme Activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**. Laboratório de Bioinorgânica, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil, v. 164, p. 34–41, 2016.

INAGAKI, S. et al. Spectroscopic and redox properties of a CooA homologue from Carboxydotherrmus hydrogenoformans. **Journal of Biological Chemistry**. The Graduate University for Advanced Studies, Japan, v. 280, n. 5, p. 3269–3274, 2005.

ISOM, D. G. et al. Large shifts in pKa values of lysine residues buried inside a protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Department of Biophysics, Johns Hopkins University, North Charles Street, Baltimore, USA, v. 108, n. 13, p. 5260–5265, 2011.

JOHNSON, D. L. et al. Electrochemical characterisation of the human cytochrome P450 CYP2C9. **Biochemical Pharmacology**. School of Chemistry, Monash University, Australia, v. 69, n. 10, p. 1533–1541, 2005.

KING, B. C.; HAWKRIDGE, F. M.; HOFFMAN, B. M. Electrochemical Studies of Cyanometmyoglobin and Metmyoglobin: Implications for Long-Range Electron Transfer in Proteins. **J. Am. Chem. SOC.** Departments of Chemistry, Virginia Commonwealth University, USA, v. 114, n. 26, p. 10603–10608, 1992.

KITANISHI, K. et al. Important roles of Tyr43 at the putative heme distal side in the oxygen recognition and stability of the Fe(II)-O₂ complex of YddV, a globin-coupled heme-based oxygen sensor diguanylate cyclase. **Biochemistry**, v. 49, n. 49, p. 10381–10393, 2010.

KRAUS, D.; WITTENBERG, J. B. Hemoglobins of the *Lucina pectinatu* / Bacteria Symbiosis. **Journal of Biological Chemistry**. Department of Physiology and Biophysics, New York, USA, v. 265, n. 27, p. 16043–16053, 1990.

KUMAR, A. et al. Mycobacterium tuberculosis DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. PNAS. University of Alabama, USA, v. 104, n. 28, p. 11568–11573, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, USA, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LIU, X. et al. Nanomaterial-based tools for protein kinase bioanalysis. **Trends in Analytical Chemistry**. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha, China, v. 58, p. 40–53, 2014.

LÓPEZ-MIRABAL, H. R.; WINTHER, J. R. Redox characteristics of the eukaryotic cytosol. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**. Department of Molecular Biology, Universitetsparken, Copenhagen, Denmark, v. 1783, n. 4, p. 629–640, 2008.

MADRONA, Y. et al. Crystal structures of the CO e and NO e Bound DosS GAF-A domain and implications for DosS signaling in Mycobacterium tuberculosis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. Department of Pharmaceutical Chemistry, University of California, San Francisco, United States, v. 612, p. 1–8, 2016.

MAKINO, R. et al. Oxygen binding and redox properties of the heme in soluble guanylate cyclase: Implications for the mechanism of ligand discrimination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 18, p. 15678–15687, 2011.

MANNING, G. et al. The protein kinase complement of the human genome. **Science**. South San Francisco, USA, v. 298, n. 5600, p. 1912–1934, 2002.

MARQUES, H. M.; CUKROWSKI, I.; VASHI, P. R. Co-ordination of weak field ligands by N-acetylmicroperoxidase-8 (NAcMP8), a ferric haempeptide from cytochrome c, and the influence of the axial ligand on the reduction potential of complexes of NAcMP8. **Journal of the Chemical Society**. Centre for Molecular Design, Department of Chemistry, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa, v. 8, n. 8, p. 1335–1342, 2000.

MOLITOR, B. et al. A heme-based redox sensor in the methanogenic archaeon methanosarcina acetivorans. **Journal of Biological Chemistry**. Faculty of Biology and Biotechnology, Ruhr University Bochum, Universitaetsstrasse, Germany, v. 288, n. 25, p. 18458–18472, 2013.

NAKAJIMA, H. et al. Redox Properties and Coordination Structure of the Heme in the CO-sensing Transcriptional Activator CoxA. **Journal of Biological Chemistry**. Hyogo, Japan, v. 276, n. 10, p. 7055–7061, 2001.

NØRBY, J. G.; ESMANN, M. The Effect of Ionic Strength and Specific Anions on Substrate Binding and Hydrolytic Activities of Na,K-ATPase. **The Journal of General Physiology**. Department of Biophysics, University of Aarhus, Denmark, v. 109, n. 5, p. 555–570, 1997.

OLEA, C. et al. Probing the function of heme distortion in the H-NOX family. **ACS Chemical Biology**. Department of Molecular and Cell Biology, California Institute for Quantitative Biomedical Research, University of California, Berkeley, USA, v. 3, n. 11, p. 703–710, 2008.

OWENS, J. W.; CONNOR, C. J. O. Characterization of some Low Spin Complexes of Ferric Hemeoctapeptide From Cytochrome-c. **Inorganica Chimica Acta**. Department of Chemistry, University of New Orleans, New Orleans, USA, v. 151, p. 107–116, 1988.

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**. Biosciences Division, Argonne National Laboratory, Argonne, USA, v. 377, n. 5, p. 1498–1517, 2008.

PROCTOR, A. et al. Measurement of protein kinase B activity in single primary human pancreatic cancer cells. **Analytical Chemistry**. Department of Chemistry, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA, v. 86, n. 9, p. 4573–4580, 2014.

ROBERTS, D. M. et al. Two sensor kinases contribute to the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Biological Chemistry**. University of Washington, Seattle, USA, v. 279, n. 22, p. 23082–23087, 2004.

SAINI, D. K. et al. Cloning, overexpression, purification, and matrix-assisted refolding of devS (Rv 3132c) histidine protein kinase of *Mycobacterium tuberculosis*. **Protein Expression and Purification**. Institute of Medical Sciences, New Delhi, India, v. 25, n. 1, p. 203–208, 2002.

SASAKURA, Y. et al. Characterization of a direct oxygen sensor heme protein from *Escherichia coli*: Effects of the heme redox states and mutations at the heme-binding site on catalysis and structure. **Journal of Biological Chemistry**. Tohoku University, Sendai, Japan, v. 277, n. 26, p. 23821–23827, 2002.

SHIMIZU, T. et al. Gaseous O₂, NO, and CO in Signal Transduction: Structure and Function Relationships of Heme-Based Gas Sensors and Heme-Redox Sensors. **American chemical Society**. Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong, China, v. 115, p. 6491–6533, 2015.

SIB SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS. **ProtParam**. Disclaimer.

SINGH, N.; KUMAR, A. Virulence Factor SenX3 Is the Oxygen-Controlled Replication Switch of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antioxidants & Redox Signaling**. Institute of Microbial Technology, Chandigarh, India, v. 22, n. 7, p. 603–613, 2015.

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**. Department of Biochemistry, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA, 2012.

SOUSA, E. H. S. et al. Drug discovery targeting heme-based sensors and their coupled activities. **Journal of Inorganic Biochemistry**. Laboratory of Bioinorganic Chemistry, Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceara, Center for Sciences, Fortaleza, Ceara, Brazil, v. 167, p. 12–20, 2017.

SOUSA, E. H. S.; TUCKERMAN, J. R.; GONZALEZ, G. DosT and DevS are oxygen-switched kinases in *Mycobacterium tuberculosis*. **Protein Science**. Department of Biochemistry, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA, v. 16, p. 1708–1719, 2007.

TANG, K. et al. Redox-dependent Ligand Switching in a Sensory Heme-binding GAF Domain of the Cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC7120. **The Journal of Biological Chemistry**. Huazhong Agricultural University, Wuhan, China, v. 290, n. 31, p. 19067–19080, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2017: Leave no one behind - Unite to end TB**. 2017.

YUKL, E. T. et al. Interdomain Interactions within the Two-Component Heme-Based Sensor DevS from *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemistry**. Department of Pharmaceutical Chemistry, University of California, San Francisco, California, USA, v. 46, p. 9728–9736, 2007.

YUKL, E. T. et al. Nitric Oxide Dioxygenation Reaction in DevS and the Initial Response to Nitric Oxide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemistry**. University of Minnesota, Minneapolis, USA, v. 50, p. 1023–1028, 2011.

ZHANG, L.; LIU, L.; XIA, N. Electrochemical Sensing of Alkaline Phosphatase Activity Based on Difference of Surface Charge of Electrode. **International Journal of Electrochemical Science**. College of Chemistry and Chemical Engineering, Anyang Normal University, Anyang, China, v. 8, p. 8311–8319, 2013.