



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

NATHALIE HONORIO FELÍCIO

ESTUDO ESPECTROELETROQUÍMICO DA HEMEPROTEÍNA SENSORA
***RHIZOBIUM ETLI* FixL**

FORTALEZA

2017

NATHALIE HONORIO FELÍCIO

ESTUDO ESPECTROELETROQUÍMICO DA HEMEPROTEÍNA SENSORA *RHIZOBIUM*
ETLI FixL

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

Orientador: Prof. Dra. Izaura Nogueira Cirino Diógenes.

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

FORTALEZA

2017

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)

- F349e Felício, Nathalie Honorio.
Estudo espectroeletroquímico da hemeproteína sensora Rhizobium Etli FixL / Nathalie Honorio Felício. – 2017.
106 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Izaura Cirino Nogueira Diógenes .
Coorientação: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa.
1. biosensores . 2. FixL . 3. espectroeletroquímica . 4. heme proteína . 5. sistema de dois componentes. I. Título.

CDD 540

NATHALIE HONORIO FELÍCIO

ESTUDO ESPECTROELETROQUÍMICO DA HEMEPROTEÍNA SENSORA *RHIZOBIUM*
ETLI FixL

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

Aprovada em: 30/08/2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Izaura Nogueira Cirino Nogueira Diógenes(Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Profa. Dr. Elisane Longhinotti
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr Tercio de Freitas Paulo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

***À minha mãe Ana Angélica Honório Felício
(in memoriam).***

Por que Deus permite que as mães vão se embora? Mãe não tem limite, é tempo sem hora, luz que não se apaga quando sopra o vento e a chuva desaba, veludo escondido na pele enrugada, água pura, ar puro, puro pensamento. Morrer acontece com o que é breve e passa sem deixar vestígio. Mãe, na sua graça, é eternidade. Por que Deus se lembra - mistério profundo - de tirá-la um dia? Fosse eu Rei do Mundo, baixava uma lei: Mãe não morre nunca, mãe ficará sempre junto de seu filho e ele, velho embora, será pequenino feito grão de milho...

Carlos Drummond de Andrade.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À Professora Izaura Cirino Nogueira Diógenes pela orientação e atenção dedicada durante o período de doutorado. Pelas oportunidades apresentadas e esforços constantes para proporcionar aos seus alunos o melhor suporte possível. Pelo crescimento profissional que me proporcionou através das valiosas discussões enquanto descobríamos esta linha de pesquisa tão nova para ambas.

Ao Professor Eduardo Henrique Silva de Sousa por me introduzir à esta linha de pesquisa e por todo o conhecimento transferido, tanto em termos práticos como teóricos. Pela oportunidade de iniciar com o senhor o microgrupo de Bioquímica no Laboratório de Inorgânica. Fazer parte da montagem de todo o aparato utilizado para os nossos estudos foi desafiador e um aprendizado indescritível.

À Marta Carepo pelos conhecimentos transmitidos em Bioquímica, por toda contribuição neste trabalho e suporte em todos os sentidos.

Ao Professor Paul Bernhardt que me acolheu em seu laboratório da melhor forma possível em seu laboratório na Austrália. Por sua preocupação com minha adaptação e confiança no meu trabalho. Por todo o aprendizado proporcionado durante o período de doutorado sanduíche.

Ao meu companheiro Daniel Friend pelo apoio incondicional durante a realização deste trabalho.

À minha família pelo apoio durante todos os meus anos de formação, especialmente ao meu pai, José Edson, e meus irmãos Nathanael e Daniel, que estiveram sempre presentes nos momentos mais difíceis.

Aos colegas do grupo de Bioquímica do Laboratório de-Bioinorgânica Marta, Mikael, Wellinson, Cláudia, Josi, Marie e Giam pela colaboração em algumas etapas deste trabalho, discussões e companheirismo.

À todos os colegas do grupo de Bioinorgânica pelo apoio e companheirismo durante a realização deste trabalho. Em especial ao meu amigo Dieric, que nos momentos mais difíceis sempre esteve presente com palavras de apoio e incentivo, como ele diz, a jornada se torna mais fácil de se enfrentar quando se tem amigos!

Aos Professores Luiz Gonzaga Luiz Gonzaga de França Lopes, Tércio de Freitas Paulo e Dra Marta S. P. Carepo pela participação e contribuição durante exame de qualificação.

Aos colegas da School of Chemistry and Molecular Biosciences da University of Queensland pela receptividade, colaboração e companheirismo durante o período de doutorado sanduíche.

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

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelo suporte financeiro durante o período de execução deste trabalho no Brasil e ao programa Ciências sem Fronteiras durante o período de doutorado sanduíche na Austrália.

À Universidade Federal do Ceará e The University of Queensland pela estrutura fornecida.

...A razão cardeal de toda superioridade humana é sem dúvida a vontade. O poder nasce do querer. Sempre que o homem aplique a veemente e perseverante energia de sua alma a um fim, ele vencerá os obstáculos, e se não atingir o alvo fará pelo menos coisas admiráveis. Mas para que o homem se entregue assim a uma idéia e se cative a um pensamento, é necessário ser atraído irreversivelmente, ser empelido pelo entusiasmo...

José de Alencar, em A pata da gazela.

RESUMO

Este trabalho apresenta os resultados de expressão, purificação e espectroeletroquímica obtidos para a hemeproteína sensora FixL do organismo *Rhizobium etli* (*ReFixL*). Além disso, os dados de espectroeletroquímica permitiram a correlação entre os valores de potenciais da reação redox do centro metálico de Fe presente no grupo heme com a atividade quinase da proteína *ReFixL*. A proteína *ReFixL*, expressa e purificada em sua forma met-*ReFixL*(Fe^{III}), apresenta valor de massa aproximada de 70 kDa (*ReFixL*). Os valores dos potenciais redox das proteínas em estudo foram determinados por titulação espectroeletroquímica em solução tampão (pH 8 ou 9,5) contendo mediadores redox que permitiram uma variação de potencial de -500 a + 500 mV vs ENH. Tais experimentos foram realizados para a proteína livres de coordenação e quando ligada (coordenação ao átomo de Fe do grupo heme) às moléculas de oxigênio (O₂), monóxido de carbono (CO), cianeto (CN⁻) e imidazol; todas relevantes no processo de ativação/inativação da atividade quinase da proteína *ReFixL*. Os perfis espectroscópicos da proteína *ReFixL* indicam que esta se liga a CO e O₂ em seu estado reduzido e à imidazol e CN⁻ no seu estado oxidado, sendo observados, respectivamente, os seguintes valores de potencial: +21, -51, -57 e -156 mV vs ENH. A desativação da atividade quinase da proteína *ReFixL* é observada quando da ligação com as moléculas de O₂, imidazol e CN⁻, cujos processos redox apresentam valores negativos de potencial. O deslocamento negativo de potencial em relação à proteína no estado reduzido e não ligado (deoxi-*ReFixL*; +19 mV vs ENH) indica que as mudanças conformacionais induzidas pelos ligantes afeta o potencial de redução de forma mais significativa que o caráter doador ou receptor de densidade eletrônica dos ligantes. Os valores de potencial observados para a proteína ligada ao ligante O₂ não corresponde ao esperado baseado na termodinâmica da reação, uma vez que se esperava um deslocamento positivo de potencial para ligantes que se ligam ao estado reduzido da proteína. Os resultados sugerem que as mudanças conformacionais que seguem devido a inativação da atividade quinase quando a proteína se liga a O₂, tem um efeito no ambiente do grupo heme que de alguma forma desestabiliza o estado reduzido da proteína, contrabaleando a estabilização normalmente causada por um ligante ao estado reduzido.

Palavras-chave: Bioeletroquímica. Proteína FixL. Espectroeletroquímica. Heme proteína. Sistema de dois componentes.

ABSTRACT

This work presents the expression, purification and spectroelectrochemistry results obtained for the sensor hemeprotein FixL from *Rhizobium etli* (*ReFixL*). In addition, the spectroelectrochemistry data allowed the correlation between the potential values of the redox reaction of the Fe metal center presented in the heme group with the kinase activity of the *ReFixL* protein. The *ReFixL* protein, expressed and purified in its met-*ReFixL*(Fe^{III}) form, showed molecular mass value of about 70 kDa (*ReFixL*). The values of the redox potentials of the studied protein was determined by spectroelectrochemical titration in buffer solution (pH 8 or 9.5) containing redox mediators that allowed to cover a potential range from –500 to + 500 mV *vs* ENH. Such measurements were performed for the proteins free of coordination and bonded (coordination to the Fe atom of the heme group) to oxygen (O₂), carbon monoxide (CO), cyanide (CN[–]) and imidazole molecules; all of them relevant in the activation/inactivation kinase activity in the case of *ReFixL*. The spectroscopic profiles of the *ReFixL* protein supported these species were bound to CO and O₂ in the reduced state and to imidazole and CN[–] in the oxidized state, being observed, respectively, the following potential values: +21, –51, –57 and –156 mV *vs* ENH. The inactivation of the kinase activity of the *ReFixL* protein is observed upon binding to O₂, imidazole and CN[–] molecules, whose redox potentials show negative values. The negative potential shift in relation to the reduced non-bonded state of the protein (deoxy-*ReFixL*; +19 mV *vs* ENH) indicates the reduction potential is more affected by conformational changes induced by the ligands than the electron density donor/acceptor character of the ligands do. The potential values observed for Fe-O₂ do not follow the expected based on its thermodynamics, assuming the expected potential shift would have been positive for ligands that bind to reduced state Fe^{II}. Our results suggest that conformational changes that follow due to kinase activity switching off upon O₂ binding have some knock-on effect on the heme environment, that destabilize the Fe^{II} state and counterbalances the Fe^{II} stabilization normally caused by a ligand to the reduced form.

Keywords: Bioelectrochemistry. FixL Protein. Spectroelectrochemistry. Heme based protein. Two component system.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 — Grupo prostético Heme (ferro-protoporfirina IX) tipo a, b, d1, c e o. Na estrutura do grupo heme tipo c encontram-se representados em vermelho o motivo comumente conservado CXXCH que se liga aos grupos vinis nas posições 2 e 4 do grupo heme. Os aminoácidos "XX" são altamente variáveis, todos os aminoácidos foram encontrados ocupando estas posições, exceto por cisteínas..... 20
- Figura 2— Esquema ilustrativo da sequência de transferências do grupo fosforil (PO_3^{2-}). HQ: histidina quinase, P: fosforil, RR: regulador de resposta, Pi: fosfato inorgânico..... 25
- Figura 3— Esquema ilustrativo do sistema de dois componentes. A figura apresenta os principais passos do sistema de dois componentes, onde um sinal extracelular é recebido pelo domínio sensor na proteína histidina quinase causando uma mudança conformacional, assim ativando/desativando a reação de autofosforilação ocorrida no resíduo histidina do domínio funcional seguida pela transferência do grupo fosforil para o resíduo aspartato do domínio receptor do regulador de resposta, tornando ativo/inativo para regulação gênica e subsequente desfosforilação..... 26
- Figura 4— Ilustração da transdução de sinal de um sistema de dois componentes. a) em um protótipo sistema de dois componentes o domínio CA se liga ao ATP, possibilitando a reação de uma substituição nucleofílica $\text{S}_\text{N}2$ ocorrida no γ -fosfato do ATP, onde o nucleófil nucleófilo em proteínas histidina quinase é um átomo de nitrogênio (posição 1 ou 3) do anel imidazólico de um resíduo histidina presente no domínio DHp. O grupo fosforil é transferido para um resíduo aspartato no domínio receptor do regulador de resposta, ativando o domínio de saída de sinal; b) modelo de uma proteína híbrida histidina quinase, onde a transferência do grupo fosforil ocorre intramolecularmente, devido a presença de um domínio receptor, semelhante ao presente no regulador de resposta..... 27
- Figura 5— Alinhamento das sequência do domínio heme-sensor das proteínas *Bradyrhizobium japonicum* FixL *Ryzobium etli* FixL e *Ryzobium meliloti* FixL. Os motivos conservados estão destacados nos retângulos vermelhos e os resíduos conservados e importantes para transdução de sinal encontram-se destacados em azul. O alinhamento foi processado no website <http://www.ebi.ac.uk>, utilizando a ferramenta Clustal Omega..... 29

Figura 6—	Estrutura tridimensional do domínio sensor do N-terminal para C-terminal coloridos de acordo com o esquema de cores ROYGBIV. a) FixL do organismo <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (PDB: 1LSW), b) DevS do organismo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (PDB: 2W3F) e c) DosT do organismo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (PDB: 2VZW). O grupo heme encontra-se destacado em modelo de traços.....	30
Figura 7—	Alinhamento das sequência dos domínios histidina quinase das proteínas FixL, FixL, PhoQ, PrrB, EnvZ, HK853, DesK e DevS. Os motivos conservados estão destacados nos retângulos vermelhos (Processado no website http://www.ebi.ac.uk , utilizando a ferramenta Clustal Omega).....	31
Figura 8—	Estrutura tridimensional do domínio DHp coloridos do N-terminal para C-terminal no esquema de cores ROYGBIV. a) EnvZ do organismo <i>Escherichia coli</i> (PDB: 1JOY), b) Spo0F do organismo <i>Bacillus subtilis</i> e c) DesK do organismo <i>Bacillus subtilis</i> (PDB: 3EHF). O sítio de fosforilação histidina encontra-se destacado em modelo de traços na estrutura. As estruturas do domínio DHp das proteínas Spo0F e DesK são parte da estrutura completa do domínio histidina quinase (domínios DHp e CA).....	32
Figura 9—	Estrutura tridimensional de domínios CA coloridos do N-terminal para C-terminal no esquema de cores ROYGBIV a) DesK do organismo <i>Bacillus subtilis</i> (PDB: 3EHG), b) PhoQ do organismo <i>Escherichia coli</i> (PDB: 1ID0), c) PrrB do organismo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (PDB: 1YS3), d) DevS do organismo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (PDB: 3ZXO) e e) DesK colorida de acordo com fator B, demonstrando a variação deste fator utilizando esquema de cores ROYGBIV. As proteínas DesK e PhoQ foram cristalizadas ligadas a ATP e AMPPNP, respectivamente. Estes compostos são exibidos em modelos de traços.....	34
Figura 10—	Alinhamento da sequência de reguladores de resposta da subfamília OmpR/PhoB (PhoP, PrrA e MtrA do organismo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb), DrrB do organismo <i>Thermotoga maritima</i> (Tm) e PhoB do organismo <i>Escherichia coli</i> (Ec)) e da subfamília NarL/FixJ (Spo0F do organismo <i>Bacillus subtilis</i> (Bs) e FixJ do organismo <i>Rhizobium meliloti</i> (Rm)). Resíduos idênticos estão marcados em – resíduos altamente conservados na subfamília OmpR/PhoB estão marcados em – e resíduos moderadamente conservados em todas as sequências estão destacados em --. O alinhamento foi processado no website http://www.ebi.ac.uk , utilizando a ferramenta Clustal Omega.....	38

Figura 11—	Estrutura tridimensional de domínios receptores coloridos do N-terminal para C-terminal no esquema de cores ROYGBIV. a) Spo0F do organismo <i>Bacillus subtilis</i> (PDB: 1PEY), b) PhoB do organismo <i>Escherichia coli</i> (PDB: 1B00), c) DrrB do organismo <i>Thermotoga maritima</i> (PDB: 3NNS).....	40
Figura 12—	Organização de domínios em na proteína FixL do organismo a) <i>Rhizobium etli</i> , b) <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e c) <i>Sinorhizobium meliloti</i> . Organização de domínios gerado pelo website http://smart.embl-heidelberg.de/	42
Figura 13—	Nomenclatura proposta para elementos da estrutura tridimensional do domínio heme-PAS da proteína BjFixL(PDB: 1LSW).....	43
Figura 14—	Rearranjos estruturais do grupo heme da proteína a) BjFixL (PDB: 1DRM) em decorrência da associação dos ligantes b) CN ⁻ (PDB: 1LT0)e c) O ₂ (PDB: 1DP6).....	45
Figura 15—	a) Ilustração comparativa de uma reação de transferência de elétrons para moléculas pequenas e proteínas e b) Ilustração do uso de mediadores para estudo de reação de transferência de elétrons de proteínas.....	53
Figura 16—	Mediadores redox reportados por Bernhardt e colaboradores ⁶⁴ e seus respectivos potenciais redox em pH 7,0.....	54
Figura 17—	Biorreator Applikon – 5L.....	60
Figura 18—	Esquema ilustrativo das etapas de purificação da proteína ReFixL.....	65
Figura 19—	Cubetas utilizadas nos experimentos de titulação espectroelétrica	68
Figura 20—	Verificação da pureza da proteína ReFixL após os passos de purificação. a) Espectro obtido na região do UV-Vis registrado em solução contendo ReFixL 30 µmol L ⁻¹ e tampão TRIS 10 mmol L ⁻¹ (pH 8,0) e b) Gel desnaturante de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) ao final dos passos de purificação da proteína ReFixL. Poços: 1-fração precipitada com sulfato de amônio; MP-Marcador molecular padrão (New England Labs); 2- fração coletada da coluna fenil sefarose; 3- fração coletada da coluna de troca iônica DEAE e 4- fração coletada da coluna de filtração em gel Superdex 200	72
Figura 21—	Titulações espectrofotométricas para ReFixL na ausência de ligantes. a) espectros UV-Vis registrados durante titulação redutiva e oxidativa para deoxi-ReFixL 15 µmol L ⁻¹ na presença de [Co((NMe ₃) ₂ sar)]Cl ₃ 100 µmol L ⁻¹ , 2,5-dihidroxibenzoquinona 5 µmol L ⁻¹ , [CoCLME-N ₄ S ₂ -sar)]Cl ₃ 100 µmol L ⁻¹ , [CoAMME-N ₅ S-sar)]Cl ₃ 100 µmol L ⁻¹ e [Co(sep)]Cl ₃ 100 µmol L ⁻¹ , tampão TRIS (pH 8,0) 35 mmol L ⁻¹ e NaCl 100 mmol L ⁻¹ ; inset: perfil absorbância (em 432 nm) versus potencial aplicado para proteína durante titulação	75

- reduzida (•) e oxidativa (Δ) e b) espectro calculado para forma reduzida *deoxi-ReFixL* (azul) e forma oxidada *met-ReFixL* (preto).....
- Figura 22— Titulações espectrofotométricas para *ReFixL* na presença do ligante CO. a) espectros UV-Vis registrados durante titulação redutiva e oxidativa para CO-*ReFixL* 15 μmol L⁻¹ na presença de [Co((NMe₃)₂sar)]Cl₅ 100 μmol L⁻¹, [CoCLME-N₄S₂-sar)]Cl₃ 100 μmol L⁻¹, [CoAMME-N₅S-sar)]Cl₃ 100 μmol L⁻¹ e [Co(sep)]Cl₃ 100 μmol L⁻¹, tampão TRIS (pH 8,0) 35 mmol L⁻¹ e NaCl 100 mmol L⁻¹, solução saturada com CO (0,93 mmol L⁻¹)⁸¹; inset: perfil absorbância (em 426 nm) versus potencial aplicado para proteína durante titulação redutiva (•) e oxidativa (Δ) e b) Espectro calculado para forma reduzida CO-*ReFixL* (azul) e forma oxidada *met-ReFixL* (preto)..... 78
- Figura 23— Estruturas cristalinas da proteína *BjFixL* nas formas a) CO-*BjFixL*, destacada em linha pontilhada vermelha (PDB 1XJ2), b) *met-BjFixL* (PDB 2VV6), c) *oxi-BjFixL* (PDB 1DP6) e d) *cianomet-BjFixL*(PDB 1LT0) 80
- Figura 24— Titulações espectrofotométricas para *ReFixL* na presença do ligante O₂ (em ar). a) espectros UV-Vis registrados durante titulação redutiva e oxidativa em ar para *oxi-ReFixL* 15 μmol L⁻¹ na presença de [Co((NMe₃)₂sar)]Cl₅ 100 μmol L⁻¹, [CoCLME-N₄S₂-sar)]Cl₃ 100 μmol L⁻¹, [CoAMME-N₅S-sar)]Cl₃ 100 μmol L⁻¹ e [Co(sep)]Cl₃ 100 μmol L⁻¹, tampão TRIS (pH 8,0) 35 mmol L⁻¹ e NaCl 100 mmol L⁻¹, solução saturada em oxigênio (0.286 mmol L⁻¹ à 20 °C); inset: perfil absorbância (em 428 nm) versus potencial aplicado para proteína durante titulação redutiva (•) e oxidativa (Δ) e b) Espectro calculado para forma reduzida *oxi-ReFixL* (azul) e forma oxidada *met-ReFixL* (preto)..... 82
- Figura 25— Titulações espectrofotométricas para *ReFixL* na presença do ligante O₂ (em O₂) a) Espectros UV-Vis registrados durante titulação redutiva e oxidativa em O₂ puro para *oxi-ReFixL* 15 μmol L⁻¹ na presença de [Co((NMe₃)₂sar)]Cl₅ 100 μmol L⁻¹, [CoCLME-N₄S₂-sar)]Cl₃ 100 μmol L⁻¹, [CoAMME-N₅S-sar)]Cl₃ 100 μmol L⁻¹ e [Co(sep)]Cl₃ 100 μmol L⁻¹, tampão TRIS (pH 8,0) 35 mmol L⁻¹ e NaCl 100 mmol L⁻¹, solução saturada em oxigênio (1,25 mmol L⁻¹ a 25 °C); inset: perfil absorbância (em 426 nm) versus potencial aplicado para proteína durante titulação redutiva (•) e oxidativa (Δ) e b) Espectro calculado para forma reduzida *oxi-ReFixL* (azul) e forma oxidada *met-ReFixL* (preto)..... 84

- Figura 26— Titulações espectrofotométricas para *ReFixL* na presença do ligante imidazol a) espectros UV-Vis registrados durante titulação redutiva e oxidativa em câmara anaeróbica para imz- *ReFixL* 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de imidazol 200 mmol L^{-1} , $[\text{Co}((\text{NMe}_3)_2\text{sar})]\text{Cl}_5$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{CoCLME-N}_4\text{S}_2\text{-sar}]\text{Cl}_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{CoAMME-N}_5\text{S-sar}]\text{Cl}_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{Co}(\text{sep})]\text{Cl}_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tampão TRIS (pH 8,0) 35 mmol L^{-1} e NaCl 100 mmol L^{-1} ; inset: perfil absorbância (em 432 nm) versus potencial aplicado para proteína durante titulação redutiva (•) e oxidativa (Δ) e b) Espectro calculado para forma reduzida deoxi- *ReFixL* (azul) e forma oxidada imz-*ReFixL* (laranja)..... 87
- Figura 27— Titulações espectrofotométricas para *ReFixL* na presença do ligante CN^- . a) espectros UV-Vis registrados durante titulação redutiva e oxidativa em câmara anaeróbica para cianomet- *ReFixL* 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de KCN 1 mmol L^{-1} , $[\text{Co}((\text{NMe}_3)_2\text{sar})]\text{Cl}_5$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{CoCLME-N}_4\text{S}_2\text{-sar}]\text{Cl}_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{CoAMME-N}_5\text{S-sar}]\text{Cl}_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{Co}(\text{AMMEsar})]\text{Cl}_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{Co}(\text{trans-diammac})](\text{ClO}_4)_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tampão TRIS (pH 9,5) 35 mmol L^{-1} e NaCl 100 mmol L^{-1} ; inset: perfil de absorbância (em 432 nm) versus potencial aplicado para proteína durante titulação redutiva (•) e oxidativa (Δ) e b) Espectro calculado para forma reduzida deoxi- *ReFixL* (azul) e forma oxidada cianomet-*ReFixL* (laranja). Obs.: Neste caso o eletrodo de trabalho utilizado foi uma malha de platina..... 91
- Figura 28— Gráfico de barras relacionando atividade quinase da proteína *ReFixL* e seu potencial de redução das formas deoxi-*ReFixL*, CO-*ReFixL*, oxi-*ReFixL* (em ar), oxi-*ReFixL* (em O_2), imz- *ReFixL* e cianomet-*ReFixL*..... 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1—	Soluções utilizadas na produção da proteína ReFixL, concentrações e detalhes de esterilização. A alternância das cores na tabela indica soluções diferentes.....	62
Tabela 2—	Composição da solução para lise celular.....	63
Tabela 3—	Composição de géis utilizados para eletroforese (SDS-PAGE). Todos os reagentes utilizados foram de procedência Sigma-Aldrich.....	66
Tabela 4—	Composição do tampão amostra para desnaturação da proteína.....	67
Tabela 5—	Mediadores eletroquímicos, valores de potencial de redução, E_0' , e concentrações utilizadas.....	69
Tabela 6—	Descrição das condições utilizadas para as titulações espectroeletroquímicas realizadas para a proteína ReFixL.....	70

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/Ala	Alanina
<i>BjfixL</i>	Gene que codifica a proteína BjFixL
BjFixL	Proteína FixL do organismo <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
C/Cys	Cisteína
CA	<i>catalytic ATP-binding domain</i>
CooA	domínio CO oxidation activator
C-terminal	porção carboxi terminal
D/Asp	Ácido aspártico
DEAE	resina cromatografica aniônica dietilaminoetil
<i>deoxi-ReFixL</i>	Proteína ReFixL (FeII) reduzida e não ligado a oxigênio
DevS	<i>differentially expressed in virulent strain sensor</i>
DosT	<i>dormancy survival response sensor T</i>
E/Glu	Ácido glutâmico
EDTA	ácido etilenoaldiamonotetracético
E_m	convenção para sistemas biológicos, $E^{0'}$, pH 7,0 e atividade= 1
E_{med}	potencial do mediador
E_{Ox}	Potencial de oxidação
E_{red}	Potencial de redução
F/Phe	Fenilalanina
FixL	<i>rhizobial</i> nitrogen-fixation gene L
G/Gly	Glicina
GAF	domínio <i>cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhIA</i>
GCS	domínio <i>globin coupled sensor</i>
H/His	Histidina
HNOB	domínio heme-NO-binding

HQ	Histidina Quinase
I/Ile	Isoleucina
Imz	Imidazol
K/Lys	Lisina
K _d	constante de dissociação
L/Leu	Leucina
LDB	domínio de associação ao ligante (<i>ligand binding domain</i>)
M/Met	Metionina
met- <i>ReFixL</i>	Proteína <i>ReFixL</i> (FeIII) em seu estado pentacoordenado
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
N/Asn	Aspargina
N-terminal	porção amino terminal
oxi- <i>ReFixL</i>	Proteína <i>ReFixL</i> (FeII) ligada a oxigênio
P/Pro	Prolina
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAS	acrônimo do domínio <i>Period, Arnt, and Sim</i>
PCR	<i>reação polimerase em cadeia</i>
P- <i>ReFixL</i>	Proteína <i>ReFixL</i> em sua forma fosforilada
PYP	<i>Photoactive Yellow Protein</i>
Q/Gln	Glutamina
R/Arg	Arginina
<i>RefixL</i>	Gene que codifica a proteína <i>ReFixL</i>
<i>ReFixL</i>	Proteína <i>FixL</i> do organismo <i>Rhizobium etli</i>
<i>RmfixL</i>	Gene que codifica a proteína <i>RmFixL</i>
<i>RmFixL</i>	Proteína <i>FixL</i> do organismo <i>Rhizobium meliloti</i>
ROYGBYV	acrônimo para: <i>red, orange, yellow, green, blue, indigo e violet</i>
RR	Regulador de Resposta
S/Ser	Serina
SDS	dodecilsulfato de sódio
sGC	guanilato ciclase solúvel (<i>soluble guanylate cyclase</i>)

T/Thr	Treonina
TAE	Tampão constituído por tris, ácido etanóico e EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	<i>tetrametiletilenodiamina</i>
Tris	Tris(<i>hidroximetil</i>)aminometano
V/Val	Valina
W/Trp	Triptofano
Y/Tyr	Tirosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Hemeproteínas sensoras.....	21
1.2	Sistemas de dois components.....	23
1.2.1	<i>Arquitetura de domínios</i>	26
1.3	<i>Estrutura e função de domínios</i>	28
1.3.1	<i>Domínio sensor</i>	28
1.3.2	<i>Domínio histidina quinase</i>	30
1.3.3	<i>Domínio DHp (dimerization and histidine phosphorylation domain).....</i>	32
1.3.4	<i>Domínio CA (Catalytic and ATP binding domain)</i>	33
1.3.5	<i>Reguladores de resposta</i>	37
1.4	Proteínas histidina quinase FixL.....	40
1.4.1	<i>FixL híbrida do Rhizobium etli</i>	48
1.5	Eletroquímica de sistemas hemeproteínas sensoras.....	49
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	57
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
3.1	Transformação das células Escherichia coli (MC1061).....	58
3.2	Produção da proteína ReFixL	59
3.3	Purificação das proteína ReFixL.....	62
3.4	Espectroeletróquímica	67
3.4.1	<i>Proteína ReFixL</i>	69
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1	Rhizobium etli FixL.....	71
4.1.1	<i>Purificação</i>	71
4.1.2	<i>Espectroeletróquímica</i>	73
4.1.2.1	<i>deoxi-ReFixL</i>	74
4.1.2.2	<i>CO-ReFixL</i>	76

4.1.2.3	<i>oxi-ReFixL</i>	81
4.1.2.4	<i>imz-ReFixL</i>	85
4.1.2.5	<i>cianomet-ReFixL</i>	89
4.1.3	<i>Potencial de redução versus atividade quinase</i>	92
5	CONCLUSÕES	94
	REFERÊNCIAS	96

1 INTRODUÇÃO

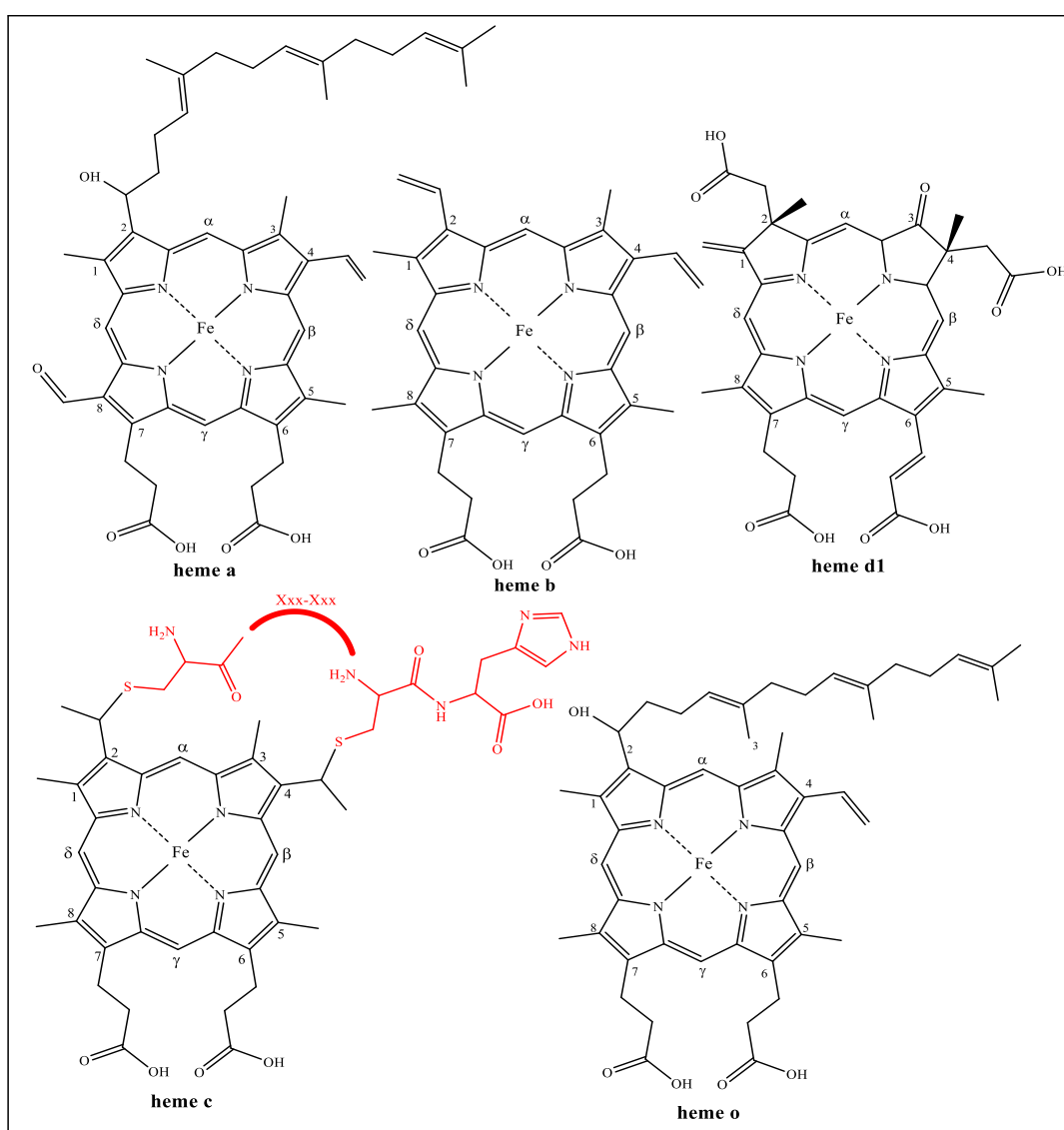
Nas últimas décadas diversas hemeproteínas têm sido extensivamente estudadas, e a elas atribuídas as mais variadas funções biológicas, tornando cada vez mais evidente a importância chave desta classe de proteínas em todos os reinos da natureza. Estas proteínas possuem um grupo prostético heme (ferro-protoporfirina IX), um dos mais encontrados na natureza, ilustrado na **Figura 1**.¹⁻⁴.

Diante da diversidade de enovelamentos em que o grupo heme se encontra é possível presumir sucessivas evoluções estruturais passadas por estes sistemas, de forma que uma mesma espécie química seja responsável pelas mais diversas funções. Este cofator está presente em diversos sistemas envolvidos em processos de transferência de elétrons, transporte e armazenamento de oxigênio, catálise, sensores de pequenas moléculas⁵. Sua abundância na natureza se deve a sua versatilidade funcional guiada por algumas propriedades que podem variar dependendo do sistema em que se encontra, como: variações na estrutura de coordenação do centro metálico (número e natureza de ligantes axiais coordenados), tipo de enovelamento em que está inserido, distribuição de grupos hidrofílicos/hidrofóbicos em seu microambiente, causando distorções na conformação de resíduos aminoácidos à sua volta, gerando afinidades bastante diversas de ligação deste grupo prostético a ligantes endógenos ou exógenos de cada sistema⁶⁻¹⁰.

O grupo heme consiste de quatro anéis pirrólicos ligados por grupos metil (α , β , γ , δ) formando uma porfirina e associada a um átomo de ferro (II ou III) no centro do plano coordenado aos quatro átomos de nitrogênio dos anéis pirrólicos. O grupo heme tipo *b* e *c* apresentam como substituintes grupos metila nas posições 1,3,5 e 8, grupos vinil nas posições 2 e 4, e grupos propionatos nas posições 6 e 7, que geralmente interagem eletrostaticamente com resíduos de aminoácidos da proteína. Além dos substituintes mencionados o grupo heme pode ainda possuir vários tipos de resíduos de aminoácidos coordenados ao átomo de ferro como ligante axial, também mencionando como ligante proximal¹¹. Três resíduos de aminoácidos são encontrados comumente nesta posição: histidina em globinas e peroxidases, tirosina em catalases e cisteína em cloroperoxidases e citocromo P450 mono-oxigenase¹². Para o grupo heme tipo *b* certamente a ligação do átomo de ferro ao ligante proximal é importante para o ancoramento deste cofator à proteína, entretanto, não é fundamental, como mostrado por Barrick¹³, que substituiu o resíduo histidina proximal por um resíduo glicina e adicionou imidazol livre ao meio de cultura durante a expressão da mioglobina na bactéria *Escherichia*

coli. Apesar disto a proteína incorporou o grupo heme tipo b. As mesmas substituições foram realizadas por McRee e colaboradores para a proteína citocromo c peroxidase¹⁴, onde se obteve o mesmo comportamento.

Figura 1 — Grupo prostético Heme (ferro-protoporfirina IX) tipo a, b, d1, c e o. Na estrutura do grupo heme tipo c encontram-se representados em vermelho o motivo comumente conservado CXXCH que se liga aos grupos vinis nas posições 2 e 4 do grupo heme. Os aminoácidos “XX” são altamente variáveis, todos os aminoácidos foram encontrados ocupando estas posições, exceto por cisteínas.



Fonte: O autor

A diferença mais marcante entre os grupos heme do tipo *b* e *c* se deve ao fato que o tipo *b* se liga não-covalentemente à proteína. Enquanto o grupo heme tipo *c* se liga

covalentemente a proteína via ligações tioéter entre resíduos de cisteína e grupos vinil nas posições 2 e 4 da porfirina. Outros grupos heme menos comuns são os tipos *dl*, *a* e *o* encontrados em citocromo *cdl* nitrito redutase, citocromo *c* oxidase e redutases bacterianas, respectivamente^{12, 15}. O grupo heme tipo *o* possui um grupo hidroxi-farnesil no lugar do grupo 2-vinil presente no grupo heme tipo *b*. O grupo heme tipo *a* possui um grupo hidroxi-etil-farnesil também na posição 2 e um grupo formil na posição 8. Além de possuir diferentes substituintes o grupo heme *dl* possui ligações saturadas em seus anéis pirrólicos.

1.1 Hemeproteínas sensoras

Um papel importante desempenhado por hemeproteínas sensoras é a regulação de respostas adaptativas, tendo como sinal moléculas gasosas. Em sistemas de hemeproteínas sensoras há um domínio¹ sinalizador contendo o grupo heme, o qual regula um domínio funcional, geralmente na mesma proteína. Assim, estas proteínas modulam respostas adaptativas baseado na flutuação nos níveis de sua molécula sinalizadora, comumente O₂, NO ou CO. Desta forma estes gases têm sido classificados como mensageiros biológicos. A maior parte destes sensores são constituídos por um domínio sensor heme N-terminal e um domínio funcional C-terminal. É importante ressaltar que os domínios nos quais o grupo heme se encontra nos diversos sistemas de hemeproteínas sensoras são bastante distintos entre si, assim como o domínio funcional acoplado a eles. Tais domínios sensores podem também ser encontrados em sistemas que não possuem o grupo heme utilizando assim outras estratégias de detecção de sinais biológicos.

O mecanismo de funcionamento de vários sistemas de hemeproteínas sensoras têm sido estudados^{4, 6, 16-19}. Estas hemeproteínas sensoras foram classificadas em famílias de acordo com o domínio em que o grupo heme se encontra, são elas: PAS (*Period, Arnt, and Sim*), GCS globina (*globin coupled sensor*), CoxA (CO oxidation Activator), HNOB (*heme-NO-binding*), GAF (*cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA*), LDB (*ligand binding domain*)⁴. Para cada uma destas famílias há ainda uma sub-divisão em relação ao tipo de domínio funcional com os quais o domínio sinalizador encontra-se acoplado para transdução de sinal. Estes domínios funcionais possuem atividades enzimáticas distintas moduladas pelo

¹ **Domínio:** cadeias polipeptídicas que seguem um padrão estrutural, independentemente estável e possui função específica no metabolismo proteico. Geralmente, os domínios conservam sua estrutura terciária nativa mesmo quando isolados. Um determinado domínio pode ser encontrado em diversos sistemas proteicos com funções distintas.

grupo heme (Ex. histidina-quinase, nucleotídeo ciclase, fosfodiesterase, etc) ou outras atividades não enzimáticas ²⁰. O domínio funcional pode atuar em funções tais como a interação DNA-proteína ou proteína-proteína, sendo reguladas pelo grupo heme ²¹. Estas hemoproteínas sensoras são encontradas em sistemas reguladores de fixação de nitrogênio, formação de biofilmes, aerotaxis, patogenicidade, degradação de RNA, entre outros ^{8, 22, 23}.

Para que estas proteínas desempenhem a função efetiva de sensor, o sistema deve I) se ligar ao seu sinal (ligante exógeno) em uma faixa de concentração apropriada ou fisiológica para ativar/desativar a proteína; II) ativar/desativar a atividade funcional da proteína ao se ligar ao seu sinal; III) discriminar sinais falsos quando fisiologicamente necessário e alterar sua conformação ao se ligar ao seu sinal verdadeiro ⁴.

No organismo o sistema sensor está sujeito à presença de diversos ligantes, não havendo quimicamente nada que impossibilite sua ligação ao grupo heme. Portanto, o sistema sensor precisa se ajustar de forma a excluir falsos sinais *in vivo*. A proteína sGC é um exemplo disto. Esta proteína é sensora de NO, detectando-o em níveis subnanomolares, e o faz através de sua capacidade de discriminar NO (e CO) mesmo na presença altos níveis de O₂, que poderia atuar como competidor eventualmente saturando seu sítio de ligação ⁴. Entretanto, em um sistema sensor de O₂ com baixas concentrações de NO e CO, por exemplo, o organismo não precisaria ter essa funcionalidade para prevenir saturação com NO ou CO. Portanto, a interação de um ligante ao sítio de ligação do grupo heme não indica que este seja o sinal verdadeiro daquele sensor, e sim a resposta adaptativa final atribuída a este sensor, como a expressão de genes que codificam enzimas necessárias para a sobrevivência daquele organismo em determinada condição ou interação com outra proteína, dentre outras funcionalidades desempenhadas por estes sensores. O fator de transcrição CoxA, por exemplo, é certamente um sensor de CO, uma vez que na presença deste ligante o sensor induz a expressão de genes necessários para que o microorganismo *Rhodospirillum rubrum* metabolize CO como uma fonte de carbono ^{3, 24-26}.

É importante ressaltar que até mesmo o fato de a atividade catalítica do sensor ser desativada por um certo ligante, isso não é indicativo definitivo de que este seja o sinal verdadeiro do sistema. Nos sistemas *R. rubrum* CoxA e *E. coli* Dos (*EcDos*, *DosP*) a oxidação do grupo heme inativa a atividade catalítica destes sistemas, entretanto, não se pode a partir dessa observação afirmar que estes seriam sensores redox, pois não há evidências de que estes sistemas sofram oxidação *in vivo*. Um outro exemplo disto são os sistemas FixL, que são sensores de O₂, sendo desativadas por este, porém, são desativados também na forma oxidada por CN⁻, apesar deste não estar presente na célula e obviamente não desencadear a expressão

dos genes atribuída a estes sistemas ^{21, 27}. Entretanto, é fundamental para o entendimento do mecanismo do sensor estudar estes ligantes ou condições que ativam/inativam os sistemas hemeoproteínas sensoras mesmo sem desencadear as respostas adaptativas atribuídas à eles, a fim de determinar o que ocorre quimicamente quando a proteína encontra-se inativa, o que desencadeia a formação de uma nova conformação da proteína ^{2, 3, 26, 28-30}.

1.2 Sistemas de dois components

As proteínas histidina quinase (HQ) são amplamente encontradas em organismos procariotos e em certos eucariotos, onde formam os sistemas de transdução de sinal de dois componentes, juntamente com o seu regulador de resposta (RR). Sistemas de dois componentes não estão presentes em mamíferos, devido a isto são considerados potencial anitobióticos¹⁶. O protótipo regulador de resposta possui dois domínios: domínio receptor e domínio de saída de sinal, que é bastante variável devido à vasta gama de funcionalidades que os sistemas de dois componentes podem estar envolvidos. Em muitos sistemas são sítios de ligação à DNA ou RNA e participam da ativação/repressão de genes específicos. Entretanto podem também atuar em interações proteína-proteína, proteína-ligante, ou ainda como enzimas^{16, 31-35}. Em alguns sistemas o regulador de resposta é composto apenas de domínio receptor, onde este desempenha também o papel do domínio de saída de sinal, como é o caso das proteínas CheY e Spo0F ^{16, 36}. Sistemas de dois componentes são os principais envolvidos em respostas a sinais ambientais em bactérias, controlando uma série de processos fisiológicos, como comunicação célula-célula, respostas adaptativas e patogêneses³⁷. Estes sistemas em geral possuem dois elementos funcionais, entretanto alguns sistemas não são fiéis ao termo pois possuem mais de dois componentes, como é o caso do sistema DevS/DosT/DevR da *Mycobacterium tuberculosis* ^{37, 38}.

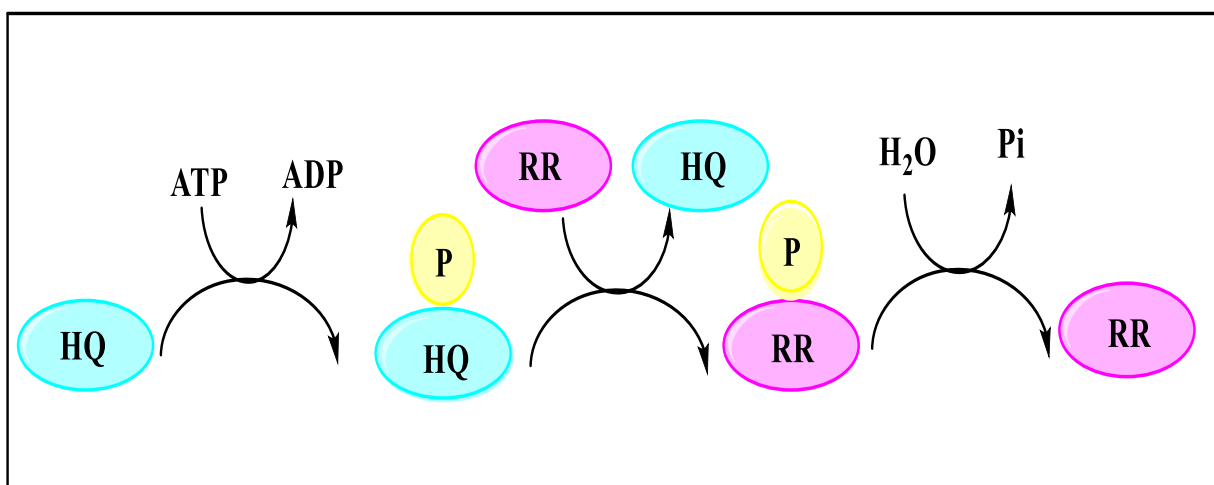
A proteína histidina quinase atua como um sensor de moléculas específicas que levam a ativação ou desativação da atividade quinase. Normalmente, são proteínas compostas por um domínio sensor, contendo um grupo heme que detecta o sinal e um domínio histidina quinase que responde a este sinal. Ao reconhecer a presença do ligante, a proteína histidina quinase transmite esta informação para a proteína reguladora de resposta através do processo de fosforilação, tornando-a ativa ou não, e esta desencadeará reações na célula ^{2, 16, 32, 34}.

A composição do sistema de dois componentes, natureza do sinal externo e reação desencadeadas na célula podem ser bastante diversas. Sistemas como FixL/FixJ, por exemplo,

possuem na FixL um domínio sinalizador (PAS), onde o grupo heme se encontra, responsável por modular a atividade enzimática do domínio funcional (histidina quinase) e no regulador de resposta, FixJ, constituído de um domínio receptor e, normalmente, outro domínio de associação ao DNA. Na família das hemeproteínas sensoras GAF temos um sistema dito de dois componentes composto por três proteínas, DevS/DosT/DevR, sendo os sensores DevS e DosT capazes de usar o mesmo regulador de resposta DevR, estas proteínas são também conhecidas como DosS/DosT/DosR, respectivamente. A proteína DevS possui três grandes domínios, sendo dois deles GAF seguidos pelo domínio funcional quinase; sendo que o primeiro domínio GAF é o responsável pela sinalização molecular contendo o grupo heme. Nas hemeproteínas histidina quinases até então estudadas a sinalização molecular se dá pela ligação reversível aos seus ligantes, tais como O₂, NO e CO. Ao se ligar (ou dissociar) a estas moléculas devem ocorrer alterações conformacionais inicialmente no microambiente do grupo heme induzidas pela interação do grupo heme com estes ligantes e propagada a outros domínios. Alterações conformacionais desempenham um papel muito importante na regulação de atividade fisiológica de sistemas proteicos, particularmente de sistemas sinalizadores, proporcionando uma diferente rede de interações entre os resíduos aminoácidos, que pode provocar a interação de resíduos importantes para a transdução de sinal.

A transdução de sinal nos sistemas de dois componentes se dá por meio da reação de fosforilação, que envolve três transferências do grupo fosforil (PO₃²⁻) e dois intermediários fosfo-proteína, ilustrados na **Figura 2**. Uma característica intrínseca dos sistemas de dois componentes é o uso de grupos fosfo-histidina e fosfo-aspartato como elementos de transdução de sinal. Proteínas quinase são fosfotransferases que quando em seu estado ativo catalisam a transferência de um grupo γ -fosforil do trifosfato de adenosina (ATP) para um resíduo histidina, seguida por uma reação de transferência do grupo γ -fosforil do resíduo histidina do sensor HQ para um resíduo aspartato do seu cognato regulador de resposta. O grupo fosforil transferido para os resíduos aminoácidos possui um pKa 6,7, portanto, possui uma carga 2- em pH neutro. Assim, um ânion divalente é gerado na estrutura proteica quando um aminoácido neutro (histidina/aspartato) é fosforilado. A estrutura terciária de uma proteína é mantida por ligações de hidrogênio e interações de Van Der Waals, portanto, a formação de um resíduo aminoácido carregado e adição de átomos extremamente eletronegativos à cadeia polipeptídica pode alterar significativamente a conformação alostérica da proteína na região onde a reação ocorre estabelecendo novas interações laterais na proteína, o que é um dos fatores responsável pela ativação do regulador de resposta e consequentes reações posteriores³³.

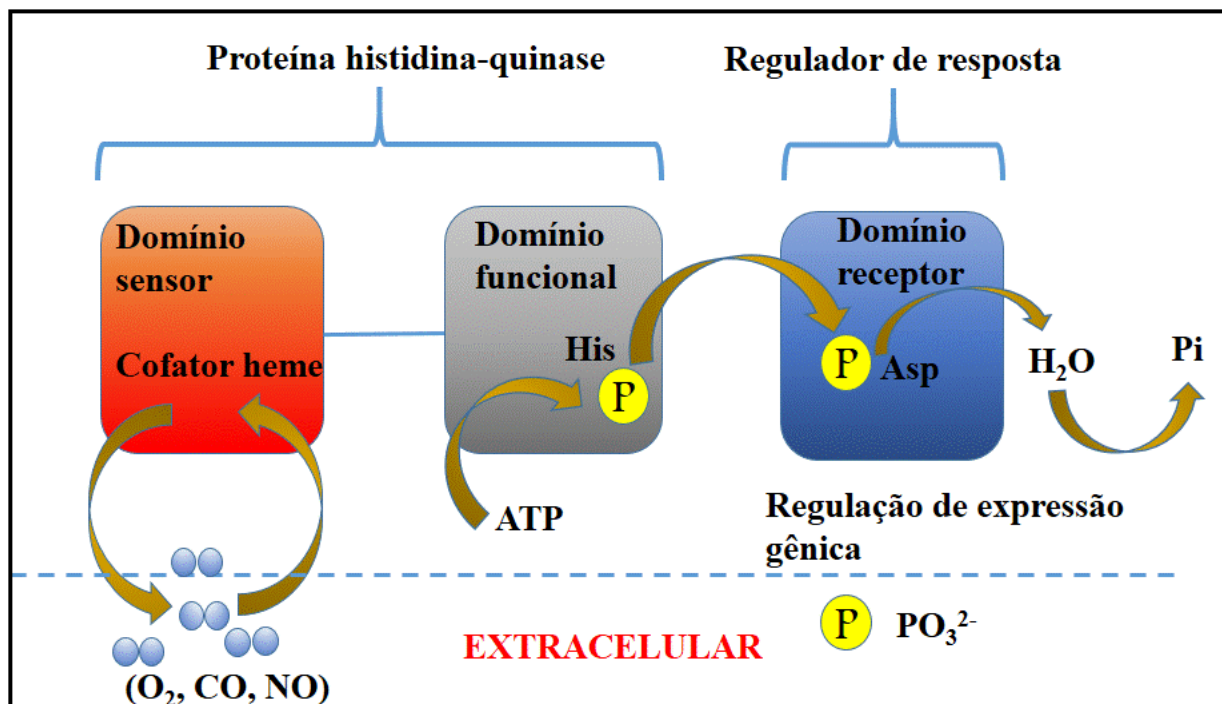
Figura 2 — Esquema ilustrativo da sequência de transferências do grupo fosforil (PO_3^{2-}). HQ: histidina quinase, P: fosforil, RR: regulador de resposta, Pi: fosfato inorgânico.



Fonte: O autor.

Nas proteínas quinase de organismos eucariotos a fosforilação ocorre em resíduos tirosina, serina ou treonina ³⁹. A **Figura 3**, apresenta um esquema da sequência de passos ocorridos no sistemas de dois componentes sistemas procariotos. Nesta representação tem-se todos os domínios das proteínas representados no interior da célula (citoplasma), como é o caso da proteína FixL (organismo *Rhizobium etli* e *Bradyrhizobium japonicum*). Entretanto alguns sistemas podem possuir parte de sua estrutura, especialmente o domínio sensor, localizada no exterior celular.

Figura 3 — Esquema ilustrativo do sistema de dois componentes. A figura apresenta os principais passos do sistema de dois componentes, onde um sinal extracelular é recebido pelo domínio sensor na proteína histidina quinase causando uma mudança conformacional, assim ativando/desativando a reação de autofosforilação ocorrida no resíduo histidina do domínio funcional seguida pela transferência do grupo fosforil para o resíduo aspartato do domínio receptor do regulador de resposta, tornando ativo/inativo para regulação gênica e subsequente desfosforilação



Fonte: O autor.

1.2.1 Arquitetura de domínios

Proteínas histidina quinase apresentam diferentes organizações modulares. Em cada caso utilizando domínios de entrada de sinal (sensores) que determinam os sinais/estímulos detectados pelo sistema em questão. O protótipo proteína histidina quinase é homodimérico constituído de domínio sensor extracitosólico presente entre dois segmentos transmembranares, como exibido na **Figura 4**. Cada promotor possui duas hélices transmembranares (TM1 e TM2). Seguidas pelo domínio HAMP (assim nomeado por ser comumente encontrado em *Histidine kinases*, *Adenyl cyclases*, *Methylaccepting chemotaxis proteins* e *Phosphatases*). Este domínio conecta TM2 ao domínio DHp (do inglês, *dimerization and histidine phosphorylation domain*), onde se encontra o resíduo histidina conservado a ser fosforilado.



O domínio catalítico (CA, *catalytic and ATP binding domain*), que se liga ao ATP e proporciona a transferência do grupo γ -fosfato do ATP para o resíduo histidina no DHp é conectado a este por hélice na posição C-terminal do domínio DHp. Juntos, os domínios DHp e CA são comumente chamados de domínio histidina quinase ou quinase *catalytic core*. Em uma outra configuração, menos comum para o domínio histidina quinase, o resíduo histidina conservado se encontra em um domínio designado HPt (*histidine phosphotransfer*) e um outro domínio é responsável pela dimerização. Esta configuração é encontrada em 5% dos sistemas identificados na base de dados SMART (conjunto de análise de 10000 proteínas histidina

quinase)³¹. A maior parte destas proteínas são relacionadas a sistemas de chemotaxis e se assemelham à proteína CheA.

Aproximadamente 25% das proteínas histidina quinase identificadas apresentam ainda uma outra variação de configuração modular, onde além de seus domínios usuais possuem um domínio receptor semelhante ao domínio receptor de seu regulador de resposta na posição C-terminal e um domínio HPt para múltiplas reações de fosfotransfência. O domínio HPt pode ser independente ou não do restante da proteína histidina quinase. Esta configuração permite que após a autofosforilação do resíduo histidina ocorra uma reação de fosfotransferência intramolecular para o aspartato no domínio receptor, seguida pela transferência do grupo γ -fosforil para um resíduo histidina no domínio HPt e a partir deste para o domínio receptor da proteína reguladora de resposta, que afetará a resposta de saída da proteína, criando assim um esquema sofisticado de fosfo-relay His-Asp-His^{31, 40}.

1.3 Estrutura e função de domínios

1.3.1 Domínio sensor

O domínio sensor é responsável por modular a atividade quinase. Este domínio pode estar localizado no citoplasma, membrana ou região extracitoplasmática. Normalmente, este domínio se encontra na posição N-terminal da proteína. Na maior parte das proteínas quinase o domínio sensor se encontra na região extracitoplasmática, entre duas hélices transmembranares, as quais transmitem a percepção de sinal extracelular através da membrana para os domínios citoplasmáticos, iniciando a regulação da atividade quinase. Sensores extracitosólicos possuem sequências bastante diversificadas. Apesar disto suas estruturas normalmente seguem um dos seguintes padrões: combinação de hélices α e folhas β , múltiplas hélices ou β -sanduíche^{41, 42}. No caso de proteínas histidina quinase que possuem regiões transmembranares o domínio sensor se encontra em posição N-terminal do primeiro segmento transmembranar ou após o último segmento transmembranar e antes do domínio histidina quinase. Algumas proteínas histidina quinase são encontradas integralmente no citoplasma. Os domínios sensores citoplasmáticos destas proteínas normalmente não possuem muitos motivos conservados ao longo das famílias. Alguns enovelamentos são, todavia, comumente encontrados em domínios sensores citoplasmáticos, tais como: PAS, GAF ou PHY. Estes domínios foram nomeados devido a ocorrência nos sistemas: *Period circadian*, *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*, and *Single-minded*, *cGMP-regulated nucleotide phosphodiesterases*, *Adenylate*

cyclases and the bacterial transcriptional regulator FhIA e Phytochrome. A maior parte dos domínios PAS são módulos sensores de oxigênio, redox ou luz, variando de acordo com o cofator incorporado na estrutura. Estes domínios podem mediar interações proteína-proteína ou se ligar à moléculas pequenas^{26, 43}.

O domínio PAS é um domínio pequeno, aproximadamente 100 aminoácidos, e possui poucos aminoácidos conservados em sua estrutura. Sendo identificado apenas dois motivos denominados S1 e S2 *boxes*, como pode ser visto no alinhamento feito para as proteínas do tipo FixL na **Figura 5**. O primeiro domínio PAS cuja estrutura de raios-X foi determinada tratava-se da proteína PYP (Photoactive Yellow Protein), em que apenas a S1 *box* foi conservada^{25, 29, 44}.

Figura 5 — Alinhamento das sequência do domínio heme-sensor das proteínas *Bradyrhizobium japonicum* Ryzobium etli FixL e Ryzobium meliloti FixL Os motivos conservados estão destacados nos retângulos vermelhos e os resíduos conservados e importantes para transdução de sinal encontram-se destacados em azul. O alinhamento foi processado no website <http://www.ebi.ac.uk> , utilizando a ferramenta Clustal Omega.

	S1 box
BjFixL	RETHLRSLHTIPDAMIVIDGHTIQLFSTAAERLFGWSELEAIGQNVNILMPEIPDRSRH
ReFixL	REHLSSILDTPDAMVVIDHKGTVLSFSKAAEKLFGMPSDQICGRNVSNLMPNPYRDAH
RmFixL	RDAHLRSILDTPDATVVSATDGTIVSFNAAAVROFGYAEEEVIGONLRILMPEPYRHEH
	S2 box
BjFixL	DSYISRYRTTSDPHIIGIGRIIVTGKRRDGTTFPMHLSIGEMQSGGEPYFTGFVRDLTEHQ
ReFixL	DGYIDHYIETGEKRIIGYGRVVTGCRADGSQFPMLHVGEEATANGERIFTGFVRDLTSRF
RmFixL	DGYLQRYMATGEKRIIGIDRVVSGQRKDGSTFPMKLAVGEMRSGGERFFTGFIRDLTRE
BjFixL	QTQARLQE---
ReFixL	KIEEDLRQAQK
RmFixL	ESAARLEQ---

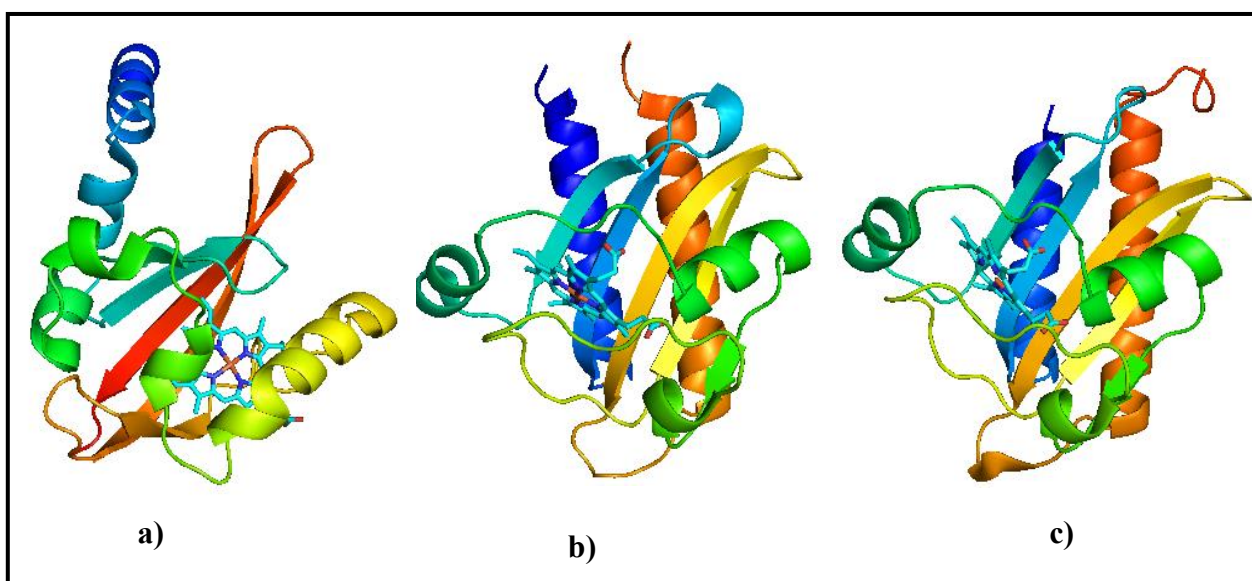
Fonte: O autor.

O domínio PAS da proteína BjFixL do organismo *Bradyrhizobium japonicum* foi o primeiro em que se encontrou ambos os motivos conservados. Entretanto não estão envolvidos no mecanismo regulatório da proteína. Possivelmente, os motivos conservados agem apenas na manutenção do enovelamento característico do domínio PAS^{2, 25, 43}.

A estrutura do domínio GAF é bastante conservada com 5 fitas β antiparalelas circundadas pela primeira e última hélice α e do outro lado por alguns *loops* e hélices curtas, como pode ser visualizado na **Figura 6**. O grupo heme é ligado no centro das fitas β , com o plano do anel porfirínico perpendicular às fitas β . O domínio PAS possui a mesma topologia

com as fitas β centrais, entretanto, diferentes hélices circundando-as. Outra diferença entre os domínios é a forma como o grupo heme se liga às fitas, com o plano paralelo às fitas β .

Figura 6 — Estrutura tridimensional do domínio sensor do N-terminal para C-terminal coloridos de acordo com o esquema de cores ROYGBIV. **a)** FixL do organismo *Bradyrhizobium japonicum* (PDB: 1LSW), **b)** DevS do organismo *Mycobacterium tuberculosis* (PDB: 2W3F) e **c)** DosT do organismo *Mycobacterium tuberculosis* (PDB: 2VZW). O grupo heme encontra-se destacado em modelo de traços.



Fonte: O autor.

1.3.2 Domínio histidina quinase

O domínio histidina quinase possui aproximadamente 350 aminoácidos e 6 motivos altamente conservados, como pode ser visto no alinhamento para algumas proteínas HQ na Figura 7. Dentre estes motivos apenas o *H box* se encontra no domínio DHp e todos os outros se encontram no domínio CA como sítios de ligação ao ATP. Uma exceção a isto é a proteína CheA do organismo *Thermotoga maritima* em que o motivo *H box* se encontra em um domínio auxiliar de fosforilação, HPt, próximo ao N-terminal ³⁶.

Figura 7 — Alinhamento das sequência dos domínios histidina quinase das proteínas FixL, FixL, PhoQ, PrrB, EnvZ, HK853, DesK e DevS. Os motivos conservados estão destacados nos retângulos vermelhos (Processado no website <http://www.ebi.ac.uk> , utilizando a ferramenta Clustal Omeg)

	Da1	H box	Da2	
CheA	-----VISQTVRVDIEKLDNLM DLMGELV-----		-----IA	26
ReFixL	-----GLAHDFNNLLTVISGNLEM----		IEDKLPPGSLRDILREAQAAAQDGAIL	46
BjFixL	-----ALAHDLNQPLAAISNYMKGSRRLLAGSSDPNT--		PKVESALDRAAEQALR	48
RmFixL	-----TLAHDLNQPLSAIANYSHGCTRLRLRMDDAVA--		TRIREALEEVAASQSLR	48
PhoQ	-----DLTHSLKTPLAVLQSTLRSLRSEKMSVS-----		D---AEPVMLEQISR	40
PrrB	-----VSSHDLRTPLTAMRTNLEVLSTLD--LP----		DDQRKEVLNDVIRTQSR	43
EnvZ	-----GVSHDLRTPLTAMRTNLEVLSTLD--LP----		ESINKDI-----EE	37
DesK	-----RDLHDTLGQKLSLIGLKS D LARKLIYKDP--		EQAARELKS VQQTARTSLNE	48
DevS	-VLTDRDRIARDLHDHVIRLFAIGLALQGAVPH-ERNP--		EVQQ-RLSDVVDLQDVIQE	56
			βA	α1
CheA	RSRILETLKKYNIKELDESLSHLSRITL DLQNVVMKIRMVPI SFVFNRFPRMVRDLAKKM			86
ReFixL	TGQLL---AFGRRQP-----		LNPKHADLGQLVTGFADLL-RRTLGE	83
BjFixL	AGQIIRRLRDFVARGE-----		SEKRVESLSKLIBEAGALGLAGAREQ	90
RmFixL	AGQIIKHLREFVTKGE-----		TEKAPEDIRKLVEESAALALVGSREQ	90
PhoQ	ISQQIGYYLHRASMRGGTLL-----		SRELHPVAPLLDNLT SALNKVYQ--	83
PrrB	IEATLSAL---ERLAQGE LST-----		SDDHVPVDITD LLDRAAHDAARI----	84
EnvZ	CNAII EQFIDYLR TGQ---E-----		MPMEMADLNAV LGEVIAAESGYER--	78
DesK	VRKIV-----		SSMKGIRLKD ELINIKQILEAADIMFIYE----	82
DevS	IRTTI-----		YDLHGAS---QGITRLRQRIDA A VAQFADSGLR T	92
	β1	βB	α2	N box
CheA	NK-EVNFMIRGEDTELDR-TFVEEIGEPLLHLLRNAIDH		GI EPKEERI AKGKPPIG---T	141
ReFixL	DI-KLSTIIDGSDLSVLV--DSSQLQNAILNIALNARDAM		PKGGSATT TISR VHLDADYA	140
BjFixL	NV-QLRFSLDPGADLVLA--DRVQIQQVLVNLFRNALEA		MAQSQRREL VVTNT P-----	141
RmFixL	GV-RTVFEYLPGAEMVLV--DRIQVQVVLINLMRNAIEA		MRHVDRELTIRTMP-----	141
PhoQ	-RKGVNISLDISPEISFV-GEQND FVEVMGNVLDNACKYC		-----LEFVEIS	128
PrrB	-YPDLDVSLVPSPTCIIV-GLPAGRLAVDNAIANAVKHGG		-----ATLVQLS	130
EnvZ	---ELETALYPGSIEVKM--HPLSIKRAVANMVVNAARYG		-----NGWIKVS	120
DesK	---E---EKWPENISLLNE---NILSMCLKEAVTNVVKHSQ		---AKTCRVD-----	121
DevS	---S---VQFVGPLSVVDSALADQAEAVVREAVSNAVRHAK		---ASTLTVR-----	134
	β3	G1 box	α3	F box
CheA	LILSARHEGNNVIEVEDDGR--GIDKEKIIRKAIEKGLIDESKAATLS DQEILN FLEVP			199
ReFixL	KMYPEVRSGNFVLVTMTDTGM--GMFEFVR-----		KRAIEP	174
BjFixL	-----AADDMIEVEVSDTGS--GFQDDVI-----		PNLEQT	169
RmFixL	-----ADPGEVAVVVEDTGG--GIPEEVA-----		GQLFKP	169
PhoQ	----ARQTD EHL YI VVEDDGP--GIPLSKR-----		EVIFDR	158
PrrB	----AVSSRAGVEIAIDNGS--GVPEGER-----		QVVEER	160
EnvZ	----SGTEPNRAWFQVEDDGP--GIAPEQR-----		KHLEQP	150
DesK	----IQQLWKEVVITVSDDGTFKGEENSFS-----			147
DevS	----VK-VDDDLCEI E VTDNGR--GLPDE-F-----			156
	ATP-lid	G2 box	α4	β4
CheA	GFSTKEK-VSEVSGRGVGM DVVKNVVESLNGSISIESEKDK-GTKVTIRLPLTL			251
ReFixL	FFTTKEV---GSGTGGLGLSMVYGFVKQSGGHLQLYSEVGR-GTTVRIYLPAVA			223
BjFixL	FFTTKDT---GNG--VGLSISRSII EAHGGRMWAE SNASG-GATFRFTLPAAD			216
RmFixL	FVTTKAS---GNG--IGLSISKRIE AHGGEMTVSKNEAG-GATFRFTLPAYL			216
PhoQ	GQRVDTL---RHGGVGLAVAREITEQYEGKIVAGESMLG-GARMEVIFGRQH			207
PrrB	FSRGSTA---SHSGSGLGLALVAQQAQLHGGTASLENSPLG-GARLVRLRPGPS			210
EnvZ	FVRGDSAR--TISGTGLGLAIVQRIVDNHNGMLELGT SERG-GLSIRAWLPVPV			201
DesK	-----KGHGLLGMRERLEFANGSLHIITENGT---			184
DevS	-----TGSGLTNLRQRAEQAGGEFTLASVPGASGTVLRWSAPLSQ			196

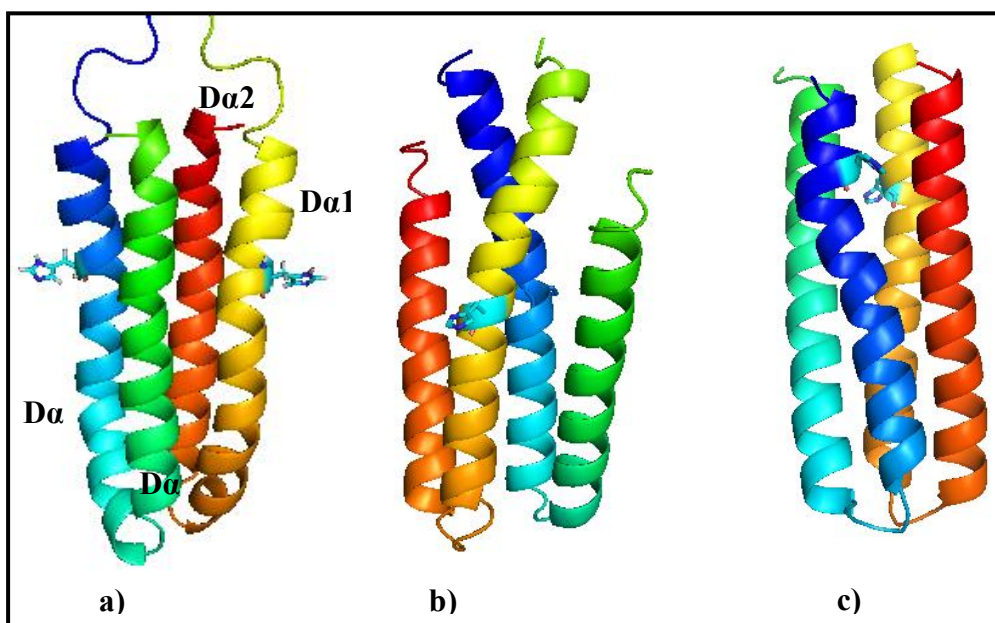
Fonte: O autor.

O enovelamento do domínio histidina quinase é diferente dos conhecidos para proteínas quinase homólogas que se fosforilam em resíduos serina, treonina ou tirosina, sugerindo que seu mecanismo seja também diferente destas proteínas, comumente encontradas em organismos eucariotos ^{16, 34}.

1.3.3 Domínio DHp (*dimerization and histidine phosphorylation domain*)

A sequência do DHp contém o fragmento *H box*, que é o que define as proteínas histidina quinase, além de participar do processo de dimerização. Este resíduo é o sítio de autofosforilação da proteína histidina quinase. É um resíduo altamente conservado. O domínio DHp antecede o domínio CA, normalmente, é composto de aproximadamente 120 aminoácidos. Várias estruturas deste domínio foram determinadas, a **Figura 8** apresenta algumas delas. ^{34, 41}.

Figura 8 — Estrutura tridimensional do domínio DHp coloridos do N-terminal para C-terminal no esquema de cores ROYGBIV. **a)** EnvZ do organismo *Escherichia coli* (PDB: 1JOY), **b)** Spo0F do organismo *Bacillus subtilis* e **c)** DesK do organismo *Bacillus subtilis* (PDB: 3EHF). O sítio de fosforilação histidina encontra-se destacado em modelo de traços na estrutura. As estruturas do domínio DHp das proteínas Spo0F e DesK são parte da estrutura completa do domínio histidina quinase (domínios DHp e CA)



Fonte: O autor.

A estrutura deste domínio é conservada na maior parte das proteínas HQ que tiveram sua estrutura determinada, consiste de duas hélices D α 1 e D α 2, que se dobram e assumem uma configuração anti-paralela, comumente chamada de helical *hairpin*, formando assim quatro hélices. Entretanto, apresentam algumas particularidades em termos de comprimento, orientação e pequenas irregularidades das hélices. Estas pequenas diferenças são o que gera as especificidades de cada um destes sistemas. A estrutura do domínio DHp da proteína EnvZ da bactéria *E. coli* foi determinada por RMN ⁴⁵ e mostra que suas hélices são relativamente retas em relação a outras proteínas desta família, como Spo0B, Desk e HK853. Entretanto até mesmo a proteína EnvZ apresenta uma torção na hélice D α 1 causada por um resíduo prolina. Esta torção é conservada em todas as proteínas histidina-quinase que tiveram sua estrutura determinada, até mesmo aquelas que não possuem resíduo prolina na posição equivalente. O sítio de fosforilação na proteína EnvZ (His243) é exposto ao solvente e encontra-se no meio da hélice D α 1, que possui uma flexibilidade maior que a hélice D α 2.

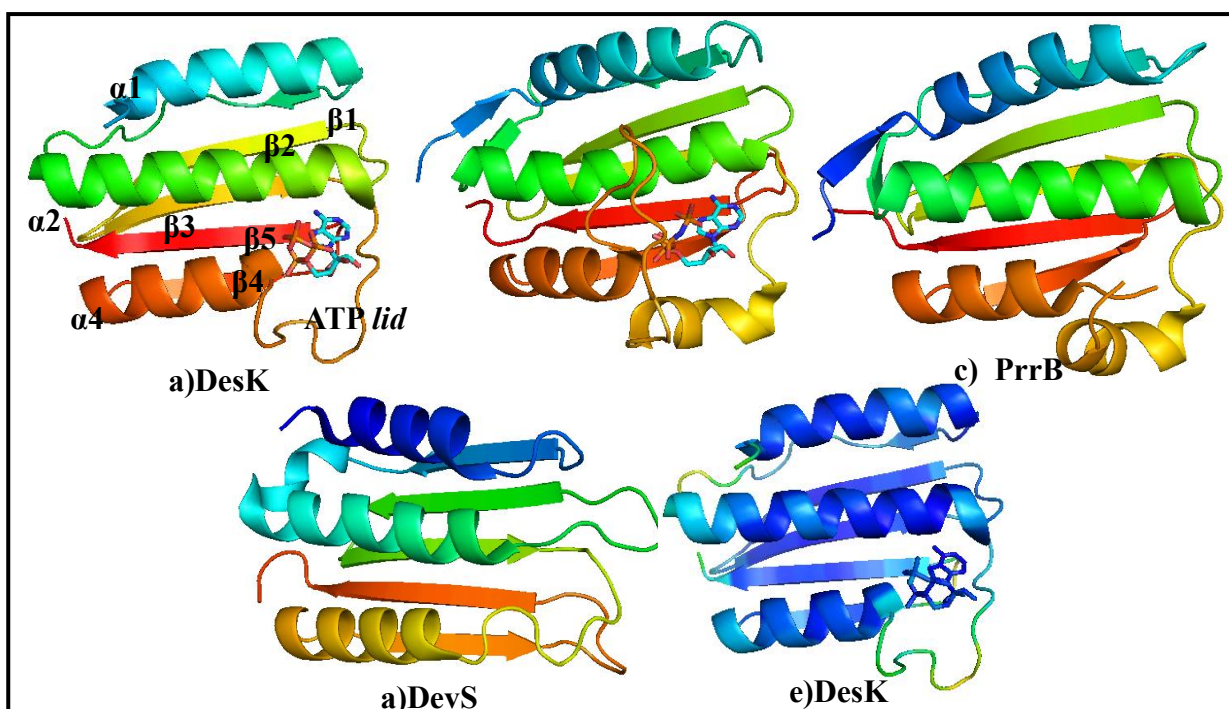
1.3.4 Domínio CA (*Catalytic and ATP binding domain*)

O domínio CA se liga ao ATP antes que este transfira o grupo fosforil para o resíduo histidina presente no domínio DHp. A sequência do domínio CA possui alguns motivos altamente conservados nas proteínas HQ: N, G1, F, G2 e G3 (Figura 7). A estrutura tridimensional destes domínios também é altamente conservadas. As estruturas secundárias α e β se alternam formando um enovelamento de duas camadas, uma formada pelas 5 fitas β e a outra pelas 3 hélices α . A estrutura deste domínio é semelhante a estrutura dos domínios ATPase das proteínas DNA gyrase B, MutL e Hsp90 ^{33, 34}. O sítio de ligação da molécula de ATP se encontra na extremidade do domínio se ligando aos motivos conservados N, G1, F, G2 e G3. Os motivos G1, F e G3 *box* interagem com adenosina e os motivos N e G2 *box* interagem tanto com adenosina como com o tri-fosfato-Mg²⁺. O ATP *lid* interage apenas com os grupos fosfatos e cátion divalente^{16, 39}.

A estrutura do domínio quinase (DHp e CA) da proteína PhoQ (*E.coli*) em um complexo com AMPPNP (adenosine 5'-(β , γ -imino)-triphosphate) foi resolvida por Marina e colaboradores ³⁹, o que elucidou muitos detalhes quanto ao funcionamento deste domínio em proteínas histidina quinase. A região entre os resíduos 429-439 forma o que tem sido denominado ATP-*lid*, que é fundamental para a ligação do domínio CA com ATP e também interação da molécula de ATP com o DHp para as reações de transferência do grupo fosforil. O ATP *lid* é um fragmento hidrofóbico que se fecha por meio de interação de alguns resíduos

deste fragmento a grupos presentes na molécula de ATP, estabilizando-a em seu sítio de ligação. Quando não há molécula de ATP ligada a este domínio esta região apresenta uma conformação aberta. Este comportamento é possível devido à alta flexibilidade dos resíduos presentes nesta região indicada pelo alto fator B desta sequência de resíduos (51,4 Å) em comparação com fator B médio do restante do domínio CA (23,4 Å). A **Figura 9e** exibe a estrutura do domínio CA da proteína DesK colorida em um gradiente de cores de azul a verde em função do seu fator B, retratando a discrepância dos valores de fator B para o ATP *lid* em relação ao restante do domínio. Os autores relacionaram esta alta mobilidade do ATP *lid* aos resíduos conservados de glicina.

Figura 9 — Estrutura tridimensional de domínios CA coloridos do N-terminal para C-terminal no esquema de cores ROYGBIV **a)** DesK do organismo *Bacillus subtilis* (PDB: 3EHG), **b)** PhoQ do organismo *Escherichia coli* (PDB: 1ID0), **c)** PrrB do organismo *Mycobacterium tuberculosis* (PDB: 1YS3), **d)** DevS do organismo *Mycobacterium tuberculosis* (PDB: 3ZXO) e **e)** DesK colorida de acordo com fator B, demonstrando a variação deste fator utilizando esquema de cores ROYGBIV. As proteínas DesK e PhoQ foram cristalizadas ligadas a ATP e AMPPNP, respectivamente. Estes compostos são exibidos em modelos de traços.



Fonte: O autor.

O motivo ATP *lid* se inicia com o resíduo fenilalanina da F *box* e seu resíduo C-terminal é um resíduo hidrofóbico (Leu-446 na PhoQ e Met-507 na CheA), estes dois resíduos interagem entre si formando um *cluster* hidrofóbico juntamente com os resíduos Ile-428, Leu-446 e Ile-460 na proteína PhoQ, na proteína CheA também foi observado este *cluster* hidrofóbico formado nesta região da ATP *lid*, entretanto, os aminoácidos presentes são Leu-486, Phe-487 (F *box*), Met-507 e Met-521. Na proteína EnvZ uma estrutura similar também foi identificada sendo formada pelos resíduos Phe-387, Leu-386, Ile-408 e Leu-420. Entre as proteínas FixL o resíduo fenilalanina da F *box* é conservado apenas nas proteínas RmFixL e BjFixL (Phe-448 e Phe-454, respectivamente), na proteína ReFixL o alinhamento das sequências mostra a presença de um resíduo também hidrofóbico, Ile-447 na posição equivalente. As estruturas tridimensionais das proteínas PhoQ e CheA mostram que apesar da diferença entre aminoácidos presentes no *cluster* hidrofóbico a distância entre resíduos equivalentes no ATP *lid* das duas proteínas é de apenas 10 Å e ambas exibem uma conformação fechada, indicando que a diferença na composição dos resíduos presentes neste *loop* não afeta sua função ³⁶. Isto sugere que este *cluster* hidrofóbico é uma característica conservada nas proteínas histidina quinase, apesar de não ser sempre composto pelos mesmos resíduos ^{36, 41, 46}.

O íon γ -fosfato se liga a cadeia polipeptídica por meio de ligações de hidrogênios à átomos da cadeia lateral dos resíduos Gln-443 e Arg-439 do ATP-*lid* e Lys-392 e Tyr-393 da N *box*. O β -fosfato se liga ao resíduo Arg-434 também por meio de ligação de hidrogênio. Com base nas observações quanto a sítios de ligação da molécula de ATP Marina e colaboradores ³⁹ substituíram os resíduos Lys-392, Arg-434 e Arg-439 por alanina a fim de verificar a importância destes resíduos na clivagem/estabilização do estado de transição da ligação do γ -fosfato ao ATP. As substituições foram feitas no domínio quinase como um todo, ou seja, na presença do domínio DHp. A substituição da lisina por alanina proporcionou um aumento significativo no K_m (40x) e um efeito menor no k_{cat} (diminuição da constante catalítica em 10x), sugerindo que este resíduo tem papel importante em termos de ligação ao substrato e catálise. O efeito em k_{cat} ao substituir a Arg-434 por alanina foi maior, com uma diminuição de duas ordens de magnitude na constante, enquanto, para o K_m esta substituição não provocou alteração significativa, sugerindo papel crítico deste resíduo na atividade catalítica, os autores sugerem que o grupo guanidina deste resíduo possa atuar na estabilização do estado de transição ou ainda que este grupo protone o β -fosfato. Interessantemente, a substituição da Arg-439 (que se liga diretamente ao grupo abandonador γ -fosfato) não causou alteração significativa no K_m ou k_{cat} . Os resíduos destacados como fundamentais no mecanismo de fosforilação da proteína PhoQ

são de certo modo conservados nas proteínas FixL e DevS como resíduos que por semelhança química podem desempenhar a função dos resíduos mencionados. Por exemplo, na proteína PhoQ os resíduos Arg nas posições 434 e 439 sendo aparentemente importantes em termos de catálise e ligação ao ATP nas proteínas *ReFixL*, *RmFixL* e DevS são substituídos por treonina e glicina, respectivamente, podendo desempenhar funções similares nestas proteínas. Entretanto a formação do ATP *lid* nas proteínas FixL, assim como a definição de resíduos importantes para catálise da transferência de grupo fosforil do ATP para o resíduo histidina no domínio DHp e determinação de resíduos que se ligam a ATP no domínio CA só serão elucidados quando a estrutura tridimensional deste domínio da proteína for resolvida. O alinhamento das sequências destas proteínas e similaridades funcionais às proteínas aqui citadas são apenas indicativos destes motivos e semelhante comportamento.

A proteína DevS e DosT tiveram a estrutura de seus domínios DHp e CA resolvidas. Cho e colaboradores ⁴⁷ estudaram diferentes formas truncadas da proteína DevS e DosT e confirmaram a previsão dada pelas sequências de ambas as proteínas de que não possuem o motivo ATP-*lid* presente na maior parte das proteínas histidina quinase, indicando que o mecanismo de ligação do ATP à estas proteínas ocorre de forma diferenciada. As estruturas cristalinas mostram que o domínio CA apresenta uma estrutura fechada impossibilitando a ligação do ATP. Foram estudadas formas das proteínas contendo o domínio histidina quinase completo (CA e DHp) e uma forma truncada contendo apenas o domínio CA. Os autores verificaram a atividade quinase das proteínas por meio de ensaios de fosforilação, as formas das duas proteínas foram utilizadas na presença de domínio DHp extra. Para ambas as proteínas apenas a forma contendo os domínios CA e DHp na mesma estrutura foi capaz de fosforilar o resíduo histidina no domínio DHp. Os autores sugerem que para que ATP se ligue ao sítio de ligação no domínio CA e a autofosforilação ocorra deve haver uma mudança de conformação do *loop* que conecta a folha $\beta 3$ e hélice $\alpha 3$, e esta mudança de conformação é provocada pela interação com o domínio DHp (quando na mesma molécula).

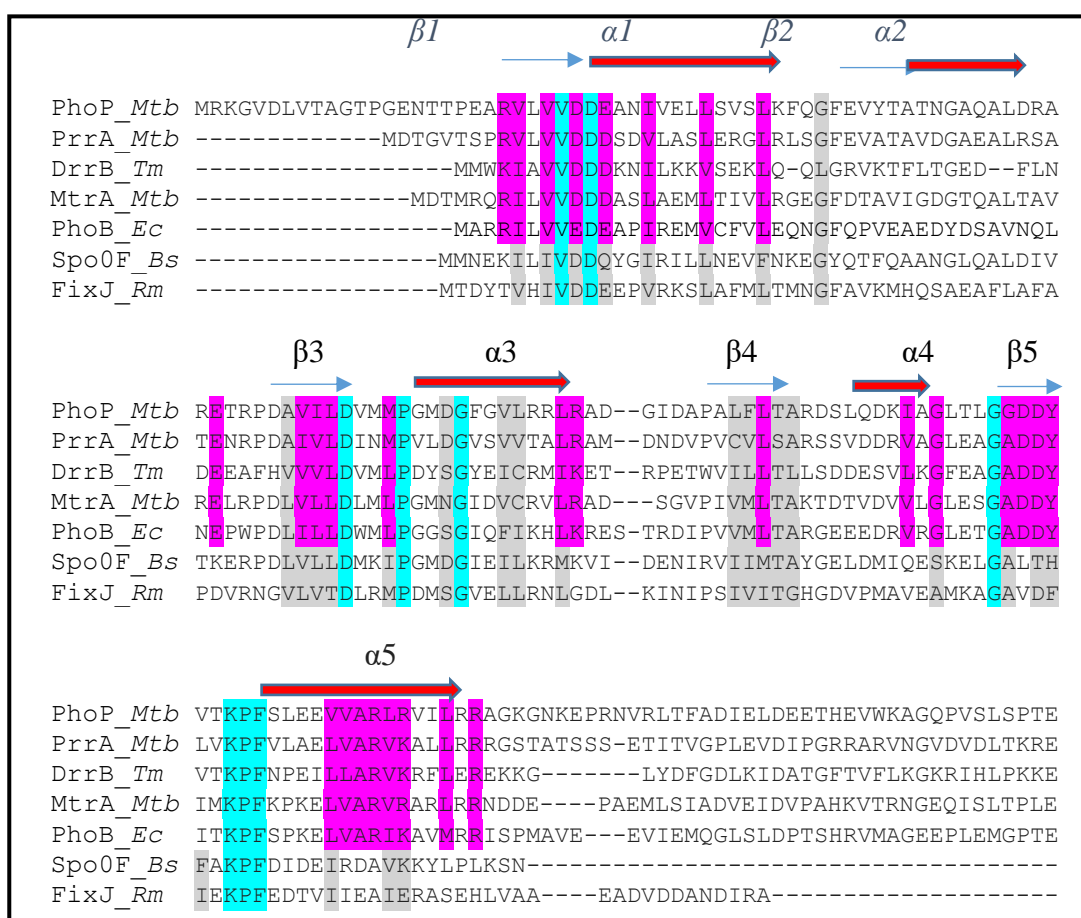
DevS tem um alto grau de flexibilidade e possui um resíduo carregado negativamente próximo ao sítio de ligação do ATP, Glu-537. Portanto, este resíduo poderia rotacionar e interagir com um resíduo positivo em suas proximidades. Os autores propõe que isto seria desempenhado pelo resíduo Arg-440 próximo a His-395 (sítio de fosforilação na DHp). Para mostrar isto os autores substituíram os resíduos Arg-440 e Glu-537 nos domínios DHp e CA, respectivamente, por um resíduo de cisteína. Assim, se houvesse formação de pontes dissulfeto

indicaria que estes resíduos são suficientemente próximos para interagir entre si. Desta forma, a função de proteger ATP de sofrer reações desnecessárias, que não fosforilação do resíduo histidina, desempenhada pelo fragmento ATP-*lid* em outras proteínas HQ; na proteína DevS este controle seria feito pela interação com o resíduo DHp assim uma alteração de conformação provocada favoreceria o ATP a se ligar ao domínio CA. Este efeito mimetizaria a função da ATP-*lid*.

1.3.5 Reguladores de resposta

As proteínas reguladoras de resposta dos sistemas de dois componentes apresentam sequência e estrutura bem conservadas entre as proteínas já estudadas, sugerindo um mecanismo de sinalização e transcrição semelhante entre os sistemas. Normalmente, os reguladores de resposta são proteínas pequenas, de aproximadamente 100 aminoácidos. O alinhamento das sequências de diversos reguladores de resposta apresenta regiões altamente conservadas em toda a classe, como pode ser visto na **Figura 10**. Um resíduo aspartato altamente conservado na fita $\beta 3$ é o fosfo-aceptor. Nas estruturas tridimensionais de diversos reguladores de resposta foi identificado um enovelamento $(\alpha\beta)_5$ conservado, **Figura 11**, que é formado alternando-se α -hélices e β -fitas com as β -fitas organizando-se na região interna deste microambiente, formando um *core* central hidrofóbico. Este *core* hidrofóbico é circundado pelas hélices $\alpha 1$ e $\alpha 5$ de um lado e $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$ do outro. A maior parte dos resíduos conservados estão na extremidade C-terminal das fitas $\beta 1$, $\beta 3$ e $\beta 4$. A hélice $\alpha 1$ está envolvida na ligação do RR à HQ. A estrutura e posição desta hélice é conservada em todos os RR, entretanto, no que diz respeito a sequência de aminoácidos os resíduos conservados são apenas os hidrofóbicos envolvidos no empacotamento do *core* hidrofóbico das fitas β . O sítio de fosforilação é localizado em um *cluster* ácido próximo ao C-terminal da fita $\beta 1$ e $\beta 3$. Na proteína CheY os carboxilatos de cadeias laterais deste *cluster* estão envolvidos na coordenação do cátion divalente, Mg^{2+} ou Mn^{2+} , que é essencial para reação de fosforilação. Estruturas do íon Mg^{2+} coordenado à proteína CheY mostram uma coordenação octaédrica do cátion envolvendo o Asp-57 (fosfo-aceptor), Asp-12, Asp-59 e três moléculas de H_2O ⁴⁸. A região $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ tem sido apontada como sendo importante para o desempenho da função do regulador de resposta

Figura 10 — Alinhamento da sequência de reguladores de resposta da subfamília OmpR/PhoB (PhoP, PrrA e MtrA do organismo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), DrrB do organismo *Thermotoga maritima* (Tm) e PhoB do organismo *Escherichia coli* (Ec)) e da subfamília NarL/FixJ (Spo0F do organismo *Bacillus subtilis* (Bs) e FixJ do organismo *Rhizobium meliloti* (Rm)). Resíduos idênticos estão marcados em resíduos altamente conservados na subfamília OmpR/PhoB estão marcados em e resíduos moderadamente conservados em todas as sequências estão destacados em . O alinhamento foi processado no website <http://www.ebi.ac.uk>, utilizando a ferramenta Clustal Omega.



Fonte: O autor.

A maior parte dos RR's da subfamília OmpR/PhoB formam dímero ao longo da região α4-β-5α5 quando no estado ativo. O alinhamento de suas sequências mostra também que esta porção é variável em termos de sequência, como pode ser observado na **Figura 10**. A sequência da hélice α5 é razoavelmente conservada na família OmpR/PhoB, o que não acontece na família NarL/FixJ. O comprimento das hélices e fita desta região varia entre as diferentes proteínas.

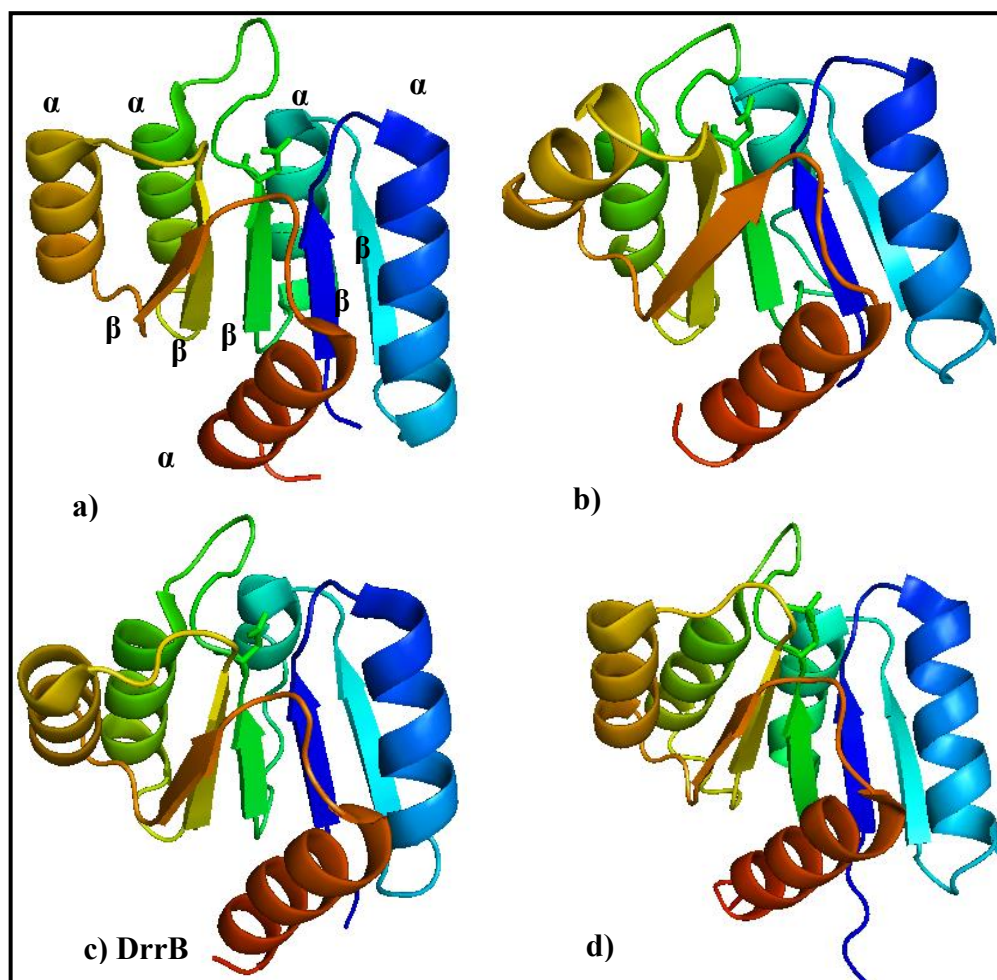
A ativação do RR pela reação de fosforilação desencadeia alterações conformacionais na região α4-β-5α5 acompanhadas por movimentos em dois resíduos chave, o segmento conservado

Thr/Ser na região C-terminal da fita $\beta 4$ e Tyr/Phe no meio da fita $\beta 5$. Na proteína não-fosforilada o resíduo Thr/Ser está orientado para lado contrário ao resíduo Asp acceptor e o resíduo Thr/Phe encontra-se orientado para lado externo da fita $\beta 5$. Ao ser fosforilado o resíduo Thr/Ser se move na direção do resíduo fosfo-Asp formando ligações de hidrogênio. O reposicionamento deste resíduo move também o loop $\beta 4$ - $\alpha 4$ e a hélice $\alpha 4$, tornando a conformação do resíduo Thr/Phe mais energeticamente favorável. Um resíduo Lys também conservado na família OmpR/PhoB forma uma ponte salina com o grupo fosforil proporcionando um deslocamento do loop $\beta 5$ - $\alpha 5$. Este resíduo lisina também forma ponte salina com o Asp fosfo-acceptor da proteína PhoP (Mtb) não-fosforilada. Aliado ao pequeno deslocamento que este resíduo proporciona na proteína fosforilada isto sugere que este resíduo é mais importante na estabilização do sítio ativo que em termos de alosterismo. As estruturas tridimensionais para os domínios receptores da Spo0F, PhoB, e DrrB encontram-se ilustradas **Figura 11**.

Em todos os reguladores de resposta o resíduo correspondente a Asp-13 em CheY é precedido por um resíduo ácido, usualmente um aspartato (ou glutamato) e sucedido por um outro resíduo ácido. A transferência do fosforil do fosfo-amidato (fosfo-histidina) envolve um ataque nucleofílico pelo fosforil-acceptor (aspartato) no átomo de fósforo combinado com um ataque eletrofílico pelo próton. A configuração de resíduos aminoácidos no microambiente do RR CheY proveria ambos o nucleófilo fosfo-acceptor (íon carboxilato, Asp) e um próton de aspartato ou glutamato não ionizado ³³.

O resíduo fosfo-aspartato possui baixa estabilidade tanto em meios ácidos como alcalinos. A energia livre de hidrólise é bastante negativa, o que levou alguns autores a assumirem que a energia liberada pela hidrólise do fosfo-Asp seja gasta para efetuar as mudanças conformacionais necessárias para ativar o fator de transcrição, o que o difere do sensor histidina-quinase que ao se fosforilar altera a atividade da proteína apenas por efeitos eletrostáticos locais ³⁴.

Figura 11 — Estrutura tridimensional de domínios receptores coloridos do N-terminal para C-terminal no esquema de cores ROYGBIV. **a)** Spo0F do organismo *Bacillus subtilis* (PDB: 1PEY), **b)** PhoB do organismo *Escherichia coli* (PDB: 1B00), **c)** DrrB do organismo *Thermotoga maritima* (PDB: 3NNS).



Fonte: O autor.

1.4 Proteínas histidina quinase FixL

O sistema de dois componentes FixL-FixJ foi reportado pela primeira vez como sensor de oxigênio em 1991⁴⁹, quando Gilles-Gonzalez e colaboradores coexpressaram os genes das proteínas FixL e FixJ do organismo *Rhizobium meliloti* em um mesmo plasmídeo. As proteínas foram expressas em sistema heterólogo utilizando como célula de expressão a bactéria *Escherichia coli*.

A proteína FixL possui um cofator heme tipo b em um de seus domínios PAS. Em condições de aerobiose o oxigênio inibe a atividade quinase da proteína FixL. O mecanismo de inativação da proteína se inicia com alterações conformacionais no microambiente do grupo

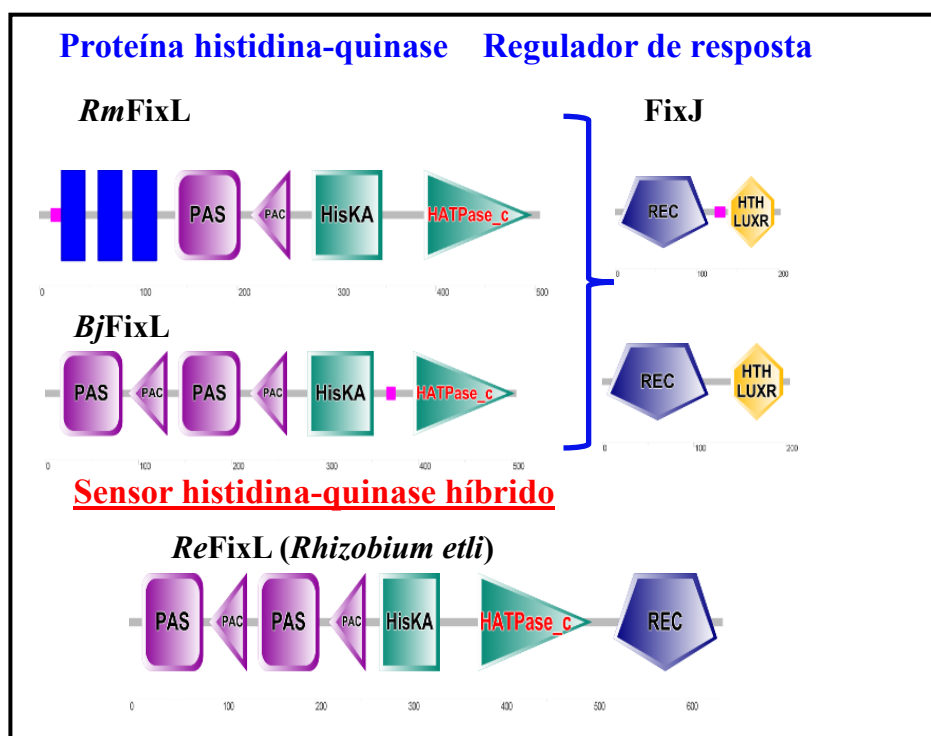
heme ocasionadas quando este grupo se liga ao O₂, CN⁻ e imidazol. O mecanismo pelo qual esta informação é transmitida para o domínio quinase ainda não foi totalmente elucidado.

O sistema FixL-FixJ é um sistema sensor de oxigênio onde estas proteínas regulam adaptação microaeróbica por meio da interação do fator de transcrição gênica FixJ com sequências de DNA específicas que induzem a expressão de genes necessários à sobrevivência do organismo em hipóxia e desempenho de suas funções. Este sistema pode desempenhar três funções, que não são necessariamente mútuas nestes organismos, I) habilitar o organismo a sobrevivência sob privação de oxigênio por meio da expressão de genes que codificam oxidases necessárias para respiração microaeróbica ⁵⁰, II) restringir a expressão de genes para a fixação de nitrogênio (*nix e fix*) em condições aeróbicas, e III) limitar a expressão de genes de enzimas de denitrificação a condições de hipóxia. Assim, a condição de anaerobiose leva este organismo a induzir a expressão de um ou mais genes. A proteína *RmFixL* desempenha as duas primeiras funções listadas, enquanto a proteína *BjFixL* desempenha apenas a primeira e terceira função. A função mais comumente desempenhada por estes sistemas é a expressão de genes que codificam oxidases para respiração aeróbica³.

Os sistemas FixL dos organismos *Bradyrhizobium japonicum* e *Rhizobium meliloti* têm sido largamente estudados e auxiliaram na resposta de várias questões importantes quanto ao comportamento de hemeproteínas pertencentes a classe de sistemas de dois componentes ^{9, 50-52, 53}. *BjFixL* e *RmFixL* compartilham de várias similaridades estruturais, entretanto, apresentam algumas diferenças como em termos de organização de domínios, afinidades à ligantes e fatores que inativam sua atividade quinase. *BjFixL* catalisa a reação de autofosforilação seguida pela transferência do grupo fosforil para o seu regulador de resposta *BjFixJ* tanto em sua forma *deoxi* (Fe^{II}) como no estado *met* (Fe^{III}), enquanto a forma *oxy* (Fe^{II}-O₂) e cianomet (Fe^{III}-CN) são estados desativados da proteína ⁵⁴. Por outro lado, *RmFixL* é ativa apenas no estado *deoxi*, e assim como para *BjFixL* no estado *oxi* e cianomet o sensor quinase encontra-se inativo. Curiosamente, na forma *met-RmFixL* o sensor quinase catalisa a reação autofosforilação do seu resíduo histidina, mas não catalisa a reação de transferência deste para o resíduo aspartato no RR. Estruturalmente, não há razão clara para que isto ocorra, uma vez que não há diferença significativa na conformação da proteína em suas formas *deoxi* e *met*, assim como ocorre para *BjFixL*, apesar de existir outro domínio PAS na *BjFixL* inexistente na *RmFixL*. Entretanto esta peculiaridade não tem relevância do ponto de vista fisiológico já que no citoplasma celular a proteína existe apenas em sua forma reduzida ³. Em relação a organização dos domínios, *BjFixL* é uma proteína solúvel que contém dois domínios PAS

seguidos por um domínio histidina-quinase e seu grupo heme está localizado no segundo domínio PAS. Enquanto *RmFixL* possui um segmento transmembranar seguido por um domínio PAS e histidina-quinase. Porém, *RmFixL* tem sido estudada sem este segmento transmembranar, como uma proteína solúvel truncada. Uma ilustração desta organização de domínios é exibida na **Figura 12**. Para ambas as proteínas o grupo heme está ligado a um resíduo histidina como ligante axial e possuem dois importantes resíduos arginina (R206 e R220 na *BjFixL* e R200 e R214 na *RmFixL*) envolvidos na transdução de sinal e ligação do grupo heme ao oxigênio. O mecanismo de transdução de sinal da FixL tem sido associado a mudanças conformacionais no microambiente do grupo heme (resíduos distais), alterando contatos com grupos propionatos e levando a diferença de distorsão do anel porfirínico.

Figura 12 — Organização de domínios em na proteína FixL do organismo **a) *Rhizobium etli***, **b) *Bradyrhizobium japonicum*** e **c) *Sinorhizobium meliloti***. Organização de domínios gerado pelo website <http://smart.embl-heidelberg.de/>.



Fonte: O autor.

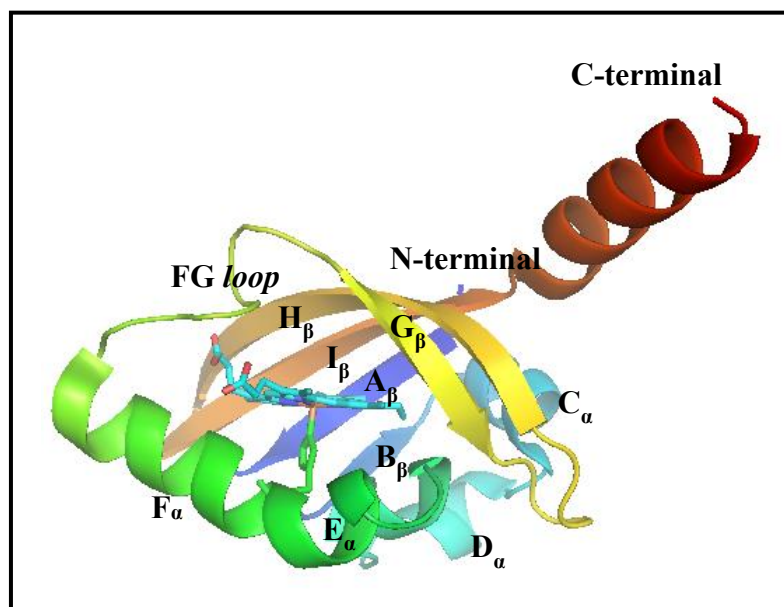
A primeira estrutura cristalina das proteínas FixL foi determinada por Gong e colaboradores⁴³. Os autores determinaram a estrutura cristalina da proteína *BjFixLH*² (domínio

² *BjFixLH*: forma truncada da proteína FixL do organismo *Bradyrhizobium japonicum* contendo apenas o segundo domínio PAS da proteína FixL, onde o grupo heme se encontra.

hémico) nos estados met-*BjFixLH* (Fe^{III}), em que a proteína encontra-se ativa, e cianomet-*BjFixLH* ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}$), que assim como O_2 inativa a atividade quinase da proteína.

A característica estrutural dominante da proteína *BjFixLH* são as 5 fitas β antiparalelas que acomodam o grupo heme. Os autores descrevem a estrutura como uma luva de mão esquerda em que os dedos seriam formados pelas fitas β (resíduos 155–168 and 235–255), a palma pelas hélices α (resíduos 170–215) e o dedo polegar pelas fitas β (resíduos 220–234). A única distorção a este modelo seria a hélice α C-terminal que se liga ao domínio quinase, que é uma região rica em resíduos glutamina, comumente chamada *Q-linker*. Os elementos estruturais foram nomeados de acordo com suas posições na sequência da proteína e estrutura secundária associada, **Figura 13**. Os autores atribuíram a este enovelamento o fato de o domínio PAS assumir diferentes funções com diferentes cofatores sendo ancorados a esta estrutura em diferentes sistemas sensores em que é encontrado (ex. *bacteria*, *archae* e *eukarya*)²⁹.

Figura 13— Nomenclatura proposta para elementos da estrutura tridimensional do domínio heme-PAS da proteína *BjFixL* (PDB: 1LSW).

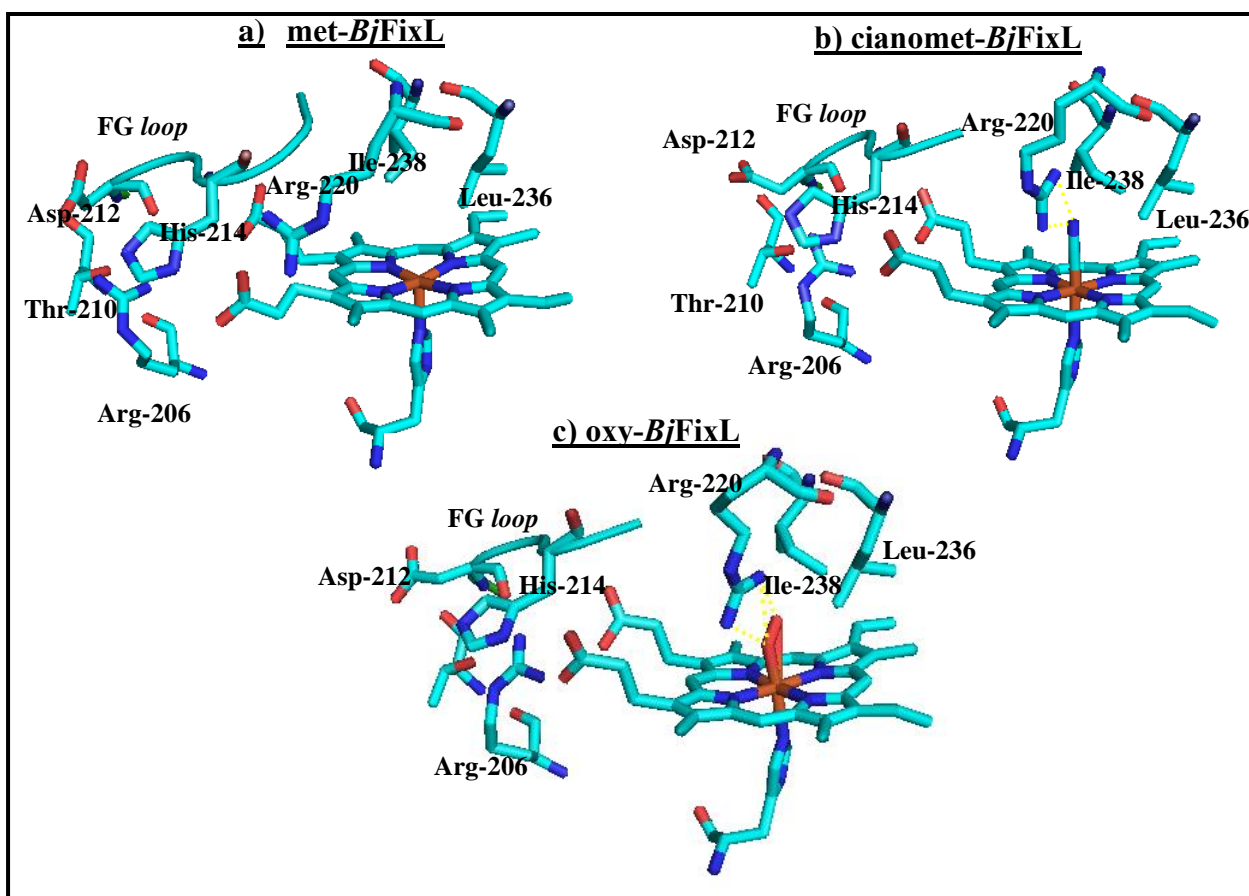


Fonte: O autor.

O microambiente do grupo heme é primariamente hidrofóbico, com os resíduos Val-188, Met-192, Tyr-203 e Ile-204 orientando a His-200 proximal que se liga ao átomo central de ferro na posição axial. O interior hidrofóbico do sítio ligante é circundado por Leu-236 e Ile-238 na fita β $\text{H}\beta$ e por Ile 215. Apesar da hidrofobicidade do microambiente este se torna acessível para grupos hidrofílicos por meio de um canal com 3 moléculas de H_2O interagindo com o resíduo Arg-220.

Ao se ligar a cianeto os grupos da cadeia lateral dos resíduos distais Leu-236 e Ile-238 se movem para acomodar o ligante. As maiores alterações detectadas na conformação da proteína com o cianeto se mostram na região do loop FG (Ser-211 a Ile-215). Ao se ligar a cianeto o anel porfírinico sofre também alterações em sua planaridade. Esta alteração é transmitida ao restante da proteína por meio de uma rede de interações entre os grupos propionatos do grupo heme e os resíduos His-214, Ile-215, Arg-206 e Thr-210 (His-214 e Ile-215 pertencentes ao FG *loop* e Arg-206 e Thr-210 pertencentes à hélice F_α). O resíduo His-214 é conservado em todas as proteínas FixL, como histidina ou arginina, como pode ser observado no alinhamento das sequências do domínio heme-PAS das proteínas FixL exibido na **Figura 5**. Ambos os resíduos possuem um nitrogênio protonado que pode formar ponte salina com o grupo propionato. De fato, este resíduo interage com ambos os propionatos e passa por alterações quando cianeto se coordena ao grupo heme. O nitrogênio Nδ1 do anel imidazólico do resíduo His-214 forma ponte salina com o propionato 7, alternando apenas entre oxigênios no mesmo grupo quando alternando da forma met para cianomet-*Bj*FixL. Ambos os oxigênios do propionato 6 formam ligações de hidrogênio com His-214 quando na forma met-*Bj*FixL. Ao se ligar ao cianeto um dos oxigênios passa a formar ligação de hidrogênio com o nitrogênio do resíduo Arg-206 da hélice F_α, que na forma met-*Bj*FixL forma ligação de hidrogênio e interações iônicas com o carbonil da cadeia principal e carboxilato de cadeia lateral do resíduo Asp-212, respectivamente. Ao se ligar ao cianeto, o resíduo Arg-206 perde a interação iônica com o carboxilato do resíduo Asp-212, pois passa a interagir com o propionato 6. E devido à perda de interação com o Asp-212, o resíduo Arg-206 sofre uma rotação que proporciona uma ligação de hidrogênio com o carbonil do resíduo Thr-210, desta forma gerando uma comunicação de uma das extremidades da hélice F_α com o FG *loop*. apresenta os rearranjos estruturais ocorridos no grupo heme quando coordenado à cianeto e oxigênio. Todas as alterações conformacionais mencionadas quando analisadas na forma global do FG *loop* estão provocando um afastamento deste *loop* em relação ao grupo heme, gerando uma conformação aberta ⁵⁵.

Figura 14— Rearranjos estruturais do grupo heme da proteína a) BjFixL (PDB: 1DRM) em decorrência da associação dos ligantes b) CN⁻ (PDB: 1LT0)e c) O₂ (PDB 1DP6).



Fonte: O autor.

Baseando-se nestas alterações conformacionais localizadas quando se passa de um estado ativo (*met-BjFixLH*) para um estado inativo (*cyanomet-BjFixL*) os autores propuseram que o mecanismo de sinalização do grupo heme para domínio funcional histidina quinase pode estar relacionado à interação entre o domínio histidina quinase e o *FG loop*. Esta proposta vem sendo estudada nos últimos anos. Em estudo posterior Gong e colaboradores⁵⁴ fizeram um alinhamento por meio de mínimos quadrados de todas as estruturas então estudadas e constatou que o C_α de todas as estruturas possuem uma variação de posicionamento de 0,2 Å, exceto pelos C_α presentes no *FG loop*, onde a variação de posição é de ~2,0 Å. No mesmo estudo os autores determinaram a estrutura cristalina da proteína *BjFixLH* ligada ao seu sinal fisiológico O₂ e comprovaram que as alterações na conformação dos grupos propionatos, resíduos do *FG loop* e Arg-206 são também observadas neste sistema e ocorrem em maior magnitude que na forma *cyanomet-BjFixL*⁴³.

Uma outra diferença marcante nas estruturas da cianomet-*BjFixLH* e *oxi-BjFixLH* é a existência de um ligante distal na estrutura da forma *oxi-BjFixL*. Os autores observaram que na forma *oxi-BjFixL* o grupo guanidina do resíduo Arg-220 (G_{β}) rotaciona em direção ao microambiente do grupo heme e forma uma ligação de hidrogênio com o ligante O_2 . Esta interação requer uma rotação de 170° em torno do eixo da ligação $C_{\alpha}-C_{\beta}$ ⁵⁴. Simultaneamente, provocada pela alteração conformacional ocorrida no FG *loop* o grupo carbonil do resíduo Ile-218, que na forma met- *BjFixL* está voltado para o solvente, rotaciona em direção ao microambiente do grupo heme formando uma ligação de hidrogênio com uma molécula de H_2O . Esta molécula de H_2O também forma uma ligação de hidrogênio com um dos nitrogênios do grupo guanidina da Arg-220. Possivelmente esta interação atua na estabilização deste resíduo, o qual é conservado em todas as proteínas FixL conhecidas e é o único resíduo polar no microambiente do grupo heme³⁰. Na forma cianomet-*BjFixLH* Gong e colaboradores⁵⁴ não observaram a formação de nenhuma ligação de hidrogênio com o ligante CN^- , o microambiente distal seria formado apenas por resíduos hidrofóbicos: Ile-215, Ile-216, Val-222, Met-234, Leu-236 e Ile238. Entretanto em publicação posterior o mesmo grupo de pesquisa motivado pelos indícios da contribuição deste resíduo Arg-220 na regulação da atividade quinase revisou sua estrutura cristalina. Neste estudo foi possível observar a quebra da ponte salina entre Arg-220 com o propionato 7 do grupo heme e formação da ligação de hidrogênio entre um dos hidrogênios do grupo guanidina da Arg-220 com o ligante CN^- ⁵⁵.

A fim de determinar a importância do resíduo Arg-220 na regulação de sinal da proteína *BjFixL* Dunham e colaboradores³⁰ estudaram uma forma mutante da proteína onde o resíduo Arg-220 foi substituído por um resíduo alanina, este mutante foi nomeado R220A *BjFixL*. Esta proteína teve as menores afinidades por O_2 ($K_d = 1,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e CN^- ($K_d = 16 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) já determinadas para domínios heme-PAS³⁰. Por outro lado, a mutação não influenciou na afinidade da proteína por CO ou NO. Em se tratando de atividade catalítica a proteína R220A *BjFixL* foi 3-4 vezes mais ativa que *BjFixL* em ambos os estados de oxidação. Ao se ligar a CN^- a proteína R220A *BjFixL* apresentou um fator de inibição da atividade catalítica de apenas 2 vezes frente a um fator de inibição de 50 vezes para *BjFixL*. Todavia, devido à baixa afinidade, a forma *oxi* R220A *BjFixL* não se formou em quantidade apreciável impedindo a medida da atividade catalítica na forma saturada, somente sendo possível comparar com a forma ligada a cianeto. Curiosamente, CO e NO provocam um fator de inibição de 2 vezes, enquanto na proteína *BjFixL* não apresentam qualquer influência. Estruturalmente, a retirada do resíduo arginina provocou a perda da comunicação entre grupo heme e FG *loop*. Na

forma não ligada da proteína R220A *BjFixL* no estado férrico esta não apresentou interação de resíduos presentes na região distal do grupo heme com seus propionatos e na forma ligada a CN^- ou O_2 não foi observada qualquer interação destes ligantes com resíduos distais do grupo heme, por consequência houve uma perda de interações entre resíduos distais com o *FG loop*. Desta forma, a perda das interações dos ligantes que possivelmente inativam a proteína (R220A *BjFixL*) provocou uma resposta global nas interações sofridas pela proteína culminando na fraca inativação da atividade catalítica da proteína por ligantes reconhecidamente desativadores deste sistema. Devido a apolaridade do ligante O_2 a associação deste ligante ao grupo heme não deveria ser afetada de forma tão significativa apenas devido a formação de uma ligação de hidrogênio com um resíduo arginina. Além disto, o fato de ter sido observada inibição da atividade catalítica, mesmo que muito menor que na proteína *BjFixL*, para a proteína R220A *BjFixL* mostra que arginina é importante na regulação da atividade, mas não é o único fator desencadeante das alterações conformacionais necessárias à desativação da proteína.

Uma possível causa da necessidade de uma interação do resíduo Arg-220 com o ligante seria a estabilização do ligante frente ao microambiente altamente hidrofóbico por meio de efeito estérico, desta forma estabilizando o estado inativo da proteína ⁵⁵.

Enfatizando a influência de fatores estéricos na ligação ao grupo heme Gong e colaboradores ⁵⁴ determinaram a estrutura da proteína *BjFixL* em sua forma ligada a imidazol. Assim como nas formas met-*BjFixL* e cianomet-*BjFixL* a forma imz-*BjFixL* mostra alterações conformacionais na região do *FG loop*. Uma molécula de água localizada na região distal estabelece ligações de hidrogênio com o resíduo Ile-218 e com anel imidazólico do ligante distal, enquanto o grupo guanidina do resíduo Arg-220 encontra-se direcionado para fora do microambiente do grupo heme. Como esperado a ligação do imidazol requer uma reorganização da estrutura da proteína para acomodação do ligante. Esta reorganização é estabelecida essencialmente pelos resíduos Ile-215 e Ile-238. O *FG loop* por sua vez é afastado do grupo heme devido ao deslocamento do resíduo Ile-215.

Na tentativa de verificar a importância da ligação de hidrogênio formada entre o nitrogênio do imidazol e H_2O Hao e colaboradores ⁵⁵ utilizaram metil-imidazol como ligante, uma vez que no lugar do hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel imidazólico tem-se um grupo metil, impossibilitando a ligação de hidrogênio com a H_2O . Inicialmente foi proposto que a ligação de hidrogênio entre o nitrogênio do imidazol e a mesma molécula de H_2O que interage Ile-218 (*FG loop*) estaria contribuindo para uma rede de interação que possibilitaria comunicação entre o grupo heme e *FG loop*, de forma análoga ao que ocorre com Arg-220 nas

formas *oxi* e cianomet-*BjFixLH*. Entretanto a estrutura determinada para a proteína *MeIm-BjFixL* revela que apesar de não haver formação de ligação de hidrogênio com o anel imidazólico com a molécula de H_2O a alteração conformacional observada no *FG loop* para a forma *Imz-BjFixL* é mantida, indicando que esta alteração não é essencial para alteração conformacional.

Foi proposto anteriormente por Gilles-Gonzalez e colaboradores⁵⁰ que a propriedade que regularia a atividade catalítica da proteína *FixL* seria a alteração de estado de spin do átomo de ferro do grupo heme. Os autores relataram que compostos de alto spin gerariam a conformação ativa da proteína e compostos de baixo spin gerariam a conformação inativa. Isto foi suportado por alguns anos por evidências de que O_2 , CN^- e imidazol inativam a proteína^{3, 43, 50, 54}. Entretanto a atividade catalítica da proteína *BjFixL* foi determinada em sua forma *CO-BjFixL* e *NO-BjFixL* por Hao e colaboradores⁵⁵. Foi observado que a proteína permanecia no estado ativo, apesar de ambos serem ligantes de campo forte e gerarem compostos de baixo spin. As estruturas da proteína na forma *CO-BjFixL* e *NO-BjFixL* corroboram com os ensaios de atividade enzimática. Para ambas as estruturas não foram observadas alterações conformacionais no *FG loop* e o resíduo Arg-220 permanece na mesma posição em que se encontra na proteína não ligada.

1.4.1 *FixL* híbrida do *Rhizobium etli*

Mais recentemente, uma nova *FixL* do organismo *Rhizobium etli* (*ReFixL*) começou a ser estudada. Esta se trata de uma hemeproteína sensora e histidina quinase híbrida, que adicionalmente aos domínios citados anteriormente para proteínas *FixL*, possui um domínio receptor bastante similar ao de seu substrato *FixJ* na posição C-terminal. Portanto, este sistema promove a autofosforilação do resíduo histidina seguida pela transferência do grupo fosforil para o resíduo aspartato em seu domínio C-terminal, assim, tornando possível o estudo de ambos os fenômenos na mesma proteína. A estrutura desta proteína ainda não foi resolvida, entretanto, por meio de alinhamento das sequências das proteínas *ReFixL* e *BjFixL* (resíduos 1-490) observou-se que as proteínas são 49,5% similares e 33% idênticas. Resíduos conhecidos por influenciar na afinidade da proteína *BjFixL* por O_2 foram conservados na proteína *ReFixL*, sendo eles His-193, His-199, His-280, Arg-213, análogos aos resíduos Arg-206, His-200, His-291 e Arg-220 na proteína *BjFixL*, respectivamente. No domínio receptor foi conservado o resíduo Asp-573, encontrado na posição 55 e 54 nos RR *BjFixJ* e *RmFixJ*, respectivamente. Similarmente à *BjFixL*, esta proteína é solúvel e contém dois domínios PAS seguidos, onde no segundo encontra-se um grupo heme, assim como nos outros sistemas *FixL*.

Dentre as proteínas FixL, *ReFixL* é a que se tem menos informações a respeito. Dentre os poucos estudos realizados destaca-se o trabalho de Sousa e colaboradores ²³, onde foi feito um estudo comparativo das formas nativa (*ReFixL*), uma forma truncada da proteína (Δ PAS1 *ReFixL*), onde foi retirado o primeiro domínio PAS1 e a forma mutante D573N *ReFixL*, onde o resíduo Asp-573, possível resíduo fosforilado pelo resíduo fosfo-histidina, foi substituído por um resíduo aspargina não fosforilável. As três formas estudadas da proteína são homodiméricas em seus estados ativo e inativo, indicando que as alterações conformacionais regulatórias não influenciam na estrutura quaternária da proteína. A proteína *ReFixL* se comporta de forma similar à outras proteínas FixL, entretanto, com algumas particularidades observadas. *ReFixL* mostrou a mais baixa afinidade por oxigênio vista para um sensor de oxigênio ($K_d=738 \mu\text{mol L}^{-1}$). Porém, apesar da baixa afinidade por oxigênio, *ReFixL* apresenta excelente regulação por oxigênio, mesmo em ar, onde ele se mostra apenas 26% saturada com O_2 , e a atividade histidina quinase é totalmente desativada. Na presença dos ligantes NO e CO, a proteína é facilmente saturada, entretanto, a regulação de sinal por estes ligantes é muito baixa, mantendo a proteína basicamente ativa. A remoção do domínio PAS1 (forma Δ PAS1) e substituição do resíduo Asp-573 (forma D573N) por aspargina influenciou positivamente na afinidade da proteína por oxigênio, com um aumento de 8 e 2 vezes, respectivamente, o que levou os autores a afirmarem que os domínios PAS1 e domínio receptor C-terminal devem interagir de alguma forma diretamente com o domínio heme-PAS. Uma outra diferença importante entre os sistemas *BjFixL* e *ReFixL* seria a presença de um resíduo histidina na região distal do grupo heme da proteína *ReFixL*, enquanto na *BjFixL* esta posição é ocupada por um resíduo arginina. No sistema DosP na *E coli* esta posição também é ocupada por um resíduo histidina, entretanto, a afinidade da proteína por O_2 é aproximadamente 10 vezes maior que a da proteína *ReFixL*, portanto, este não pode ser o único fator determinante desta diferença de afinidades ¹⁰.

A remoção do domínio PAS1 aboliu a reação de fosforilação da proteína, enquanto a substituição do resíduo Asp-573 por aspargina apenas tornou a reação de autofosforilação pronunciadamente mais lenta que na forma nativa, sendo também perdida regulação. Desta forma, os autores concluíram que a remoção do grupo PAS1 manteve a proteína na sua forma inativa com perda de sua capacidade de regulação, bem como a mutação D573N, entretanto neste último caso a proteína foi mantida majoritariamente na sua forma ativa.

1.5 Eletroquímica de sistemas hemeproteínas sensoras

Uma propriedade importante das hemeproteínas que não tem sido bem explorada é seu potencial de redução padrão, E^0 . Para estudos de potencial em sistemas biológicos normalmente

utiliza-se a nomenclatura denominada por Leonor Michaelis para potencial de meia altura E_m (*midpoint potential*), diferente da usada para sistemas químicos, E^0 , devido as condições para potencial de redução padrão não serem aplicáveis a estes sistemas. Deste ponto em diante esta nomenclatura será utilizada neste documento para potencial de redução de proteínas. Na família PAS apenas *BjFixL* e *EcDOS* tem seus potenciais de redução conhecidos, e estes foram determinados apenas para o domínio heme-PAS isolados ^{7, 9}. Ballandi e colaboradores ⁹ determinaram o E_m da proteína *BjFixLH* e suas formas mutantes. As mutações foram escolhidas de forma a modificar as interações eletrostáticas no resíduo Arg-220, assim, este resíduo foi substituído pelos resíduos isoleucina (R220I), ácido glutâmico (R220E), glutamina (R220Q) e histidina (R220H). Os perfis espectroscópicos dos mutantes foram muito semelhantes ao da proteína *BjFixLH*, exceto para o mutante R220H, que apresentou o comprimento de onda máximo da banda Soret no estado oxidado em 408 nm em pH 7,4, que remete a possível coordenação de uma molécula de H_2O . Curiosamente, os autores observaram que em pH 3,8 o perfil assemelhava-se ao da proteína *BjFixLH*. De fato, os dados de espectroscopia de ressonância Raman mostram que possivelmente em pH 7,4 a proteína encontra-se coordenada à uma molécula de H_2O e o resíduo His-220 deprotonado formando uma ligação de hidrogênio com água ⁹. Entretanto em pH 3,8 o resíduo encontra-se protonado e não há formação da ligação de hidrogênio, desestabilizando a ligação levando a forma pentacoordenada. O E_m determinado para este mutante foi 40 mV, que assemelha-se ao da proteína *SWMb*, que similarmente encontra-se hexa-coordenada no estado férrico e penta-coordenada no estado ferroso ¹⁹. O E_m medido para as formas *BjFixLH*, R220I, R220Q, R220E *BjFixL* foram de 68 mV, 38 mV, 41 mV e 24 mV, respectivamente. Assim, a substituição do resíduo arginina positivamente carregado pelos resíduos neutros de isoleucina e glutamina provocaram uma diminuição do potencial de aproximadamente 30 mV. Enquanto a substituição pelo resíduo de ácido glutâmico provocou uma diminuição de cerca de 45 mV no potencial de redução da proteína, sendo atribuído a deprotonação do ácido glutâmico.

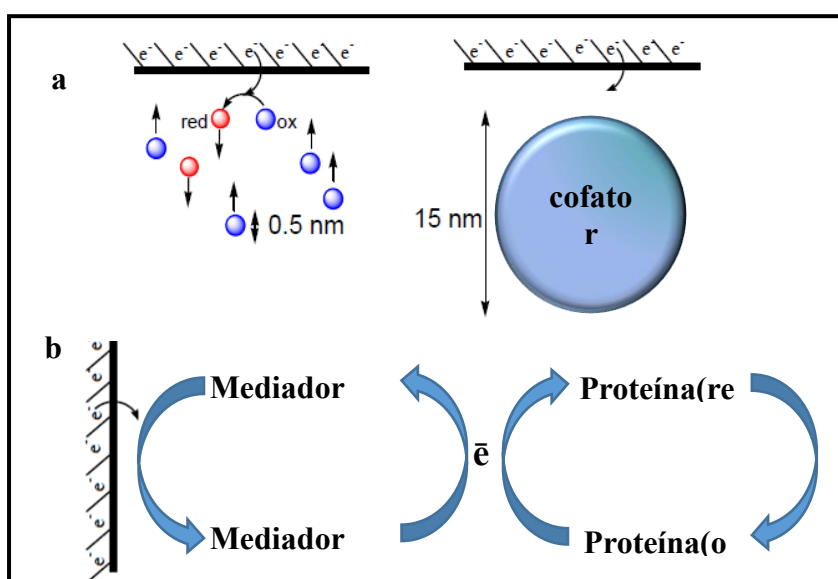
O estudo eletroquímico destes sistemas é particularmente relevante para embasar seu papel como sensores. Além disto, informações importantes em relação ao microambiente e ligantes axiais do grupo heme podem ser obtidas utilizando técnicas eletroquímicas ^{6, 7, 56-58}. Apesar da maior parte dos sistemas de hemoproteínas sensoras possuírem em sua estrutura um grupo heme do tipo b, pode existir uma diferença significativa em seu potencial de redução. Estas diferenças dependem largamente da coordenação da estrutura, número de ligantes, tipos de ligante axial, hidrofobicidade/hidroflicidade do microambiente do grupo heme, interações

do grupo heme com resíduos aminoácidos, distorções e efeito estérico. Adicionalmente, o grupo heme desencadeia mudanças conformacionais que são fortemente relacionadas com o enovelamento do sensor, o que possivelmente causa variações em seu potencial de redução. Portanto, o entendimento desta relação é fundamental para a elucidação do mecanismo de transdução de sinal. Apesar disto, apenas alguns estudos eletroquímicos foram realizados para sistemas de hemeproteínas sensoras, e a maior parte deles apenas para o domínio isolado do grupo heme, o que pode ter diferença significativa em relação a proteína inteira, especialmente quando esta encontra-se ligada a determinados ligantes que causam mudanças conformacionais no domínio quinase. Entretanto, a determinação do potencial de redução destes sistemas, especialmente sistemas maiores que 10 kDa, não é simples quando comparada a estudos eletroquímicos de moléculas inorgânicas ou orgânicas. Devido ao seu tamanho, a difusão de uma proteína a superfície eletródica é bastante limitada, refletindo seus baixos coeficientes de difusão, geralmente com 1 ou 2 ordens de magnitude menores que moléculas pequenas. Com isto o acompanhamento da reação de transferência de elétrons heterogênea é comprometido pelo controle difusional. Uma alternativa é a adsorção da proteína à superfície eletródica modificada a fim de favorecer a interação da proteína com o eletrodo^{59, 60}. Esta metodologia é comumente chamada de eletroquímica direta ou PFV (*Protein Film Voltametry*). Nesta metodologia é empregada uma quantidade muito pequena de proteína (normalmente menor que 1 pmol/cm^2)⁵⁹, o que é bastante atrativo nesta linha de pesquisa, uma vez que a obtenção de proteínas é bastante dispendiosa em custo e tempo. O filme da proteína normalmente é estável e pode ser utilizado por horas para aquisição de dados, em alguns casos com o apropriado armazenamento pode ser utilizado por dias ⁶¹. O sucesso desta metodologia nem sempre é atingido. Algumas dificuldades típicas encontradas são: orientação da proteína de forma que a reação de transferência de elétrons ocorra, quantidade de proteína adsorvida ser suficiente para observação de corrente (especialmente para sistemas não-catalíticos), estabilidade do filme, alteração de propriedades da proteína pelo eletrodo e no caso de sistemas enzimáticos, que o substrato e produto da enzima não sejam eletroativos. Uma abordagem viável em casos que não é possível o estudo do potencial de redução da proteína por reação de transferência de elétrons heterogênea é o uso de moléculas de baixa massa molecular como mediadores redox, que são capazes de sofrer reação de transferência de elétrons heterogênea com a superfície eletródica e reação de transferência de elétrons homogênea com a proteína em solução, estabelecendo rapidamente o equilíbrio. Todavia, esses agentes devem ser estáveis em sua forma reduzida e oxidada, estabelecer equilíbrio de transferência de elétrons homogênea rápida com a proteína, não possuírem intensas bandas espectroscópicas na mesma região das bandas da proteína e

possuírem potencial de redução próximo ao da proteína em estudo. A **Figura 15** apresenta uma ilustração do uso de mediadores redox.

Os mediadores historicamente mais utilizados para este fim são moléculas orgânicas como benzoquinonas, naftoquinonas, diaminas aromáticas, viologênicos^{62, 63}. A maior parte destes mediadores sofrem reação de transferência de dois elétrons, com exceção dos viologênicos, que possuem sua reação de dois elétrons com um grande intervalo entre o potencial do primeiro e segundo processo redox, sendo possível estabilizar apenas o primeiro processo de 1 elétron⁶². Do ponto de vista prático é mais vantajoso que se tenha um mediador com uma reação de transferência de elétrons simples, pois se considerarmos o termo pré-logarítmico da equação de Nernst (59 mV/n) têm-se a variação de potencial de $\pm 59 \text{ mV}$ em relação ao E^0 do mediador para cada variação de 10 vezes na razão das concentrações das formas oxidada/reduzida do mediador. Este valor define a faixa de potencial na qual um mediador é capaz de estabilizar o potencial da solução. Enquanto um mediador com processo de transferência de dois elétrons possui uma faixa de estabilização de potencial de apenas $29,5 \text{ mV} \pm$ em torno de seu E^0 ^{63, 64}. Em uma titulação espectroeletroquímica deve-se manter sempre o menor número possível de mediadores, respeitando-se suas devidas faixas de trabalho. Com isto torna-se mais vantajoso o uso de mediadores com transferência de apenas 1 elétron.

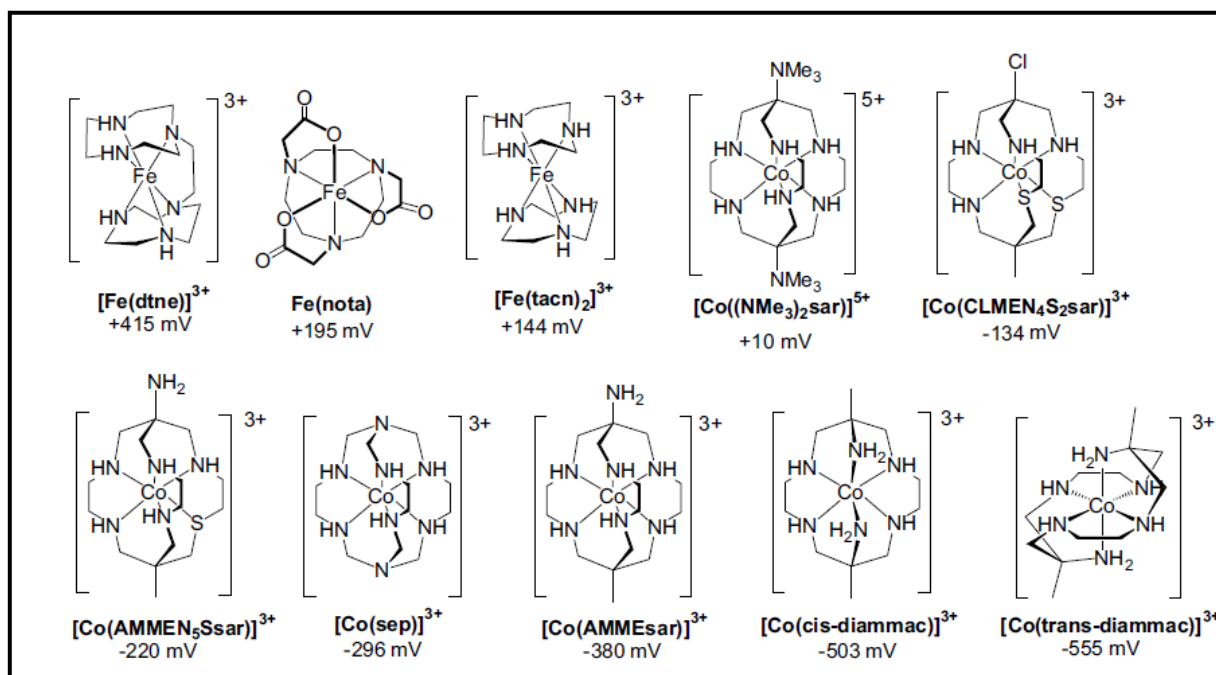
Figura 15 — **a)** Ilustração comparativa de uma reação de transferência de elétrons para moléculas pequenas e proteínas e **b)** Ilustração do uso de mediadores para estudo de reação de transferência de elétrons de proteínas.



Fonte: O autor.

Uma nova classe de mediadores vem sendo utilizada nos últimos anos, que são baseados em compostos de coordenação. Normalmente, estes compostos sofrem reação de transferência de elétrons simples. São facilmente utilizados em soluções aquosas, com faixa de potencial determinada pela reação de oxidação da água e redução de prótons em pH de interesse biológico. Bernhardt e colaboradores ⁶⁴ sintetizaram complexos metálicos de cobalto e ferro (**Figura 16**), cujos processos redox abrangem uma faixa de aproximadamente 1000 mV (415 mV a -555 mV). Uma característica interessante destes complexos é que os ligantes utilizados são macrocíclicos, diminuindo a possibilidade de interações laterais com a proteína ou substituição de ligantes em ambos os estados de oxidação do complexo, o que prejudicaria a reversibilidade do processo. Uma vantagem adicional dos complexos utilizados são suas baixas absorptividades na região do visível. A maior parte das suas transições são pouco intensas do tipo d-d ($\epsilon < 1\,000\text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$), enquanto cromóforos como grupo heme, flavinas, *clusters* Fe-S possuem $\epsilon > 10\,000\text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$ ⁶⁰. Isto possibilita sua utilização em relativamente altas concentrações em relação à proteína em questão, o que não é possível quando se utiliza mediadores orgânicos. Desta forma esses compostos tornam-se bastante úteis na determinação do potencial de redução de proteínas com baixa absorptividade molar.

Figura 16 — Mediadores redox reportados por Bernhardt e colaboradores ⁶⁴ e seus respectivos potenciais redox em pH 7,0.



Fonte: Referência ⁶⁰

Entre os compostos da série pode-se observar que há um intervalo de potencial (+150 a -150 mV) que não foi bem coberto pelos mediadores reportados. Em publicação recente Bernhardt e colaboradores sintetizaram novos complexos para a série preenchendo o intervalo citado. Foram utilizados complexos de Co^{III} com doadores N_3S_3 . O potencial destes complexos foi ajustado para a faixa de potencial desejada por meio da substituição de ligantes axiais para o complexo $[\text{Co}(\text{XMeN}_3\text{S}_3\text{sar})]^{n+}$ ($\text{X} = -\text{NO}_2, -\text{Cl}, -\text{NH}_2, -\text{OH}$ e $-\text{NMe}^+_3$), que satisfatoriamente cobrem a região de potencial +200 a -200 mV⁶⁰.

Os mediadores citados podem ser utilizados em potenciometria ou espectroeletroquímica, onde a proteína é gradativamente reduzida/oxidada por meio da aplicação de potencial utilizando a técnica de cronoamperometria e, simultaneamente, determina-se a concentração da espécie oxidada e reduzida utilizando uma técnica espectroscópica como espectroscopia UV-Vis, ressonância paramagnética eletrônica (EPR) ou dicroísmo circular⁶⁴.

Na presença das espécies reduzida e oxidada, a medida da absorbância da solução torna possível a determinação das concentrações das espécies, cuja coexistência é determinada pela presença de um ou mais ponto isobéstico. Uma combinação das leis de Nernst e Lambert-Beer leva à uma equação em que a absorbância da solução é função do potencial da solução^{64,57}.

Considerando-se um sistema com reação de transferência de elétrons simples entre as espécies oxidada (ox) e reduzida (red)



Para este sistema a absorbância em qualquer comprimento de onda é uma medida da concentração relativa das espécies oxidada e reduzida se aplicada a lei de Lambert-Beer, em que a concentração e coeficiente de extinção das espécies oxidada e reduzida são referentes ao mesmo comprimento de onda. A presença de um ou mais pontos isobésticos suporta a equação abaixo:

$$\text{Abs} = \varepsilon_{\text{ox}}c_{\text{ox}} + \varepsilon_{\text{red}}c_{\text{red}} \quad \text{Equação 2}$$

A concentração total da espécie é dada pela soma das formas oxidada e reduzida

$$c_{\text{tot}} = c_{\text{ox}} + c_{\text{red}} \quad \text{Equação 3}$$

A equação de Nernst relaciona as concentrações das espécies oxidada e reduzida com o potencial da solução e seu potencial formal $E^{0'}$:

$$E = E^{0'} + \frac{59}{n} \log \frac{c_{ox}}{c_{red}} \quad \text{Equação 4}$$

Rearranjando a equação 4:

$$c_{ox} = c_{red} 10^{n(E-E^{0'})/59} \quad \text{Equação 5}$$

Substituindo a equação 5 em 2

$$Abs = (\varepsilon_{ox} 10^{\frac{n(E-E^{0'})}{59}} + \varepsilon_{red}) c_{red} \quad \text{Equação 6}$$

Substituindo a equação 5 em 3 temos

$$c_{red} = \frac{c_{tot}}{10^{n(E-E^{0'})/59} + 1} \quad \text{Equação 7}$$

Substituindo equação 7 em 6

$$Abs = \frac{(\varepsilon_{ox} 10^{n(E-E^{0'})/59} + \varepsilon_{red}) c_{tot}}{1 + 10^{n(E-E^{0'})/59}} \quad \text{Equação 8}$$

Os produtos $\varepsilon_{ox} c_{tot}$ e $\varepsilon_{red} c_{tot}$ representam os limites de absorção quando a proteína se encontra totalmente oxidada, ou reduzida, respectivamente. Substituindo na equação 8 temos:

$$Abs = \frac{Abs_{ox} 10^{n(E-E^{0'})/59} + Abs_{red}}{1 + 10^{n(E-E^{0'})/59}} \quad \text{Equação 9}$$

Em uma titulação espectroeletroquímica partindo do valor de potencial aplicado, E, e os valores das absorbâncias registrados para espécies oxidada (A_{ox}) e reduzida (A_{red}) e com os

valores de c_{tot} , ε_{ox} e ε_{red} conhecidos torna-se possível calcular os valores de $E^{0'}$ e n por ajuste não linear, isto foi feito utilizando uma plataforma no excel (Reactlab-Redox) ⁶⁵.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O mecanismo de transdução de sinal da FixL tem sido associado, majoritariamente, às mudanças nos contatos de resíduos distais com os grupos heme os quais, concomitantemente, experimentam distorções no grupo heme. Estudos espectroscópicos e eletroquímicos⁶⁶ com outras hemoproteínas sensoras mostraram comportamento similar, onde resíduos aminoácidos em contato com o grupo heme são sensíveis à ligação com ligantes gasosos. Para proteínas FixL, todavia, poucos estudos eletroquímicos foram realizados e, dentre estes, apenas com o domínio heme isolado, ou seja, a proteína nativa não foi estudada o que pode levar, inclusive, a conclusões errôneas, uma vez que não foram considerados os efeitos de mudanças conformacionais promovidos pela presença de outros domínios sobre os valores de potenciais^{6, 9, 66, 67}. Na verdade, a ligação do gás sinalizador ao grupo heme desencadeia alterações conformacionais que aparentemente estão fortemente ligadas com contatos entre domínios do sensor e possivelmente interações domínio-domínio²³. Tais alterações devem afetar o potencial de redução, tornando o entendimento desta relação uma etapa fundamental para o conhecimento do mecanismo de transdução de sinal.

O objetivo deste trabalho é estudar a proteína FixL do organismo *Rhizobium etli* livre de coordenação, bem como ligada a diferentes moléculas. Para tanto foram utilizadas técnicas espectroscópicas e eletroquímicas, usando mediadores redox, cujos espectros são obtidos à medida em que a proteína é gradualmente reduzida/oxidada sob a aplicação de um determinado valor de potencial.

Especificamente, foram os seguintes os objetivos contemplados:

- (i) Expressão heteróloga (em *Escherichia coli*, cepa MC1061) da proteína FixL do organismo *Rhizobium etli* a partir do plasmídeo pRET31 utilizando a técnica de DNA recombinante;
- (ii) Isolamento e avaliação da pureza das proteínas ReFixL;
- (iii) Determinação, por titulação espectroeletroquímica, dos potenciais redox da proteína ReFixL nas formas não ligadas e ligadas às moléculas: O₂, CO, CN⁻ e imidazol e verificação de sua relação com atividade quinase da proteína;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O processo de clonagem do gene da proteína *ReFixL* foi feito no laboratório da Professora Marie Alda Gillez-Gonzalez (University of Texas Southwestern Medical Center) e gentilmente cedido ao nosso laboratório.

3.1 Transformação das células *Escherichia coli* (MC1061)

Foi realizada a transformação química das células de *Escherichia coli* (cepa MC1061), que consiste na inserção do plasmídeo na célula bacteriana. Vale ressaltar que todo o processo foi realizado com soluções devidamente esterilizadas. As esterilizações foram feitas por autoclavagem, pressão de 1 atm à 121 °C, por 15 minutos, utilizando um autoclave Phoenix. Todos os reagentes utilizados no procedimento de transformação foram de procedência Sigma-Aldrich. Antes do processo de transformação faz-se necessário tornar as células da bactéria competentes. Isto é feito por meio do crescimento de 50 mL de cultura da bactéria *E. coli* em meio Lauria-Bertani (LB), que é constituído de triptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹ e NaCl 10 g L⁻¹. Esta solução foi mantida em uma incubadora Tecnal TE420 à 37° C, à uma rotação de 225 rpm. Quando a cultura atingiu uma densidade de células adequada ($A_{600nm} \sim 0,5$, aproximadamente 4h) foi transferida para um tubo de Falcon e resfriada em gelo por 10 min. Após isto a cultura foi centrifugada a uma rotação de 2500 rpm (rotor Sigma de ângulo variável Sigma 11650) por 10 min a 4°C em uma centrífuga Sigma 16-6K. O sobrenadante foi descartado e as células resuspendidas em 15 mL de TRIS pH 7,0 10 mmol L⁻¹ e CaCl₂ 50 mmol L⁻¹. Esta mistura foi resfriada em gelo por 15 min, centrifugada a uma rotação de 2500 rpm (rotor Sigma de ângulo variável Sigma 11650), à 10 °C por 10 min e resuspendida em 4 mL de TRIS pH 7,0 10 mmol L⁻¹ e CaCl₂ 50 mmol L⁻¹. Este processo é responsável por tornar a célula permeável para a captação do plasmídeo no processo de transformação.

As células bacterianas foram transformadas com plasmídeo pRET31. Foram homogeneizados 195 µL de células competentes e 5 µL de plasmídeo. Esta mistura foi resfriada em gelo por 30 min, em seguida, aquecida à exatamente 42°C por 2 min, e imediatamente transferido para banho de gelo. Este choque térmico aliado ao uso do CaCl₂ anteriormente, é responsável por tornar a membrana das células permeável ao plasmídeo. Feito isto foram adicionados 800 µL de meio LB e esta mistura incubada a 37°C à um agitação de 225 rpm por 1h. Ao término do período de incubação o meio de cultura contendo as células transformadas foi centrifugado à uma rotação de 2500 rpm (rotor Sigma de ângulo fixo Sigma 12130) à 4°C

por 10 min, o sobrenadante descartado, as células resuspensas em 150 μL de meio LB e 1,5 μL de ampicilina 100 mg mL^{-1} , de procedência Sigma-Aldrich. Esta mistura foi uniformemente espalhada em placas de meio de cultura sólido LB agar 40 g L^{-1} (procedência MO BIO) e ampicilina 0,1 mg mL^{-1} . As placas foram incubadas à 37°C por 16h para crescimento de culturas de bactéria contendo o plasmídeo de interesse. Uma colônia foi recolhida e aplicada em novas placa de LB ágar contendo 0,1 mg mL^{-1} de ampicilina realizando procedimento de *restreak*, e incubadas à 37°C por 16h para crescimento de culturas de bactéria contendo o plasmídeo de interesse.

3.2 Produção da proteína ReFixL

Uma cultura de células contendo o plasmídeo da proteína *ReFixL* foi incubada a 37°C em 50 mL de meio LB contendo o antibiótico de seleção ampicilina 0,1 mg mL^{-1} à uma agitação de 225 rpm em erlenmeyer de 250 mL para garantir oxigenação. A solução foi mantida em incubadora Tecnal TE420 por 16h. Após o tempo de incubação o meio de cultura foi centrifugado à 4500 rpm (rotor Sigma de ângulo variável Sigma 11650) à 25 °C por 15 min e as células precipitadas foram resuspendidas em 2 mL de meio de cultura LB contendo ampicilina 0,1 mg/mL , esta solução foi utilizada como inóculo para crescimento em biorreator de applikon 5L, **Figura 17**, que permite controle de oxigenação, temperatura, pH, adição de soluções de alimentação e agitação. Na Tabela 1 foram detalhadas todas as soluções utilizadas na fermentação e os detalhes de esterilização. As soluções de meio de cultura LB 25 g L^{-1} , KH_2PO_4 0,18 mol L^{-1} e Na_2HPO_4 0,34 mol L^{-1} foram esterilizadas diretamente no biorreator, por isso o maior tempo de esterilização. Algumas soluções foram esterilizadas por meio de filtração devido à instabilidade dos componentes à temperatura de esterilização por autoclavagem.

Antes da esterilização do biorreator o eletrodo de pH foi devidamente calibrado utilizando dois pontos de calibração, soluções padrão pH 4,0 e 7,0, de procedência Dinâmica®. Após esterilização do biorreator todas as linhas e conexões dos eletrodos de pH e oxigênio foram conectados para polarização dos eletrodos por um período de 7h. Em seguida foi feita calibração do eletrodo sensor de oxigênio, onde a solução foi saturada com O_2 de pureza 99,5% para referência 100% de O_2 e em seguida saturado com argônio de 99,998 % para referência de 0% de O_2 , ambos de procedência White Martins.

Figura 17 — Biorreator Applikon-5L.



Fonte: O autor.

Após a calibração do eletrodo sensor de oxigênio foram adicionados 10 mL de ampicilina 100 mg mL^{-1} , 8mL de solução traços de metais e 4 mL de $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7$ $40,2 \text{ mmol L}^{-1}$. O processo de fermentação foi iniciado com a adição do inóculo contendo a cultura de células *E. coli* com o plasmídeo da proteína *ReFixL* preparado previamente. Neste momento a oxigenação foi mantida a uma taxa de 7%, temperatura a 37°C , pH 7,0 e a glicose foi checada constantemente a fim de não permitir que fosse totalmente consumida. A checagem da glicose foi feita utilizando uma fita indicadora diastix de procedência Bayer, quando o nível de glicose começara a diminuir se iniciava a alimentação do meio de cultura por meio da adição controlada de solução contendo 200 mL de glicose 50%, 100 mL de solução de triptona 200 g L^{-1} e extrato de levedura 100 g L^{-1} , 10 mL de solução traços de metais e 5 mL de $[\text{Fe}(\text{cit})_3]^{3+}$ (citrato férrico) 40 mmol L^{-1} . Vale ressaltar que a glicose foi utilizada tanto por ser uma fonte de carbono como por ser um repressor de expressão do promotor *tac*. Ou seja, a produção da proteína só foi iniciada quando atingida uma densidade de células ideal por meio da interrupção da alimentação do meio de cultura com solução de glicose.

Durante todo o crescimento das células contendo o plasmídeo o pH do meio de cultura foi controlado por meio da adição de NH_4OH 50%. O crescimento das células foi avaliado por meio de centrifugação de alíquotas do meio de cultura e checagem da densidade de células por pesagem. A densidade de células ideal para início da produção da proteína é de 20 g/L . O momento ideal para interrupção da repressão de expressão gênica pela glicose pode também ser

monitorado por espectroscopia UV-vis, cuja a densidade ótica medida em 600 nm deve ser de aproximadamente 0,6, caso esteja sendo realizado em agitador orbital tipo *shaker*. Ao atingir esta densidade celular a alimentação com glicose é interrompida, aguardando-se que toda glicose presente seja consumida, iniciando a expressão gênica e produção da proteína

Durante a expressão da proteína a temperatura foi mantida a 30 °C e a solução de alimentação de glicose foi substituída por uma mistura contendo 300 mL de glicerol 50%, 150 mL de triptona 200 g L⁻¹ e extrato de levedura 100 g L⁻¹, 15 mL de solução traços de metais, 7,5 mL de [Fe(cit)₃]³⁺ (citrato férrico) 40 mmol L⁻¹. O processo de produção ocorre por aproximadamente 16 h, e para verificar se a proteína foi produzida foram retiradas amostras do meio de cultura, centrifugadas e a cor das células precipitadas checadas durante todo o processo. Devido a proteína produzida possuir o grupo prostético heme as células isoladas possuem tom avermelhado. Quando se observou mudança de coloração do precipitado celular a fermentação foi interrompida e a cultura celular coletada e centrifugada a 12000 rpm (rotor Sigma de ângulo fixo Sigma 12500) por 30 min para remoção do meio de cultura. A massa do precipitado celular variou de 80-100g. A partir deste momento não há necessidade de manter materiais ou soluções esterilizadas.

Tabela 1 — Soluções utilizadas na produção da proteína ReFixL, concentrações e detalhes de esterilização. A alternância das cores na tabela indica soluções diferentes.

Composição	Procedência	concentração	Forma de esterelização
Meio de cultura LB*	Sigma-Aldrich	25 g L ⁻¹	121 °C, 1 atm por 45 min
meio de cultura YT**	Fisher		121 °C, 1 atm por 15 min
Ampicilina	Sigma-Aldrich	0,2 mol L ⁻¹	filtrada (filtro 0,22 µm)***
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	0,18 mol L ⁻¹	121 °C, 1 atm por 45 min
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich	0,34 mol L ⁻¹	
Solução Traços de metais			
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sigma-Aldrich	1,5 mmol L ⁻¹	121 °C, 1 atm por 15 min
MnSO ₄ .7H ₂ O	Sigma-Aldrich	0,78 mmol L ⁻¹	
H ₃ BO ₃	Sigma-Aldrich	0,47 mmol L ⁻¹	
NaMoO ₄ .2H ₂ O	Fisher	0,22 mmol L ⁻¹	
CoCl ₂ .6H ₂ O	Sigma-Aldrich	0,2 mmol L ⁻¹	
KI	Spectrum	0,5 mmol L ⁻¹	
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sigma-Aldrich	0,5 mmol L ⁻¹	
H ₂ SO ₄	Vetec	0,25 mol L ⁻¹	
C ₆ H ₅ FeO ₇	Alfa Aesar	40,2 mmol L ⁻¹	filtrada (filtro 0,22 µm)***
glicose	Sigma-Aldrich	50%	filtrada (filtro 0,22 µm)***
Glycerol	Sigma-Aldrich	50%	121 °C, 1 atm por 15 min
NH ₄ OH	Vetec	50%	-

* meio de cultura LB: triptona, extrato de levedura e NaCl na proporção 2:1:2

** meio de cultura YT: triptona e extrato de levedura na proporção de 2:1, a concentração usual do YT é 20 g L⁻¹, entretanto no processo de fermentação foi utilizada 20 vezes esta concentração (400 g L⁻¹)

*** filtros Millipore 0,22 µm

3.3 Purificação das proteína ReFixL

Uma vez que as células bacterianas podem produzir milhares de proteínas diferentes faz-se necessário lançar mão de propriedades físicas e químicas para separar a proteína de interesse das demais também produzidas pelo organismo. A proteína pode ser separada com base em propriedades como: solubilidade, tamanho, carga iônica, propriedades de adsorção e afinidade^{70, 71}. O primeiro passo da purificação é a extração da proteína, como esta se encontra no citosol foi feito o rompimento da parede celular e extração do extrato bruto. Este rompimento

é realizado com o uso de sonicação e lisozima, que é uma enzima que catalisa a digestão da parede celular. Foi utilizado um sonicador do tipo sonda de procedência Sonics *vibracell*. Após as células contendo a proteína *ReFixL* serem recolhidas ao fim do processo de fermentação as células foram resuspensas em tampão para lise celular na proporção de 2 mL de solução para cada 1g de células. A composição da solução utilizada para lise celular encontra-se descrita na **Tabela 2**.

Após resuspensão a solução é mantida à temperatura ambiente por 5 min e em seguida transferida para banho de gelo e são iniciados ciclos de sonicação por 30 e 59 s de repouso por 40 a 60 min até que a solução antes bastante viscosa comece a tornar-se fluída e a cor vermelha intensificada devido ao rompimento das parede e membrana bacteriana dando acesso ao citosol, onde a proteína foi produzida. Durante o processo de sonicação a temperatura foi mantida em $\sim 10^{\circ}\text{C}$. Após sonicação a solução foi centrifugada a 20 000 rpm (rotor Sigma de ângulo fixo Sigma 12256-H) à 4°C por 40 min para remoção dos fragmentos celulares insolúveis. O sobrenadante foi recolhido e adicionada solução do agente redutor 2-mercaptoetanol 5 mmol L^{-1} .

Tabela 2 — Composição da solução para lise celular.

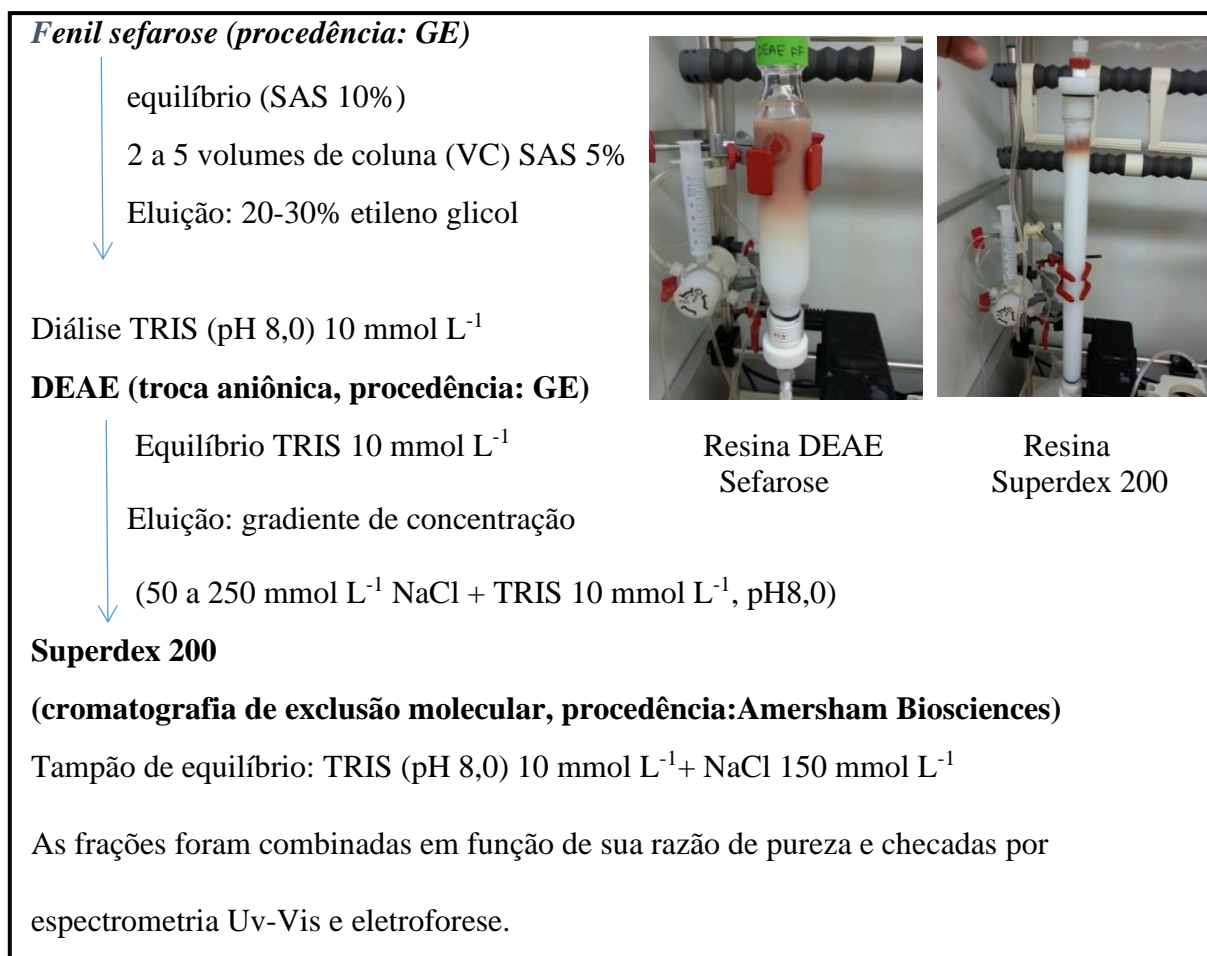
Composição	Procedência	Concentração
tampão TRIS (pH 8,0)	Sigma-Aldrich	50 mmol L^{-1}
NaCl	Sigma-Aldrich	137 mmol L^{-1}
KCl	Amresco	5 mmol L^{-1}
Glicerol	Sigma-Aldrich	5%
EDTA	Sigma-Aldrich	1 mmol L^{-1}
2-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich	10 mmol L^{-1}
PMSF	Sigma-Aldrich	$0,17\text{ mg mL}^{-1}$
Lisozima	Sigma-Aldrich	$0,1\text{ mg mL}^{-1}$

Este extrato foi então submetido a diversos tratamentos que separaram a proteína em frações com base nas propriedades físicas e químicas mencionadas anteriormente. A primeira propriedade utilizada para purificar a proteína foi a solubilidade, a maior parte das proteínas globulares tendem a aumentar a solubilidade quando a força iônica aumenta, fenômeno denominado *salting in*, devido a diminuição da interação proteína-proteína. Porém, quando a concentração salina atinge valores muito elevados (maiores que 1 mol L^{-1}) o efeito é reverso, pois as moléculas de sal começam a competir com a proteína por moléculas de água para

solvatação, e então, a proteína torna-se insolúvel, *salting out*. A proteína precipitada é separada daquelas em solução por centrifugação em baixa velocidade, para que não ocorra precipitação de proteínas contaminantes. Diferentes proteínas requerem diferentes concentrações salinas para tornarem-se insolúveis em um meio, e isto é dependente também da temperatura e pH. O $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tem sido o sal mais utilizado no processo de *salting out*, devido a sua alta solubilidade mesmo a baixas temperaturas ($3,9 \text{ mol L}^{-1}$ em água a 0°C)⁷⁰, efeito estabilizante para algumas proteínas e previne proteólise. O processo de *salting out* foi realizado utilizando solução estoque $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 mol L^{-1} (*Saturated Ammonium Sulphate-SAS*), que foi adicionada ao sobrenadante de forma que a concentração final do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fosse $1,6 \text{ mol L}^{-1}$. Esta solução foi centrifugada a $20\,000 \text{ rpm}$ (rotor Sigma de ângulo fixo Sigma 12256-H) à 4°C por 30 min . O precipitado foi coletado e se a solução sobrenadante ainda apresentasse cor vermelha seria adicionada solução estoque $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 mol L^{-1} de forma que sua concentração final fosse 2 mol L^{-1} .

Após o processo de *salting out* iniciou-se o uso de métodos cromatográficos para separar a proteína de interesse das contaminantes. O primeiro método utilizado foi a cromatografia de interação hidrofóbica, em que é feita a separação seletiva da proteína com base na interação de regiões hidrofóbicas à ligantes imobilizados covalentemente à matriz⁷⁰⁻⁷². Neste trabalho foi utilizada resina fenil SEPHAROSE como matriz (agarose com ligações covalentes cruzadas modificadas com grupo fenil). Assim, a proteína foi separada das proteínas contaminantes por meio de interações hidrofóbicas não específicas. Para eluição foi utilizado etileno glicol (os detalhes experimentais da purificação encontram-se detalhados no esquema da **Figura 18**).

Figura 18 — Esquema ilustrativo das etapas de purificação da proteína *ReFixL*.



Fonte: O autor.

As frações coletadas foram checadas por espectroscopia UV-vis e combinadas de acordo com sua razão de pureza, $R_z = \frac{A_{280\text{ nm}}}{A_{\text{Soret}}}$, para em seguida ser aplicada em coluna de troca aniônica. A resina utilizada foi a DEAE sefarose. Esta resina foi empregada devido à proteína *ReFixL* estar carregada negativamente no pH de trabalho 8,0, em decorrência dos seus valor teórico de pI 5,8⁷³. A proteína foi eluída por meio de um gradiente de concentração de NaCl, utilizando tampão TRIS (pH 8,0) 10 mmol L⁻¹ e NaCl 50 a 250 mmol L⁻¹. Após coleta das frações a proteína foi checada por espectroscopia UV-vis e combinadas de acordo com sua razão de pureza. As melhores frações foram combinadas e aplicadas em resina de exclusão molecular superdex 200, que se baseia no tamanho molecular da proteína para eluição. Portanto, diferenciando a proteína de interesse das demais contaminantes com base no seu tamanho. A resina possui poros que abrangem uma faixa de tamanho molecular relativamente pequena. As moléculas maiores que os poros sendo eluídas primeiro por não passarem por estes. Já

moléculas menores que o limite de exclusão passam pelos poros na ordem de suas massas moleculares.

A pureza da proteína foi avaliada também por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE, *polyacrylamide gel electrophoresis*). O gel é formado pela polimerização de acrilamida e N,N'-metilenobisacrilamida, catalisada por radicais livres provenientes do persulfato de amônio ($S_2O_8^{2-} \rightarrow 2SO_4^{\cdot-}$). A migração da proteína ocorre de acordo com sua razão carga-massa. O método utilizado foi o SDS-PAGE, onde o surfactante SDS (dodecilsulfato de sódio) se liga à proteína em quantidade proporcional à sua massa molecular, levando a proteína a sua forma desnaturada devido a associação às cadeias hidrofóbicas da proteína. Com isto SDS contribui com uma grande carga negativa, tornando a carga da proteína insignificante. Assim, diferentes proteínas são separadas apenas em razão da sua massa molecular. O gel foi preparado utilizando o sistema de montagem BIO-RAD e para aplicação de potencial foi utilizada fonte FB300 Fisher scientific. O tamanho dos poros é controlado pela porcentagem de acrilamida no gel, para ambas as proteínas foi utilizado gel de acrilamida 10%. Os componentes do gel foram homogeneizados de acordo com as quantidades descritas e deixados em repouso por 20 min para polimerização.

Tabela 3 — Composição de géis utilizados para eletroforese (SDS-PAGE). Todos os reagentes utilizados foram de procedência Sigma-Aldrich.

Composição dos géis	Gel de alinhamento, μL	Gel de separação, μL
Tampão de alinhamento (TRIS pH 8,8 0,375 mol L ⁻¹)	450	-
Tampão de separação (TRIS pH 6,8 0,125 mol L ⁻¹)	-	1250
Acrilamida/Bisacrilamida 37:1	225	1250
SDS 10%	18	50
Persulfato de amônio 10%	13,5	38
TEMED (tetrametiletilenodiamina)	2	2,5
H ₂ O	1110	2450

Foram retiradas alíquotas das frações da proteína ReFixL aplicadas em cada coluna e estas amostras foram analisadas por eletroforese. As amostras foram previamente desnaturadas

na presença do tampão amostra (descrito na Tabela 4) e aquecidas à 100 °C por 4 min. Estas soluções foram aplicadas nos poços do gel de acrilamida e aplicado potencial de 150 V por 40-60 min. Em seguida, o gel foi retirado do suporte e corado em solução azul de Coomassie 5g/L (procedência Sigma-Aldrich), ácido acético glacial 7,5 % (procedência Vetec) e metanol 45% (procedência Vetec) por 30 min sob agitação para visualização das bandas da proteína em estudo. O excesso da solução corante foi retirado lavando-se o gel exaustivamente em solução descorante contendo ácido acético glacial 7,5% e metanol 45%. Após isto foi registrada uma foto do gel utilizando um fotodocumentador BIO-RAD.

Tabela 4 — Composição do tampão amostra para desnaturação da proteína.

Composição	Procedência	Concentração
tampão TRIS pH 6,7	Sigma-Aldrich	0,125 mol L ⁻¹
SDS	Sigma-Aldrich	4%
Glicerol	Sigma-Aldrich	1 mmol L ⁻¹
2- mercaptoetanol	Sigma-Aldrich	0,7 mol L ⁻¹
Azul de bromofenol		0,2 mg mL ⁻¹

3.4 Espectroeletroquímica

A titulação espectroeletroquímica consiste na aplicação de potencial e acompanhamento dos processos redox da espécie eletroativa por uma técnica espectroscópica a qual esta espécie responda. No presente estudo, a técnica utilizada foi espectroscopia UV-vis. Foi utilizada para isto uma cubeta espectroeletroquímica (OTTLE-*optically transparent thin-layer*, de caminho ótico de 0,1 cm, de procedência) com uma malha de ouro ou platina como eletrodo de trabalho, um fio de platina como eletrodo auxiliar e Ag|AgCl/Cl⁻ saturado (196 mV vs ENH) como eletrodo de referência. Todos os potenciais descritos neste trabalho foram convertidos para o potencial *versus* eletrodo normal de hidrogênio (ENH). A cubeta utilizada neste trabalho foi uma OTTLE (Bioanalytical Systems Inc., BASi), assim como os eletrodos, feitos sob medida para os encaixes da cubeta. A **Figura 19** apresenta uma ilustração desta cubeta.

Figura 19 — Cubeta utilizadas nos experimentos de titulação espectroeletroquímica.



Fonte: O autor.

Foram utilizados preferencialmente compostos de coordenação com ligantes macrocíclicos como mediadores, entretanto, alguns dos sistemas estudados apresentaram reação redox fora da faixa de potencial de trabalho destes mediadores, desta forma fez-se necessário o uso de mediadores comerciais para estes sistemas. Os mediadores Fe(NOTA), [Fe(tacn₂)]Cl₃, [Co(NMe₃)₂sar]Cl₅, [Co(CLME-N₄S₂-sar)]Cl₃, [Co(AMME-N₅S-sar)]Cl₃, [Co(sep)]Cl₃, [CoAMMEsar)]Cl₃, Co(AMN₄S₂sar)]Cl₄ e [Co(*trans*-diammac)](ClO₄)₃ foram sintetizados de acordo com procedimentos publicadas na literatura ^{60, 74}. Além destes foram utilizados os mediadores 2,5-dihidroxibenzoquinona (procedência Lancaster), [Ru(CN)₆]Cl₄, Ferrocenemetanol e hidroquinona, todos de procedência Sigma-Aldrich. A solução eletrolítica foi composta de tampão TRIS (pH 8,0) 35 mmol L⁻¹ e NaCl 100 mmol L⁻¹ como eletrólito de suporte. Para o sistema *ReFixL* na presença de cianeto foi necessária a realização da titulação espectroeletroquímica em pH 9,5. Os mediadores e ligantes utilizados em cada sistema serão especificados nos próximos itens. Os mediadores utilizados, seus respectivos potenciais *versus* eletrodo normal de hidrogênio e concentrações nas quais foram utilizados encontram-se descritos na **Tabela 5**. Cada mediador foi associado a uma letra para fim de simplificação da descrição das soluções eletrolíticas detalhadas adiante.

Tabela 5 — Mediadores eletroquímicos, valores de potencial de redução, E_0' , e concentrações utilizadas.

Mediador	Potencial, mV vs NHE	Concentração, $\mu\text{mol L}^{-1}$
a) $[\text{Co}(\text{NMe}_3)_2\text{sar}]\text{Cl}_5$	+10	100
b) 2,5-Dihidroxibenzoquinona	-60	5
c) $[\text{Co}(\text{CLME-N}_4\text{S}_2\text{-sar})]\text{Cl}_3$	-134	100
d) $[\text{Co}(\text{AMME-N}_5\text{S-sar})]\text{Cl}_3$	-220	100
e) $[\text{Co}(\text{sep})]\text{Cl}_3$	-296	100
f) $[\text{CoAMMEsar}]\text{Cl}_3$	-380	100
h) $[\text{Co}(\text{trans-diammac})](\text{ClO}_4)_3$	-551	100

3.4.1 Proteína ReFixL

A proteína ReFixL foi armazenada na sua forma met-ReFixL, sendo evidenciado pela banda Soret em 395 nm e banda β em 500 nm com ombro à sua direita relativo a banda α ²³. O potencial de redução da proteína foi determinado na ausência de ligantes e na presença dos ligantes CO, O₂, imidazol e CN⁻. Todas as titulações foram feitas no sentido redutivo e oxidativo, iniciando-se com a forma oxidada da proteína met-ReFixL 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$. As titulações em ambiente anaeróbico foram realizadas em câmara anaeróbica Belle Technology (O₂ < 10 ppm) a 25 °C, exceto pelo sistema na presença de CN⁻, onde foi utilizado gás argônio para garantir a ausência de O₂ no meio. As faixas de potencial e mediadores foram otimizados para cada sistema, com os intervalos de potencial aplicado sempre de 50 mV e 25 mV quando próximo do valor de E_m de cada sistema. Cada potencial foi aplicado por 8 min. Antes de se iniciar a titulação espectroeletroquímica para cada sistema foi aplicado um potencial de 300 mV por 20 min para garantir que a proteína se encontrava totalmente em seu estado oxidado.

Os mediadores utilizados em cada sistema foram escolhidos de acordo com seus potenciais e estudos iniciais de potencial de redução para a proteína ReFixL em cada sistema. A **Tabela 6** apresenta a composição das soluções para todos os sistemas.

O gás CO utilizado neste sistema foi sintetizado por meio da adição de ácido sulfúrico à ácido fórmico, ambos de procedência Sigma-Aldrich. Na saída do gás foi acoplado um *trapping* contendo sílica gel, de procedência Sigma-Aldrich, para retirada da umidade. O monóxido de carbono se coordena ao grupo prostético heme em sua forma reduzida.

Tabela 6 — Descrição das condições utilizadas para as titulações espectroeletroquímicas realizadas para a proteína ReFixL.

condições	deoxi	CO	O₂/ar	O₂	imz	CN-
Ambiente	Anaeróbico	Aeróbico	Aeróbico	Aeróbico	Anaeróbico	Anaeróbico
pH	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	9,5
mediadores	a,b,c,d,e	a,c,d,e	a,c,d,e	a,c,d,e	a,c,d,e	a,c,d,e,f,g
eletrodo de trabalho	Au	Au	Au	Au	Au	Pt
Potencial inicial	250 mV	250 mV	300 mV	400 mV	300 mV	200 mV
Potencial final	-200 mV	-250 mV	-200 mV	-200 mV	-250 mV	-500 mV
Concentração do ligante	NA	0,93 mmolL ⁻¹	0,29 mmol L ⁻¹	1,25 mmol L ⁻¹	200 mmol L ⁻¹	1 mmol L ⁻¹
Forma ligada	NA	Fe ^{II}	Fe ^{II}	Fe ^{II}	Fe ^{III}	Fe ^{III}

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Rhizobium etli* FixL

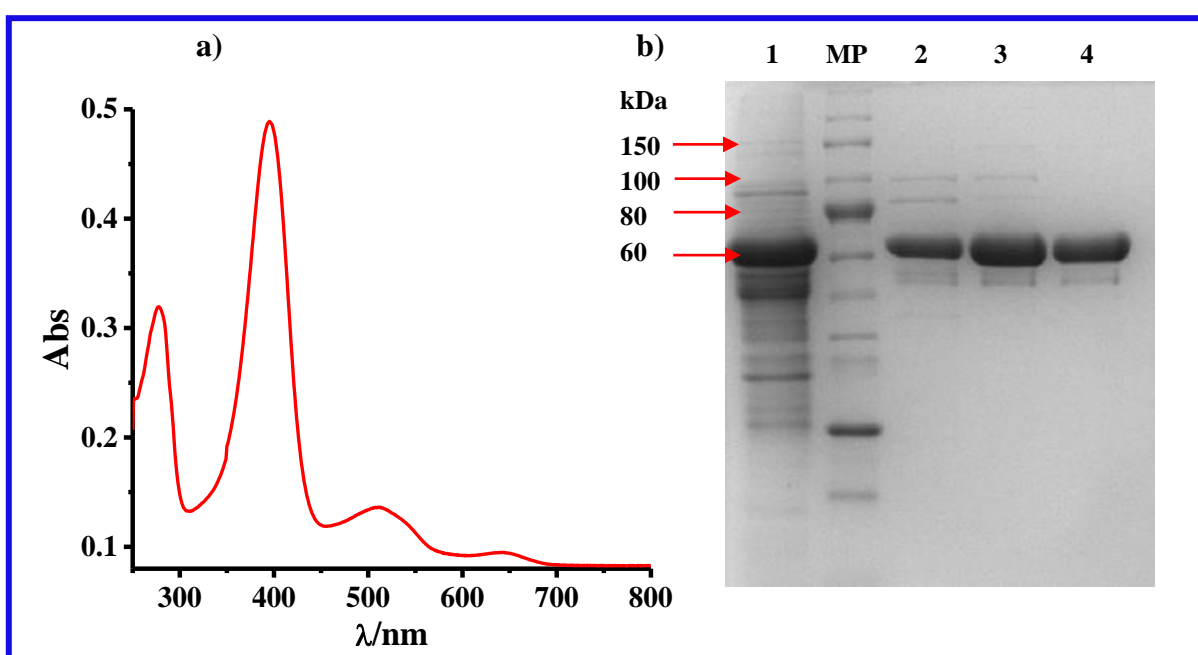
4.1.1 Purificação

A proteína *ReFixL* foi obtida em sua forma *holo*, ou seja, com seu grupo prostético heme tipo b, onde o átomo de ferro central é coordenado ao anel tetrapirrólico no eixo equatorial e no eixo axial ao resíduo His-193. O espectro da proteína *ReFixL* ao final da purificação, exibido na **Figura 20**, é composto por três bandas, a banda Soret em 395 nm, a banda referente aos resíduos aromáticos triptofano, fenilalanina e tirosina em 278 nm e a banda β em 500 nm com ombro à sua direita referente a banda α . O comprimento de onda de 395 nm para a banda Soret é característico do estado *met-ReFixL* (Fe^{III}) penta-coordenado de alto spin. As bandas β e α são associadas a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ ($a_{1u}, a_{2u} \rightarrow e_g (\pi^*)$) do anel porfirínico. A banda α é menos intensa e ocorre, geralmente, como um ombro da banda β que, normalmente, ganha intensidade através do acoplamento com modos vibracionais envolvidos nas transições associadas à banda Soret¹⁸. O efeito de ligantes axiais nestas bandas é evidenciado em complexos de baixo spin. Outra evidência do estado férrico de alto spin é a região onde a banda β se encontra e a ocorrência da banda α como apenas um ombro da banda β . Na presença de agente redutor, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, a banda Soret se desloca para 432 nm e a banda β para 560 nm juntamente com a banda α formando apenas um ombro à sua direita, estes comprimentos de onda são característicos do grupo heme no seu estado *deoxi-ReFixL* (Fe^{II}) penta-coordenado de alto spin¹⁸.

Após eluição nas colunas cromatográficas citadas em Materiais e Métodos, item 3.4, a pureza da proteína foi verificada utilizando espectroscopia obtido na região do UV-Vis e eletroforese de gel desnaturante (SDS-PAGE). Para avaliação da pureza por espectroscopia UV-Vis foi calculada a razão dos valores de absorbância para as bandas em 278 nm e 395 nm $\left(\frac{A_{278}}{A_{395}}\right)$ para cada fração coletada durante todo o processo de purificação. A banda em 278 nm é utilizada como referência das proteínas totais presentes (*ReFixL*+contaminantes) e a banda Soret como referência da proteína *ReFixL*. Sendo assim, quanto menor esta razão mais pura a proteína. As razões determinadas foram de ~1,1; 0,7 e 0,57 após eluição nas colunas de fenil sefarose, DEAE e superdex 200, respectivamente. A **Figura 20** exibe o perfil espectroscópico

da proteína na forma purificada e uma fotografia do gel de eletroforese desnaturante, onde foram analisadas alíquotas após cada etapa cromatográfica.

Figura 20 — Verificação da pureza da proteína *ReFixL* após os passos de purificação. **a)** Espectro obtido na região do UV-Vis registrado em solução contendo *ReFixL* $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ e tampão TRIS 10 mmol L^{-1} (pH 8,0) e **b)** Gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) ao final dos passos de purificação da proteína *ReFixL*. Poços: 1-fração precipitada com sulfato de amônio; MP-Marcador molecular padrão (New England Labs); 2- fração coletada da coluna fenil sefarose; 3- fração coletada da coluna de troca iônica DEAE e 4- fração coletada da coluna de filtração em gel Superdex 200.



Fonte: O autor.

Como pode ser observado na fotografia do gel de poliacrilamida, **Figura 20b** (poço 1), que apresenta as bandas das proteínas presentes ainda no primeiro passo do processo de purificação resultante da precipitação com sulfato de amônio. Neste poço foi verificado a presença de diversos contaminantes de diferentes massas moleculares, sendo estas proteínas co-expressas na célula, ainda assim a banda mais intensa se refere a massa da *ReFixL*. Estes contaminantes foram seletivamente retirados das amostras protéicas por meio dos passos consecutivos de purificação cromatográfica utilizando as colunas fenil sefarose, DEAE e Superdex 200, como pode ser observado no acompanhamento destas frações por eletroforese após cada coluna utilizada, **Figura 20b**. Ao final das etapas de purificação (poço 4, **Figura 20b**) foi observada a presença de uma banda concentrada ligeiramente acima da banda do marcador molecular de 58 KDa e abaixo do marcador molecular de 80 KDa. Esta banda foi atribuída a proteína

FixL do organismo *Rhizobium etli*, que é um homodímero em que cada unidade molecular possui massa de 70 kDa²³, cuja integridade e pureza foram confirmados.

4.1.2 Espectroeletroquímica

O potencial de redução de uma proteína determina a energia livre de Gibbs (ΔG) necessária para a interconversão entre os dois estados de oxidação. A complexidade de uma proteína torna possível que um mesmo cofator presente em sistemas diferentes tenha potenciais que variam na faixa de 800 mV⁷⁵. Isto ocorre em sistemas protéicos devido à gama de fatores que podem contribuir para o ajuste deste potencial de acordo com o que o sistema precisa para desempenhar suas funções. Moore e colaboradores⁷⁶ consideraram que há três contribuições para a energia livre de Gibbs de uma reação redox em uma proteína. ΔG_{cen} , associada à diferença de energia livre de Gibbs entre os dois estados redox resultante de ligantes associados aos diferentes estados redox, ΔG_{el} , que resulta de interações eletrostáticas entre o centro redox e grupos polares dos resíduos aminoácidos e solvente⁷⁵ e ΔG_{conf} , que se refere às alterações de energia devido a mudanças conformacionais quando alterado o estado redox da proteína.

Tendo em vista a forma como a transdução de sinal ocorre em sistemas FixL e o que desencadeia este processo, foram determinados os potenciais redox para a proteína *ReFixL* na ausência e presença dos ligantes CO, O₂ (em ar e O₂ puro), imidazol e cianeto. Estas espécies foram escolhidas por influenciar, comprovadamente, a atividade do domínio funcional histidina quinase⁴. Estudos publicados na literatura utilizando [γ -³²P] ATP mostraram que nos estados *oxi-ReFixL* e *cianomet-ReFixL*, a proteína tem sua atividade quinase inativada²³. Não há relatos quanto a atividade enzimática da proteína *ReFixL* ligada ao imidazol. Estudos realizados para a proteína *BjFixL*, entretanto, mostraram que este ligante não causa inibição significativa quanto cianeto ou O₂ ($I_j = 4,7$ para imidazol, $I_f = 47$ para cianeto e $I_f > 100$ para O₂), sendo o fator de inibição I_j relacionado a transferência do grupo fosforil para o resíduo aspartato no regulador de resposta, é razão da atividade do estado não ligado e atividade do estado ligado⁷⁷. Já para a proteína *RmFixL*, o ligante imidazol inibiu a atividade enzimática de forma mais eficaz que o ligante O₂ ($I_j > 260$ para imidazol, $I_f = 2$ para cianeto e $I_f > 100$ para O₂)⁷⁸. Dentre os sistemas FixL, apenas a proteína *BjFixL* teve seu potencial de redução determinado; ainda assim, apenas para o domínio hémico isolado⁹. Desta forma, foi determinado o potencial de redução da proteína em diversas formas, em que a proteína tem sua atividade quinase ativa e inativa, a fim buscar correlacionar a atividade enzimática com o potencial de redução.

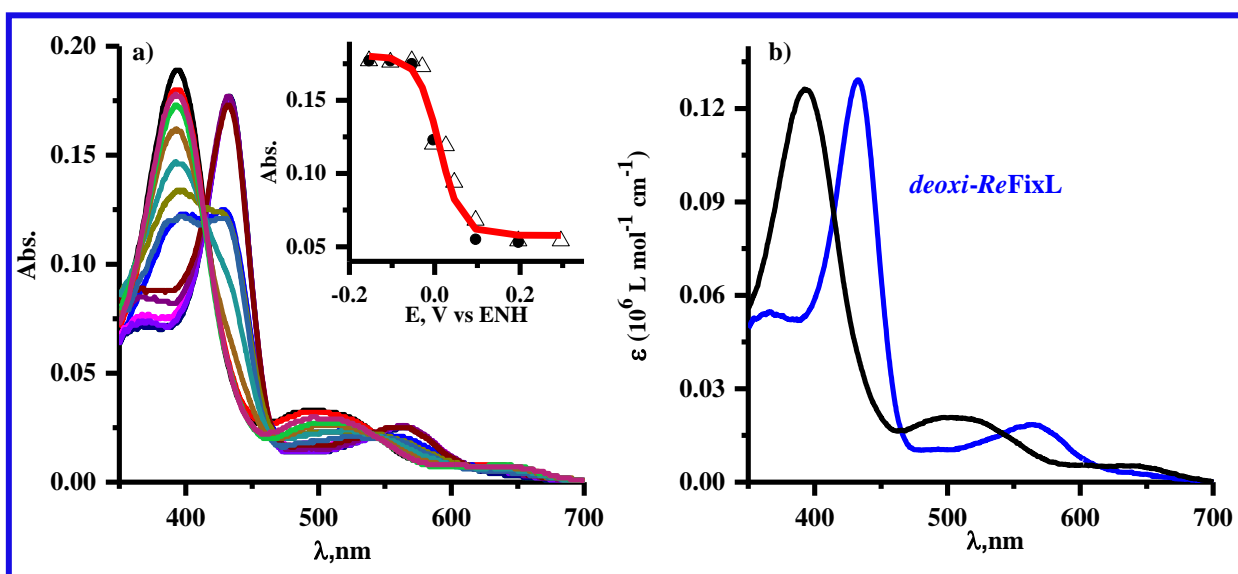
4.1.2.1 *deoxi-ReFixL*

Experimentos foram realizados visando a determinação do potencial de redução da proteína *ReFixL* em ambiente anaeróbico e na ausência de ligantes. A solução eletrolítica foi composta da proteína *ReFixL* 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$, os mediadores $[\text{Co}((\text{NMe}_3)_2\text{sar})]\text{Cl}_5$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 2,5-dihidroxibenzoquinona 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{CoCLME-N}_4\text{S}_2\text{-sar}]\text{Cl}_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{CoAMME-N}_5\text{S-sar}]\text{Cl}_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{Co}(\text{sep})]\text{Cl}_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tampão TRIS (pH 8,0) 35 mmol L^{-1} e NaCl 100 mmol L^{-1} . Neste trabalho evitou-se a utilização de mediadores orgânicos devido às possíveis interferências no espectro eletrônico, como mencionado no subitem 1.5. Os primeiros experimentos, todavia, não apresentaram reprodutibilidade, apesar dos potenciais calculados estarem sempre na faixa compreendida entre +10 mV e -134 mV, cujos extremos correspondem aos valores de potenciais de meia-onda dos mediadores $[\text{Co}((\text{NMe}_3)_2\text{sar})]\text{Cl}_5$ e $[\text{CoCLME-N}_4\text{S}_2\text{-sar}]\text{Cl}_3$, respectivamente. Lançou-se mão, então, do uso do mediador orgânico 2,5-dihidroxibenzoquinona que preenche a lacuna de potencial entre os dois mediadores citados acima, desta forma a melhor cobrir o potencial na faixa de interesse. Para minimizar qualquer interferência que pudesse ocorrer devido ao uso do mediador orgânico, o mesmo foi adicionado em concentração vinte (20) vezes inferior aos mediadores inorgânicos. O ajuste das razões de concentração proteína/mediador foi feito caso a caso. Quando não há interferências dos mediadores, suas concentrações podem ser superiores a da proteína, contribuindo para que o equilíbrio $\text{Red} \rightleftharpoons \text{Ox} + e^-$ seja estabelecido mais rapidamente⁶⁰. Este aspecto é relevante do ponto de vista biológico devido ao menor risco de desnaturação da proteína durante o tempo do experimento, além de prover uma idéia mais real da reversibilidade do sistema, já que o mediador não pode ser o limitante da reação de transferência de elétrons.

Os experimentos com a proteína *ReFixL* na ausência de ligantes foram realizados em câmara anaeróbica. Inicialmente, a proteína encontrava-se em sua forma met-*ReFixL*. Durante a titulação redutiva foi observada sua conversão em *deoxi-ReFixL* e, em seguida, recuperado o estado inicial met-*ReFixL* após titulação oxidativa. Ambas as formas são estados ativos da proteína quinase *ReFixL*²³. Para este sistema, foi utilizado como eletrodo de trabalho uma malha de ouro. Aplicou-se um potencial de 300 mV por 20 min a fim de assegurar que a proteína se encontrava totalmente na forma met-*ReFixL*. Feito isto, foi registrado um espectro do estado inicial da proteína. O espectro apresentou os mesmos valores máximos para as bandas Soret, α e β que a forma isolada da proteína. O potencial foi variado de 250 mV à -100 mV em intervalos

de 50 mV e de 25 mV quando próximo do valor de E_m do sistema em estudo. O tempo de aplicação do potencial foi otimizado em 8 minutos, visto não serem observadas alterações espectrais após esse período. Este tempo foi fixado para todos os experimentos com a proteína *ReFixL* após otimização para cada sistema. Os espectros obtidos encontram-se apresentados na **Figura 21a**.

Figura 21 — Titulações espectrofotométricas para *ReFixL* na ausência de ligantes. **a)** espectros UV-Vis registrados durante titulação redutiva e oxidativa para deoxi-*ReFixL* 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de $[\text{Co}((\text{NMe}_3)_2\text{sar})]\text{Cl}_5$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 2,5-dihidroxibenzoquinona 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{CoCLME-N}_4\text{S}_2\text{-sar}]\text{Cl}_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{CoAMME-N}_5\text{S-sar}]\text{Cl}_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{Co}(\text{sep})]\text{Cl}_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tampão TRIS (pH 8,0) 35 mmol L^{-1} e NaCl 100 mmol L^{-1} ; inset: perfil absorbância (em 432 nm) *versus* potencial aplicado para proteína durante titulação redutiva (●) e oxidativa (Δ) e **b)** Espectro calculado para forma reduzida *deoxi-ReFixL* (azul) e forma oxidada *met-ReFixL* (preto).



Fonte: O autor.

Como evidências da conversão da espécie oxidada para reduzida da proteína foram observados deslocamentos das bandas Soret, α e β , além do surgimento de pontos isobésticos. Nestes espectros, observou-se o deslocamento da banda Soret de 395 nm para 432 nm. As bandas α e β permaneceram como uma combinação e deslocaram-se de 500 nm para 560 nm. Foram observados pontos isobésticos nos comprimentos de onda 414, 541 e 609 nm. Após a estabilização do espectro da espécie totalmente reduzida, a titulação foi realizada no sentido oxidativo mantendo-se a mesma faixa de potencial: de -100 mV a 400 mV.

Na **Figura 21b** são exibidos os espectros calculados dos estados totalmente reduzido e oxidado da proteína *ReFixL* na ausência de ligantes que foram obtidos utilizando o programa Reactlab Redox⁶⁵. Estes espectros são calculados com base nos espectros parciais da titulação espectroeletroquímica. Ambas as formas, reduzida e oxidada, apresentam características consistentes com estado penta-coordenado de alto spin do grupo heme tipo b^{18, 79}. O potencial de redução foi determinado para a proteína *ReFixL* em sua forma não ligada utilizando análise global dos espectros obtidos em uma faixa espectral de 350 a 700 nm em ambas as titulações, redutiva e oxidativa. O potencial calculado, E_m , para a proteína *ReFixL* na ausência de ligantes foi de +19 mV, sendo, portanto, ~50 mV inferior àqueles publicados para as proteínas *BjFixLH* (68 mV)⁹ e *Ec DOS* (67 mV)⁶ que foram as únicas espécies com grupo heme incorporado em domínio PAS que tiveram seus potenciais determinados^{6, 9, 56}. Ressalte-se, porém, que os potenciais para as proteínas *BjFixLH* e *Ec DOS* não correspondem aos valores das formas nativas, visto que os experimentos foram realizados apenas para o domínio hémico isolado^{6,9}. Além do valor de E_m para a proteína *ReFixL* na ausência de ligantes, foram calculados, também, os valores dos potenciais de redução, E_{red} , e de oxidação, E_{ox} . Os valores não apresentaram diferença significativa, indicando a reversibilidade do processo, como pode ser observado no inset da **Figura 21a**, descartando histerese. Vale ressaltar que dentre os sistemas estudados este é o único no qual o potencial medido não envolve associação/dissociação de qualquer ligante, estando o ferro pentacoordenado em ambos estados redox.

As proteínas *BjFixL*, *ReFixL* e *Ec DOS* apresentam valores de potencial de redução que refletem uma relativa estabilidade do estado férrico, especialmente quando comparados a sistemas como citocromo c (260 mV)⁸⁰. Em comum estes sistemas possuem o grupo heme tipo b no domínio PAS e histidina quinase como domínio funcional. Por outro lado, citocromo c é uma proteína de transferência de elétrons que possui como cofator um grupo heme do tipo c.

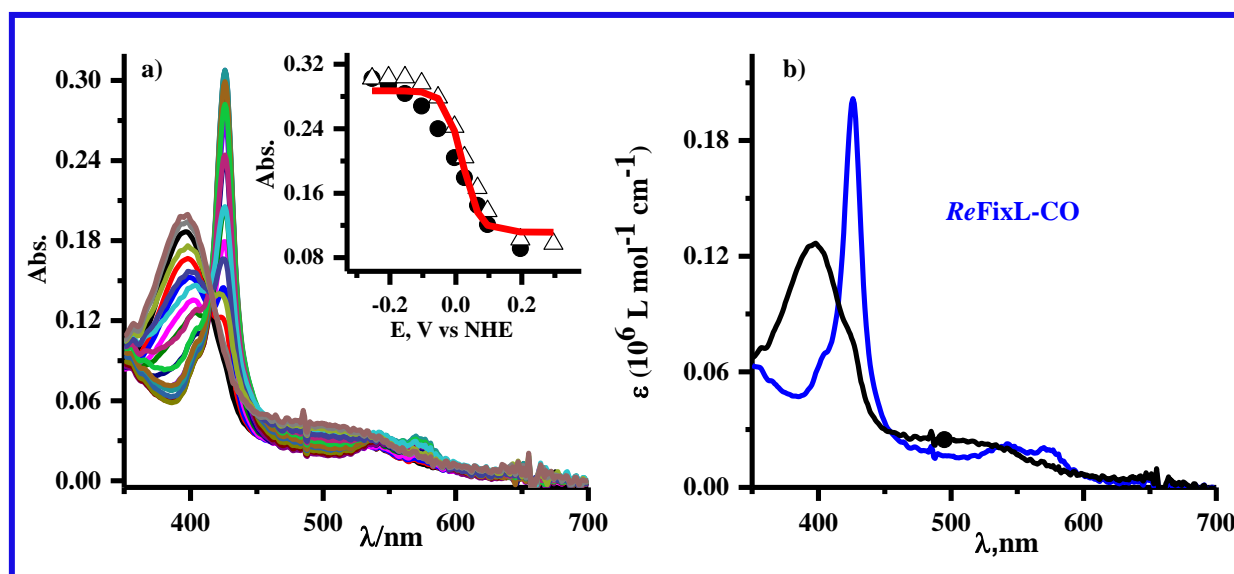
4.1.2.2 CO-*ReFixL*

No intuito de determinar o potencial de redução da proteína *ReFixL* em uma forma ativa, porém coordenada a um ligante axial, foi realizada a titulação espectroeletroquímica da proteína em solução saturada de CO. Uma solução contendo os mediadores [Co((NMe₃)₂sar)]Cl₅ 100 μmol L⁻¹, [CoCLME-N₄S₂-sar)]Cl₃ 100 μmol L⁻¹, [CoAMME-N₅S-sar)]Cl₃ 100 μmol L⁻¹, [Co(sep)]Cl₃ 100 μmol L⁻¹, tampão TRIS (pH 8,0) 35 mmol L⁻¹ e NaCl 100 mmol L⁻¹ foi submetida à borbulhamento de CO por 10 min a fim de garantir sua saturação

(0,93 mM, 25 °C) ⁸¹. O fluxo de CO foi mantido por meio da injeção periódica de CO na cubeta. A proteína foi adicionada à solução eletrolítica em sua forma isolada, met-*ReFixL*. O espectro inicial foi obtido após 20 min de aplicação de potencial de 300 mV a fim de garantir que toda a proteína se encontrasse no estado férrico. O experimento foi realizado em atmosfera aeróbica em vista da baixa afinidade da proteína por O₂ frente à sua afinidade por CO²³. A titulação espectroeletroquímica foi feita por meio da aplicação de potencial na faixa de 250 a -250 mV, nos sentidos oxidativo e redutivo, com incrementos de potencial de 50 mV e de 25 mV quando próximo ao valor de E_m da proteína, nesta condição. A **Figura 22a** apresenta as titulações redutiva e oxidativa da proteína *ReFixL* na presença de CO e seu inset exibe o perfil de absorbância *versus* potencial aplicado para ambas as titulações.

A **Figura 22** apresenta os espectros calculados para as formas totalmente oxidada e reduzida da proteína *ReFixL* na presença de CO, com base nos espectros registrados durante a titulação espectroeletroquímica. A titulação foi iniciada com a proteína na forma met-*ReFixL* e à medida que o potencial foi aplicado na direção negativa foi observado o surgimento de uma banda intensa em 426 nm referente a forma ligada da proteína, CO-*ReFixL*. Quando na forma met-*ReFixL* a banda β não apresentou um máximo bem definido, encontrando-se na região de 500 nm e a medida que a proteína foi reduzida visualizou-se uma maior definição das bandas α e β , em 571 e 542 nm, respectivamente. Este perfil das bandas α e β é uma característica marcante de compostos de baixo spin, consistente com a coordenação ao ligante de campo forte, CO.

Figura 22 — Titulações espectrofotométricas para *ReFixL* na presença do ligante CO. **a)** espectros UV-Vis registrados durante titulação redutiva e oxidativa para CO-*ReFixL* 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de $[\text{Co}((\text{NMe}_3)_2\text{sar})]\text{Cl}_5$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{CoCLME-N}_4\text{S}_2\text{-sar}]\text{Cl}_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{CoAMME-N}_5\text{S-sar}]\text{Cl}_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{Co}(\text{sep})]\text{Cl}_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tampão TRIS (pH 8,0) 35 mmol L^{-1} e NaCl 100 mmol L^{-1} , solução saturada com CO (0,93 mmol L^{-1})⁸¹; inset: perfil absorvância (em 426 nm) *versus* potencial aplicado para proteína durante titulação redutiva (●) e oxidativa (Δ) e **b)** Espectro calculado para forma reduzida CO-*ReFixL* (azul) e forma oxidada *met-ReFixL* (preto).



Fonte: O autor.

O espectro em preto na **Figura 22b**, referente a proteína oxidada, exibe a banda Soret em 395 nm com um pequeno ombro remanescente em 426 nm, indicando a presença do estado ferroso CO-*ReFixL*. A forma CO-*ReFixL* possui absorvidade molar muito superior à forma *met-ReFixL* ($\epsilon = 126 \text{ mmol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$ para *met-ReFixL* e $\epsilon = 202 \text{ mmol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$ para CO-*ReFixL*), que na verdade é uma característica comum em heme proteínas^{18, 26, 82}. A discrepância nos valores torna possível a visualização da forma ligada a CO mesmo em concentrações muito menores que a da forma *met-ReFixL*. Apesar de não atingir a conversão total ao estado *met-ReFixL*, a medida de potencial é confiável, uma vez que o patamar do máximo da espécie oxidada foi atingido e o equilíbrio é mantido entre as formas *met-ReFixL* e CO-*ReFixL*. Adicionalmente não se observou histerese sendo as curvas oxidativas similares as redutivas.

Os valores calculados para os potenciais redox dos sistemas estudados na presença de ligantes apresentam contribuições das respectivas reações acopladas de associação/dissociação dos ligantes. Do ponto de vista termodinâmico, a formação de um complexo pode influenciar

positiva ou negativamente no potencial de redução de um sistema. A formação de um complexo mais estável quando o metal se encontra em seu estado oxidado favorece a oxidação do metal, tornando o potencial de redução do complexo mais negativo quando coordenado ao ligante e a formação de um complexo mais estável com o estado reduzido do metal torna o potencial de redução do complexo coordenado mais positivo. Isto ocorre devido aos diferentes graus de afinidade dos ligantes pelos estados reduzido e oxidado de um centro metálico M, que resulta em uma dependência do valor de potencial com as constantes de afinidade, como pode ser visto na Equação 10 ⁸³:

$$E(ML) = E^{0'} + \frac{0,059}{n} \log \frac{K_{ox}}{K_{red}} \quad \text{Equação 10}$$

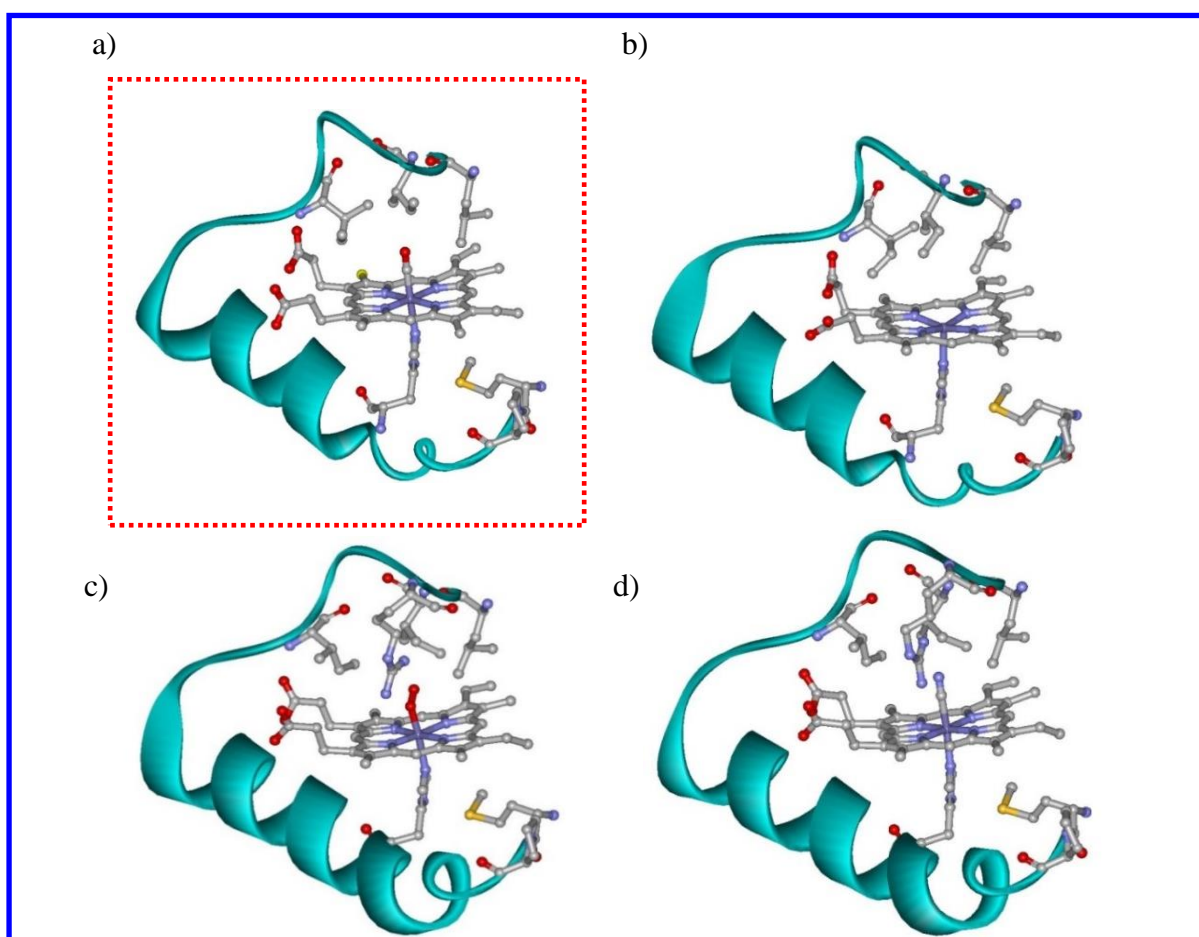
em que $E(ML)$ é o potencial de redução da espécie na presença de um ligante L, $E^{0'}$ o potencial formal da espécie na ausência de ligante, K_{ox} e K_{red} são as constantes de dissociação das espécies oxidada e reduzida, respectivamente, na presença do ligante L. Para simplificação todos os potenciais determinados neste trabalho foram chamados E_m .

A elevada afinidade da proteína no estado ferroso por CO ($K_d = 8 \mu\text{mol L}^{-1}$)²³ resulta em um complexo bastante estável. Seria esperado, portanto, variações significativas de potencial no sentido positivo em relação a proteína na sua forma não ligada *deoxi-ReFixL*. Este comportamento foi, de fato, observado para o citocromo P450 CYP2C9 (Fe^{II}) em que o potencial de redução foi deslocado 49 mV no sentido positivo em relação a forma não ligada ⁸⁰. Entretanto, para a proteína *ReFixL*, o valor de E_m determinado para a forma CO-*ReFixL* foi calculado em 21 mV, ou seja, apenas 2 mV mais positivo que a forma não ligada. Este deslocamento é considerado insignificante comparado à diferença de afinidade por CO das formas reduzida e oxidada da proteína. Entretanto, devido a complexidade de sistemas proteicos diversos fatores podem influenciar os valores de potencial de redução, contrabalançando a contribuição das constantes de afinidade de formação dos complexos finais. A proteína guanilato ciclase solúvel, por exemplo, experimenta uma variação positiva de potencial de 22 mV induzida pela ligação com YC-1. Este ligante atua como um ativador da atividade enzimática da proteína, provocando mudanças conformacionais na estrutura secundária da mesma, apesar de não se ligar diretamente ao centro metálico. O efeito alostérico observado, porém, leva à alteração na segunda esfera de coordenação do centro metálico, responsável pela variação do valor de potencial ⁸⁴. Como a estrutura da proteína *ReFixL* ainda não foi determinada, as análises em termos de mudanças conformacionais são realizadas em termos comparativos com as estruturas resolvidas das proteínas *BjFixL* e *RmFixL*^{30, 43, 54, 82}. Estas

proteínas, conforme mencionado anteriormente, apresentam elevada similaridade em termos de sequências de aminoácidos. Vale salientar que mesmo para estes sistemas não há estruturas resolvidas para a proteína nativa, apenas para o domínio heme-PAS. As estruturas para este domínio foram determinadas na ausência e presença dos ligantes O_2 , CO , NO , CN^- e imidazol^{21, 43, 54, 55, 82}.

A **Figura 23** exibe algumas estruturas cristalinas determinadas para a proteína CO-*BjFixL*, met-*BjFixL*, oxi-*BjFixL* e cianomet-*BjFixL* para fins de discussão de correlação.

Figura 23 — Estruturas cristalinas da proteína *BjFixL* nas formas a) CO-*BjFixL*, destacada em linha pontilhada vermelha (PDB 1XJ2), b) met-*BjFixL* (PDB 2VV6), c) oxi-*BjFixL* (PDB 1DP6) e d) cianomet-*BjFixL* (PDB 1LT0).



Fonte: Referência⁸⁵.

A proteína CO-*BjFixL* foi cristalizada em três diferentes grupos espaciais R32 (uma molécula independente na unidade assimétrica), C2 (duas moléculas independentes) e P1 (quatro moléculas independentes). Portanto, no total há 7 estruturas determinadas para este estado⁸². Os aminoácidos alifáticos Ile-215, Ile-238 e Leu-236 encontram-se destacados nas

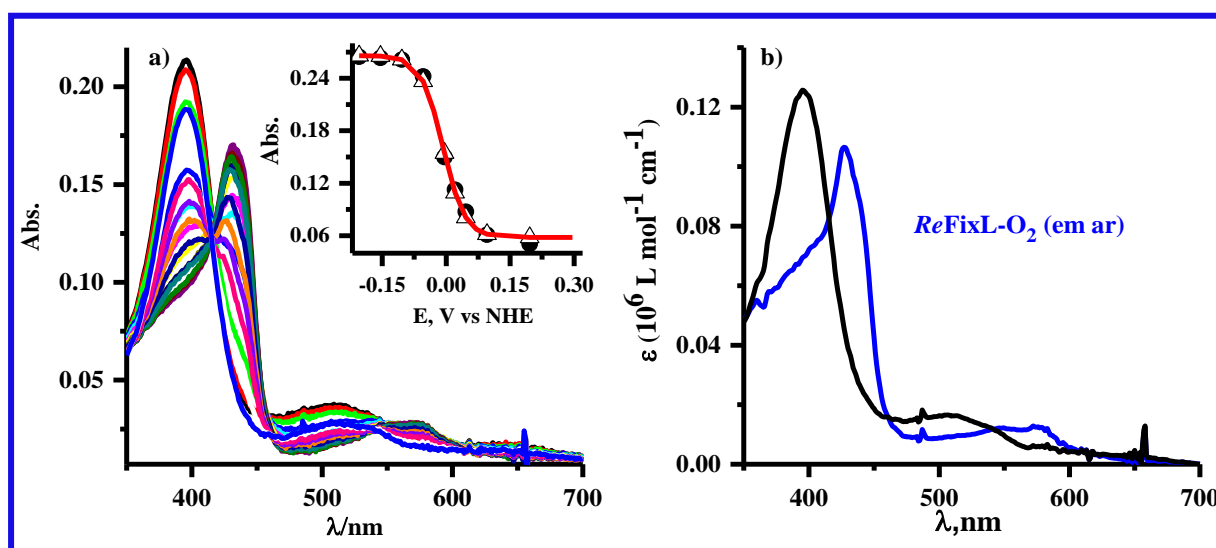
Figura 23 **a)** a **d)**. Em uma análise global, pode-se observar que estes três aminoácidos apresentam diferentes conformações em 6 das 7 estruturas disponíveis. Interessantemente, outras 5 estruturas disponíveis da proteína *BjFixL* foram analisadas, sendo elas formas ligadas e não ligadas nos estados férrico e ferroso, respectivamente, e observou-se que em 4 das 5 estruturas estes aminoácidos não mudam de conformação. Pode-se deduzir, desta forma, que estes aminoácidos hidrofóbicos apresentam uma flexibilidade marcante quando na forma CO-*BjFixL* frente à uma inegável rigidez de outras formas da proteína. Key e colaboradores⁸² sugeriram que a alteração na planaridade do grupo heme da proteína *BjFixL* causada pela coordenação do sexto ligante, diferentemente das formas *oxi-BjFixL* e *cianomet-BjFixL*, é transmitida ao FG *loop* por meio da ligação de hidrogênio formada entre propionato 6 e Ile-216, enquanto Arg-220 e o propionato 7 não sofrem alterações quando o grupo heme se liga a CO. Os autores⁸² detectaram deslocamentos dos resíduos Ile-215, Ile-216 e Gly-217 em decorrência das interações ocorridas. As alterações ocorridas no FG *loop*, porém, não são da mesma magnitude daquelas observadas quando a proteína se liga a CN^- ou O_2 , o que corrobora com o fato de CO não provocar perda significativa da atividade quinase da proteína, mantendo-a praticamente enzimaticamente ativa. Assim, há um rearranjo significativo destes resíduos quando CO-*BjFixL* se oxida a met-*BjFixL* ou quando na forma deoxi-*BjFixL*. Estas alterações podem estar relacionadas a rearranjos de moléculas de solvente que estabilizam o estado férrico, contrabalançando a estabilização gerada pela alta afinidade do estado ferroso por CO, assim contribuindo para um potencial menos positivo que o esperado diante da forte afinidade do estado ferroso com o ligante CO. De fato, estudos reportados na literatura para citocromo c mostraram que uma maior exposição do grupo heme ao solvente causam um deslocamento negativo de potencial, estabilizando o estado o férrico⁸⁶.

4.1.2.3 *oxi-ReFixL*

O potencial de redução da proteína *ReFixL* foi determinado na presença de seu ligante fisiológico, O_2 . Inicialmente, a titulação espectroeletroquímica foi realizada em ar à 20 °C, cuja saturação de O_2 em solução é de 0,286 mmol L⁻¹⁸¹. A composição da solução utilizada foi *ReFixL* 15 µmol L⁻¹, [Co((NMe₃)₂sar)]Cl₅ 100 µmol L⁻¹, [CoCLME-N₄S₂-sar)]Cl₃ 100 µmol L⁻¹, [CoAMME-N₅S-sar)]Cl₃ 100 µmol L⁻¹, [Co(sep)]Cl₃ 100 µmol L⁻¹, tampão TRIS (pH 8,0) 35 mmol L⁻¹ e NaCl 100 mmol L⁻¹. O espectro inicial da proteína correspondeu a forma met-*ReFixL*. Para garantir que o átomo de ferro estivesse totalmente em seu estado férrico, antes de iniciar a titulação redutiva foi aplicado um potencial de 300 mV por 20 min. Em seguida, a

titulação espectroeletroquímica foi realizada no sentido redutivo e oxidativo a fim de verificar a reversibilidade e histerese do processo. A faixa de potencial utilizada foi de 200 a -300 mV em intervalos de 50 mV e de 25 mV quando próximo do valor de E_m . Os espectros registrados após aplicação de cada potencial são apresentados nas **a**. A **b** ilustra os espectros calculados para as formas reduzida e oxidada da proteína, baseados nos espectros experimentais.

Figura 24 — Titulações espectrofotométricas para ReFixL na presença do ligante O₂ (em ar). **a)** espectros UV-Vis registrados durante titulação redutiva e oxidativa em ar para oxi- ReFixL 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de [Co((NMe₃)₂sar)]Cl₅ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [CoCLME-N₄S₂-sar)]Cl₃ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [CoAMME-N₅S-sar)]Cl₃ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e [Co(sep)]Cl₃ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tampão TRIS (pH 8,0) 35 mmol L^{-1} e NaCl 100 mmol L^{-1} , solução saturada em oxigênio (0.286 mmol L^{-1} à 20 oC); inset: perfil absorbância (em 428 nm) versus potencial aplicado para proteína durante titulação redutiva (•) e oxidativa (Δ) e **b)** Espectro calculado para forma reduzida oxi-ReFixL (azul) e forma oxidada met-ReFixL (preto).



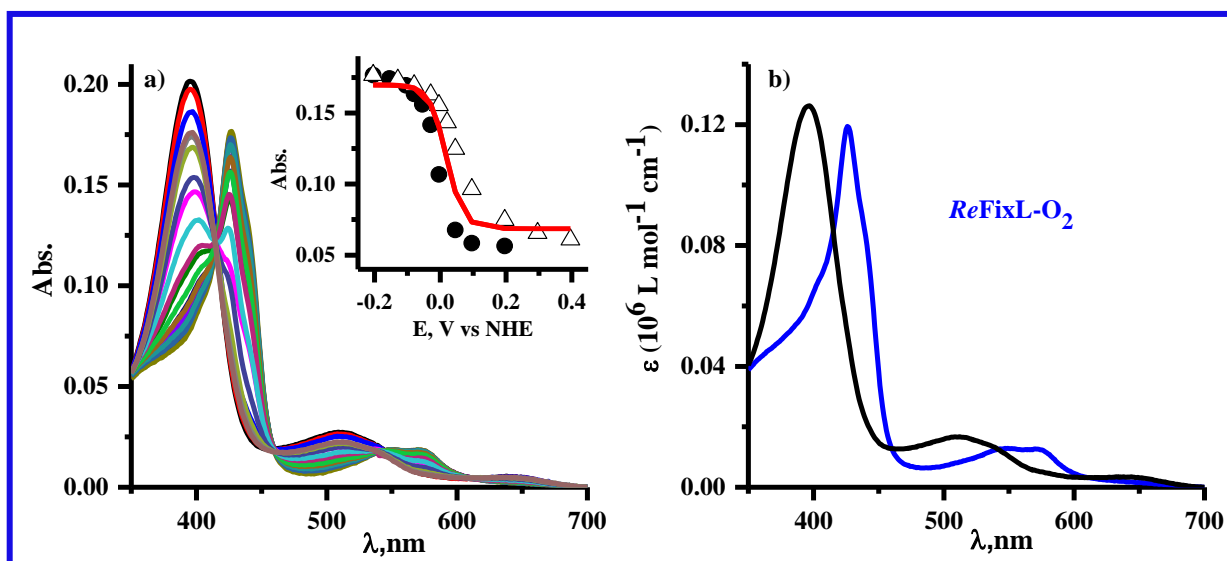
Fonte: O autor.

À medida que o potencial foi aplicado no sentido negativo, a banda Soret se deslocou de 395 nm para 428 nm, sendo perceptível a diferença entre os espectros das formas *deoxi-ReFixL* (**Figura 21**) e *oxi-ReFixL*. Outra característica espectral marcante da forma *oxi* é a separação e o deslocamento das bandas α e β . Apesar da baixa resolução, é possível observar que a banda α (569 nm) é melhor resolvida, comparativamente ao estado não ligado, enquanto a banda β se deslocou de 500 para 554 nm. Como mencionado previamente, a separação das bandas α e β é característica do grupo heme hexa-coordenado em configuração de baixo spin¹⁸. A assimetria da banda Soret observada no espectro da forma *oxi-ReFixL* (espectro em azul,

b e a baixa definição das bandas α e β devem-se à baixa afinidade da proteína *ReFixL* por O_2 e consequente formação da mistura *deoxi-ReFixL* e *oxi-ReFixL* quando a proteína é reduzida. De fato, a saturação da forma *oxi-ReFixL* em ar e oxigênio puro é de apenas 26% e 63%, respectivamente ²³. Assim, como esperado para o ligante CO, esperar-se-ia uma variação positiva de potencial para o ligante O_2 . A variação observada, entretanto, foi de -31 mV em relação ao estado não ligado da proteína. Devido à baixa saturação de oxigênio ligado o experimento foi realizado também em oxigênio puro a fim de determinar se o efeito no potencial seria mais pronunciado. A solução eletrolítica teve a mesma composição do sistema utilizado em ar. Antes da adição da proteína *ReFixL*, porém, a solução contendo mediadores, tampão TRIS (pH 8,0) e NaCl foi submetida a borbulhamento de O_2 (saturação de 1,2 mmol L⁻¹ a 25 °C) por 10 min para garantir sua saturação. Em seguida, a proteína foi adicionada à solução e o fluxo de O_2 foi mantido na parte superior da cubeta. A faixa de potencial aplicado foi de 400 a -200 mV e tempo de aplicação de cada potencial foi o mesmo do experimento realizado em ar. Os espectros registrados após aplicação de cada potencial e os espectros calculados para as formas oxidada e reduzida da proteína são apresentados nas **Figura 25a e b**, respectivamente.

As alterações espectrais observadas na presença de O_2 puro, embora semelhantes às mencionadas na presença de ar, foram mais pronunciadas conforme esperado devido à concentração de O_2 . A banda Soret, por exemplo, apresentou um deslocamento, de 395 nm para 426 nm. No estado reduzido, essa banda apresenta intensidade próxima daquela correspondente ao estado met devido, provavelmente, a maior concentração da forma *oxi-ReFixL*, cujo coeficiente de absortividade molar é maior que a forma *deoxi-ReFixL*. As bandas α e β apresentaram deslocamentos para 570 e 550 nm, respectivamente. Adicionalmente, a banda Soret da proteína no estado reduzido na presença de O_2 apresentou-se mais fina que a banda registrada em ar. Este perfil se assemelha aquele relatado por Sousa e colaboradores ²³ para a proteína Δ PAS1-*ReFixL* que atinge 93 % de saturação na forma oxigenada.

Figura 25 — Titulações espectrofotométricas para *ReFixL* na presença do ligante O_2 (em O_2)
a) Espectros UV-Vis registrados durante titulação redutiva e oxidativa em O_2 puro para *oxi-ReFixL* $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de $[\text{Co}((\text{NMe}_3)_2\text{sar})]\text{Cl}_5$ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{CoCLME-N}_4\text{S}_2\text{-sar}]\text{Cl}_3$ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{CoAMME-N}_5\text{S-sar}]\text{Cl}_3$ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{Co}(\text{sep})]\text{Cl}_3$ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, tampão TRIS (pH 8,0) 35 mmol L^{-1} e NaCl 100 mmol L^{-1} , solução saturada em oxigênio ($1,25 \text{ mmol L}^{-1}$ a 25°C); inset: perfil absorbância (em 426 nm) versus potencial aplicado para proteína durante titulação redutiva (\bullet) e oxidativa (Δ) e **b)** Espectro calculado para forma reduzida *oxi-ReFixL* (azul) e forma oxidada *met-ReFixL* (preto).



Fonte: O autor.

Assim como para o experimento realizado em ar, o valor do potencial de redução determinado para a proteína *ReFixL* na presença de O_2 apresentou uma variação negativa em relação ao estado não ligado da proteína. Além disso, devido à maior concentração da proteína na forma *oxi-ReFixL*, o deslocamento foi mais pronunciado que para o experimento realizado em ar, $E_m = -51 \text{ mV}$, resultado em um deslocamento negativo de 70 mV em relação a forma não ligada. Este comportamento corrobora com o sistema anterior (*CO-ReFixL*) no sentido de que a regulação de potencial neste sistema não se dá apenas pela sua afinidade com os ligantes coordenados ao grupo heme e sim à uma série de fatores, tais como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas que ocorrem no microambiente do grupo heme, além de efeitos estéricos de resíduos aminoácidos e efeitos de solvatação, dentre outros. De fato, foi reportada na literatura uma diferença marcante na afinidade da proteína *ReFixL* por oxigênio e inativação da atividade quinase causada pela retirada do domínio PAS vizinho ao domínio heme-PAS²³ que, aparentemente, não teria efeito significativo no mecanismo de sinalização da proteína. Assim, a complexidade dos rearranjos que podem ocorrer neste sistema dificulta a nomeação

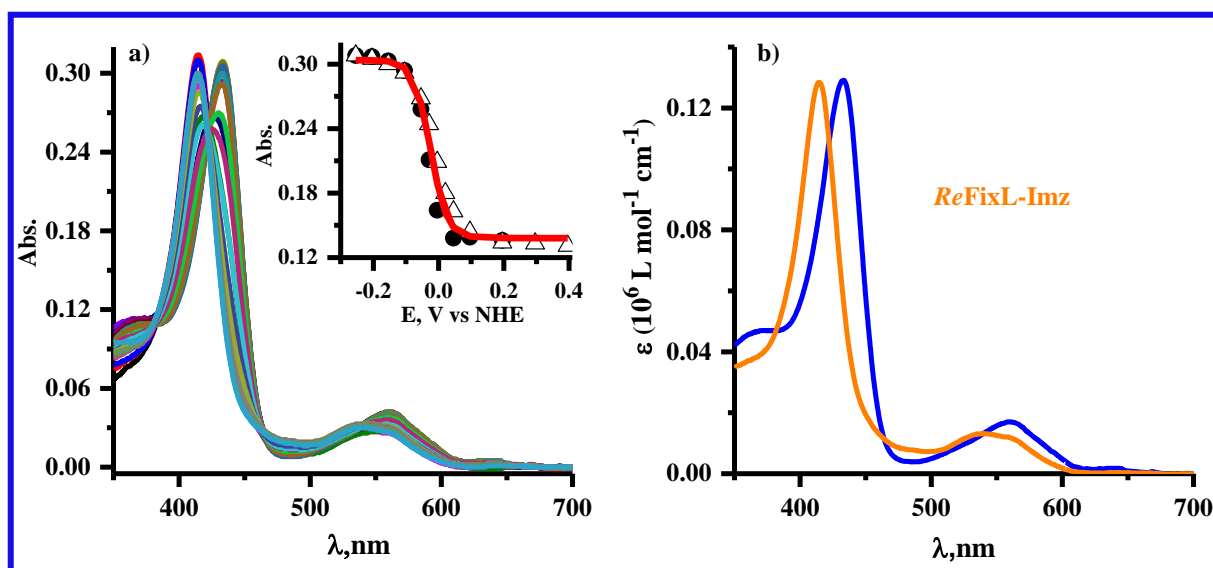
dos fatores responsáveis pelos deslocamentos de potencial registrados. A proteína *BjFixL* possui dois resíduos arginina importantes para a regulação de sinal (Arg-206 e Arg220) que protagonizam uma série de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio com o ligante ou resíduos proximais no microambiente do grupo heme. A importância destes resíduos foi estudada por meio de mutações feitas na proteína *BjFixL*, que mostraram a influência na afinidade por ligantes e regulação da atividade quinase^{9, 30, 53, 87}. Na proteína *ReFixL* o resíduo arginina é conservado na posição 213 e o resíduo Arg-206 se conserva parcialmente como um resíduo passível de sofrer as mesmas interações, His-193. Para a proteína *BjFixL*⁴³, após se ligar a O₂, o resíduo Arg-220 perde sua ponte salina com um dos oxigênios do propionato 7 do grupo heme e passa a formar ligação de hidrogênio com o ligante axial O₂. Se este comportamento for considerado para a proteína *ReFixL*, esta interação, possivelmente, enfraquece a ligação Fe-O₂ devido a retirada de densidade eletrônica, desestabilizando o estado ferroso e induzindo, consequentemente, deslocamento de potencial mais negativo que o esperado.

Apesar da baixa afinidade da proteína *ReFixL* por seu ligante fisiológico, a regulação da atividade quinase por este ligante é bastante eficaz. O mesmo comportamento é observado para outras proteínas *FixL*. Sousa e colaboradores⁵¹ propuseram um modelo de efeito memória para a proteína *BjFixL*, baseado na observação de que a atividade quinase remanescente quando a proteína encontra-se parcialmente oxigenada (64% em ar e 88% em O₂) é de apenas 2% e 0,08%, respectivamente. Curiosamente, quando uma proteína do tipo *FixL* se liga a oxigênio, ou a ligantes que mimetizam seu papel como inibidor da atividade quinase, o microambiente do grupo heme sofre alterações conformacionais em sua estrutura secundária. Estas alterações são transmitidas ao domínio quinase que, por sua vez, experimenta mudanças conformacionais que inativam a proteína. Quando ocorre uma diminuição na concentração de O₂ o complexo *BjFixL*-O₂ se dissocia e o grupo heme volta para sua conformação ativa (*deoxi*). O domínio quinase, entretanto, apresenta resposta lenta com respeito a velocidade de associação ao O₂. O modelo memória proposto explica a não linearidade entre concentração da forma *deoxi-BjFixL* e atividade quinase por meio do maior tempo de recuperação (T_{rec}) da conformação ativa do domínio quinase frente ao tempo de meia vida do estado *deoxi-BjFixL* (T_{deoxi}) em uma certa concentração de O₂.

4.1.2.4 *imz-ReFixL*

Com o objetivo de estudar efeitos estéricos no microambiente do grupo heme e sua influência no potencial de redução do sistema por meio de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio, foi determinado o valor de E_m para a forma ligada da proteína imz-*ReFixL*. Sabendo que o ligante imidazol se liga ao grupo heme no seu estado férrico, a titulação espectroeletroquímica para este sistema foi realizada em uma câmara anaeróbica. Nesta condição, evita-se, também, a coordenação do ligante O_2 à proteína no estado ferroso. Foram utilizados como mediadores $[Co((NMe_3)_2sar)]Cl_5$ 100 $\mu mol\ L^{-1}$, $[CoCLME-N_4S_2-sar)]Cl_3$ 100 $\mu mol\ L^{-1}$, $[CoAMME-N_5S-sar)]Cl_3$ 100 $\mu mol\ L^{-1}$, $[Co(sep)]Cl_3$ 100 $\mu mol\ L^{-1}$, como eletrólito de suporte utilizou-se tampão TRIS (pH 8,0) 35 $mmol\ L^{-1}$ e NaCl 100 $mmol\ L^{-1}$. A proteína *ReFixL* 15 $\mu mol\ L^{-1}$ foi adicionada à esta solução e um espectro inicial foi registrado, onde verificou-se que a proteína estava em sua forma met-*ReFixL*. À esta solução foi adicionada uma alíquota do ligante imidazol de forma que sua concentração na cubeta fosse 200 $mmol\ L^{-1}$. A solução de imidazol foi preparada em tampão TRIS (pH 8,0) 35 $mmol\ L^{-1}$ e NaCl 100 $mmol\ L^{-1}$. Como a proteína isolada encontra-se na forma met, ao ser adicionada à solução, a mesma se ligou rapidamente ao imidazol devido à alta concentração deste ligante, evidenciado pelo deslocamento da banda Soret de 395 para 415 nm. Para se certificar de que no início da titulação espectroeletroquímica a forma *deoxi-ReFixL* não estava presente foi aplicado um potencial de 400 mV por 20 min. Em seguida, a titulação foi iniciada no sentido redutivo com aplicação de potencial na faixa de 300mV a -250 mV em intervalos de 50 mV e 25 mV quando próximo do valor de E_m do sistema. Durante a titulação redutiva, a proteína foi gradativamente convertida à sua forma *deoxi-ReFixL*. Uma vez que não se observou qualquer alteração espectral, o sentido da titulação foi invertido a fim de recuperar a forma imz-*ReFixL*. A faixa de aplicação de potencial para a titulação oxidativa foi a mesma da titulação redutiva. Na **Figura 26a** são apresentados os espectros registrados após aplicação de cada potencial (inset o perfil de absorbância ($\lambda_{432\ nm}$) vs potencial aplicado) e na **Figura 26b** os espectros calculados para as formas imz-*ReFixL* e *deoxi-ReFixL*.

Figura 26 — Titulações espectrofotométricas para *ReFixL* na presença do ligante imidazol **a)** espectros UV-Vis registrados durante titulação redutiva e oxidativa em câmara anaeróbica para imz-*ReFixL* 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de imidazol 200 mmol L^{-1} , $[\text{Co}((\text{NMe}_3)_2\text{sar})]\text{Cl}_5$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{CoCLME-N}_4\text{S}_2\text{-sar}]\text{Cl}_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{CoAMME-N}_5\text{S-sar}]\text{Cl}_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{Co(sep)}]\text{Cl}_3$ 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tampão TRIS (pH 8,0) 35 mmol L^{-1} e NaCl 100 mmol L^{-1} ; inset: perfil absorbância (em 432 nm) versus potencial aplicado para proteína durante titulação redutiva (●) e oxidativa (Δ) e **b)** Espectro calculado para forma reduzida deoxi-*ReFixL* (azul) e forma oxidada imz-*ReFixL* (laranja).



Fonte: O autor.

No espectro inicial verificou-se que a proteína tinha o perfil da sua forma met-*ReFixL* com a banda Soret em 395nm, banda β em 500 nm e a banda α como um ombro da banda β . Quando adicionou-se imidazol (200 mmol L^{-1}), rapidamente se observou a formação da forma imz-*ReFixL*, evidenciada pelos deslocamentos da banda Soret para 415 nm e da banda β para 535 nm com um ombro à sua direita correspondente à banda α . Apesar de se formar um complexo de configuração de baixo spin quando o grupo heme se liga ao imidazol, as bandas α e β não são bem resolvidas. Este resultado é atribuído ao caráter π -acceptor do imidazol que aumenta a intensidade da banda β impossibilitando a definição da banda α , de menor intensidade. Ao se iniciar a titulação redutiva, a banda Soret em 415 nm se desloca gradativamente para 432 nm, que corresponde ao perfil do estado *deoxy-ReFixL*. Quando não foram observadas alterações espectrais relativas ao aumento da concentração da espécie *deoxy*, o sentido da aplicação de potencial foi invertido e observou-se a recuperação da forma imz-

ReFixL. Apesar da titulação envolver dissociação/associação de ligante, não foi observada histerese significativa, como pode ser visto no inset da **Figura 26a**. O potencial determinado para a forma imz-*ReFixL* foi de -57 mV, ou seja, uma variação de -76 mV em relação a forma não ligada. Neste caso, o deslocamento é consistente com o esperado em termos de afinidade com ligante, ou seja, uma vez que o ligante imidazol se liga ao maior estado de oxidação do ferro, espera-se uma variação negativa de potencial devido à estabilização do estado oxidado. Vale ressaltar que, juntamente com O₂ e CN⁻, o ligante imidazol é uma das espécies que induzem maiores alterações conformacionais no microambiente do grupo heme para *BjFixL*. O deslocamento do FG *loop* provocado por alterações nas interações ocorridas no microambiente do grupo heme quando este se liga ao imidazol é da mesma magnitude daquele reportado para a forma *oxi-BjFixL* ⁵⁴. Este ligante, entretanto, não interage com o resíduo Arg-220 como as formas *oxi* e cianomet da proteína *BjFixL*. O resíduo Ile-218, que na forma met-*BjFixL* encontra-se direcionado ao solvente, apresenta rotação do grupo carbonil na forma imidazólica e forma ligações de hidrogênio com moléculas de água. Já o resíduo Arg-220 se posiciona para fora do microambiente do grupo heme. Nas formas *oxi* e cianomet, há formação de ligações de hidrogênio entre moléculas de H₂O e o grupo guanidina do resíduo Arg-220 estabilizando, possivelmente, este resíduo para uma interação efetiva com o ligante. O fato de não ter ocorrido interação do resíduo Arg-220 com o ligante imidazol, corrobora com a prerrogativa de que vários fatores influenciam na inativação da atividade quinase da proteína por um ligante. Na coordenação do ligante imidazol foi identificado, também, o reposicionamento dos resíduos Ile-238 e Ile-215, sendo o maior deslocamento observado para o resíduo Ile-215 que se encontra no FG *loop*, enquanto o resíduo Ile-238 encontra-se na região hidrofóbica (mais flexível quando a proteína se liga a CO). De uma forma global, o efeito alostérico provocado pela ligação dos ligantes mencionados apontam para uma forte contribuição destes para a inativação da atividade quinase da proteína *BjFixL*. Independente desta rede de interações ser a mesma ou não para a proteína *ReFixL*, provavelmente o mecanismo é similar e leva ao mesmo fim: o proporcionamento da interação entre os diferentes domínios da proteína de forma que a sinalização molecular ocorra. Portanto, a similaridade de comportamento destas proteínas em termos de ligantes inativadores da atividade quinase, afinidades com os mesmos e conservação de resíduos importantes no mecanismo de sinalização da proteína torna fundamental o uso de estruturas disponíveis da proteína *BjFixL* como suporte para a interpretação de novos resultados.

A escassez de estudos eletroquímicos para sistemas de hemeproteínas histidina quinase dificulta a associação do que é conhecido até o momento em termos de mecanismo de sinalização molecular e potenciais redox para as diferentes formas dos sistemas. Entretanto, alguns estudos para a proteína *BjFixL* feitos em duas publicações diferentes por Balland e colaboradores^{9, 53} retrata a importância funcional do resíduo Arg-220 por meio da substituição deste (o único resíduo carregado no microambiente do grupo heme), de forma a modificar propriedades eletrostáticas sem grandes alterações estéricas. Os resíduos utilizados na posição 220 foram glutamina, ácido glutâmico, isoleucina e histidina, gerando os mutantes R220Q, R220E, R220I e R220H, respectivamente. Os autores^{9, 53} observaram uma diminuição significativa na afinidade por oxigênio para os mutantes R220Q e R220I, enquanto o mutante R220E não se liga à O₂ e R220H tem uma afinidade maior por O₂ que a forma nativa da proteína. Estes resultados são condizentes com os dados para a proteína na forma nativa, uma vez que este ligante pode gerar interações semelhantes à arginina no microambiente do grupo heme. Os valores dos potenciais redox para os sistemas foram calculados apenas para os mutantes na forma *deoxi-BjFixL* e, ainda assim, foi possível observar variações nestes parâmetros, com uma diminuição de 68 mV para 41, 38, 24 e 40 mV para os mutantes R220Q, R220I, R220E e R220H, respectivamente.

4.1.2.5 cianomet-*ReFixL*

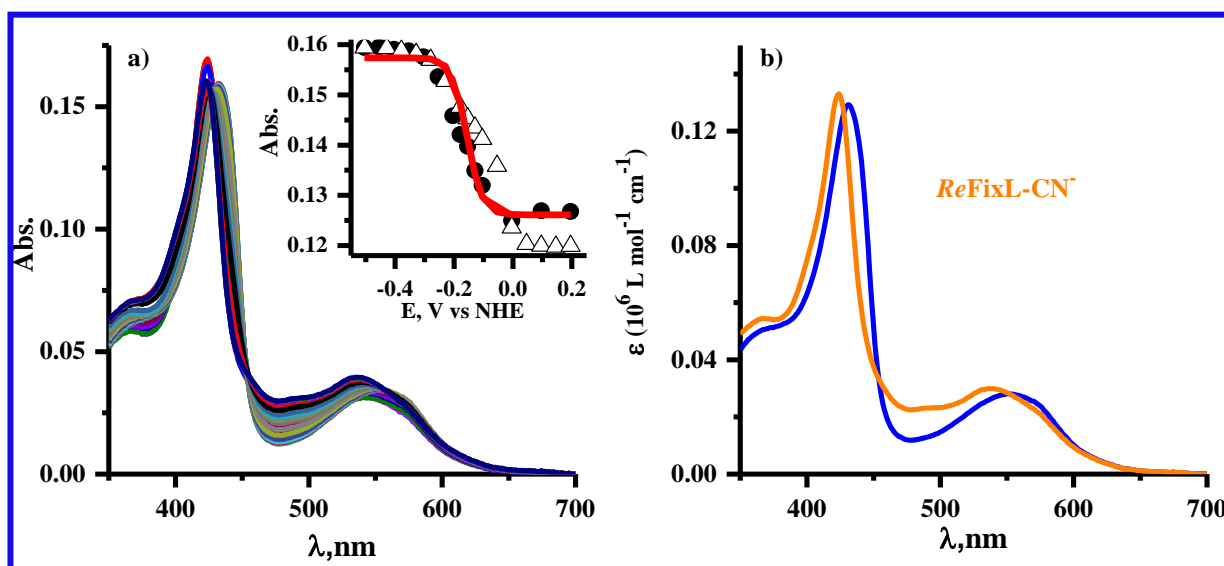
Cianeto é um ligante interessante a ser estudado para sistemas *FixL* uma vez que induz as mesmas alterações conformacionais no estado férrico que o O₂ induz no estado ferroso, por consequência inativando a proteína^{43, 55, 87}. Além disso, o estado ferroso *oxi-ReFixL* e férrico cianomet-*ReFixL* são isoeletrônicos⁸⁷. Os estudos iniciais com cianeto foram realizados utilizando uma malha de ouro como eletrodo de trabalho, assim como todos os outros sistemas estudados neste trabalho. O processo, entretanto, não apresentou reversibilidade visto que, após a redução da proteína não foi possível recuperar a forma cianomet-*ReFixL*. Este resultado foi atribuído à diminuição da concentração de CN⁻ em consequência da formação do complexo [Au(CN)₂]⁻ durante a aplicação de potencial. Assim, fez-se necessário a utilização de uma superfície eletródica inerte ao eletrólito contendo íons cianeto. Utilizou-se para tanto, uma malha de platina como eletrodo de trabalho, já que a platina é inerte à oxidação na presença de CN⁻ na faixa de potencial utilizada neste trabalho. Além disso, neste experimento, fez-se necessário o uso de valor de pH diferente (9,5) dos demais a fim de evitar a protonação do ligante (pK_a = 9,2) e posterior diminuição de concentração por evaporação devido à volatilidade

da espécie formada, HCN.⁸¹ Para efeito de comparação foi realizada a titulação espectroeletroquímica da proteína *ReFixL* em pH 9,5 na ausência de CN⁻.

Assim como o ligante imidazol, a espécie CN⁻ se liga ao estado férrico do grupo heme. Desta forma, a solução eletrolítica foi submetida a borbulhamento de argônio por 20 min. A atmosfera anaeróbica foi mantida com fluxo de argônio na parte superior da cubeta a fim de evitar a coordenação de O₂ ao grupo heme. A titulação espectroeletroquímica foi realizada em uma faixa de potencial maior que nos outros sistemas, de 200 a -500 mV em intervalos de 50 mV e de 25 mV quando próximo do valor de Em. Devido à aplicação de potenciais mais negativos, foram utilizados os seguintes mediadores: [Co((NMe₃)₂sar)]Cl₅ 100 µmol L⁻¹, [CoCLME-N₄S₂-sar)]Cl₃ 100 µmol L⁻¹, [CoAMME-N₅S-sar)]Cl₃ 100 µmol L⁻¹, [Co(sep)]Cl₃ 100 µmol L⁻¹, [Co(AMMEsar)]Cl₃ 100 µmol L⁻¹ e [Co(*trans*-diammac)](ClO₄)₃ 100 µmol L⁻¹. Como eletrólito de suporte foi utilizado tampão TRIS(pH 9,5) 35 mmol L⁻¹ e NaCl 100 mmol L⁻¹. À esta solução foi adicionada a proteína *ReFixL* 15 µmol L⁻¹ e registrado um espectro inicial do sistema, onde verificou-se que a proteína estava em sua forma met-*ReFixL*. Em seguida, foi adicionado KCN 1 mmol L⁻¹, preparado em TRIS (pH 9,5) 35 mmol L⁻¹ e NaCl 100 mmol L⁻¹. Na **Figura 27a** são exibidos os espectros registrados após estabilização de cada potencial (inset: sobreposição do perfil absorbância (λ=432 nm) *versus* potencial aplicado para as titulações redutiva e oxidativa) e na **Figura 27b** os espectros calculados para a espécie totalmente reduzida (*deoxi-ReFixL*) e oxidada (cianomet-*ReFixL*).

Imediatamente após a adição de KCN observou-se a formação de uma banda intensa e fina em 421 nm, devido a conversão da proteína à forma cianomet-*ReFixL*. Em seguida, iniciou-se a aplicação de potencial no sentido negativo e a proteína foi gradualmente convertida à forma *deoxi-ReFixL*, conforme evidenciado pelo deslocamento da banda Soret de 421 nm para 432 nm. O ligante cianeto, tal como imidazol, possui um forte caráter π-acceptor. Essa característica implica no aumento de intensidade da banda β em relação a banda α, diminuindo a definição desta¹⁸. Ao reduzir a proteína, a banda β apresentou deslocamento de 533 nm para 556 nm.

Figura 27 — Titulações espectrofotométricas para *ReFixL* na presença do ligante CN^- . **a)** espectros UV-Vis registrados durante titulação redutiva e oxidativa em câmara anaeróbica para cianomet-*ReFixL* $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de $\text{KCN } 1 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{Co}((\text{NMe}_3)_2\text{sar})]\text{Cl}_5$ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{CoCLME-N}_4\text{S}_2\text{-sar}]\text{Cl}_3$ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{CoAMME-N}_5\text{S-sar}]\text{Cl}_3$ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{Co}(\text{AMMEsar})]\text{Cl}_3$ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{Co}(\text{trans-diammac})](\text{ClO}_4)_3$ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, tampão TRIS (pH 9,5) 35 mmol L^{-1} e $\text{NaCl } 100 \text{ mmol L}^{-1}$; inset: perfil de absorbância (em 432 nm) versus potencial aplicado para proteína durante titulação redutiva (\bullet) e oxidativa (Δ) e **b)** Espectro calculado para forma reduzida deoxi-*ReFixL* (azul) e forma oxidada cianomet-*ReFixL* (laranja). Obs.: Neste caso o eletrodo de trabalho utilizado foi uma malha de platina.



Fonte: O autor.

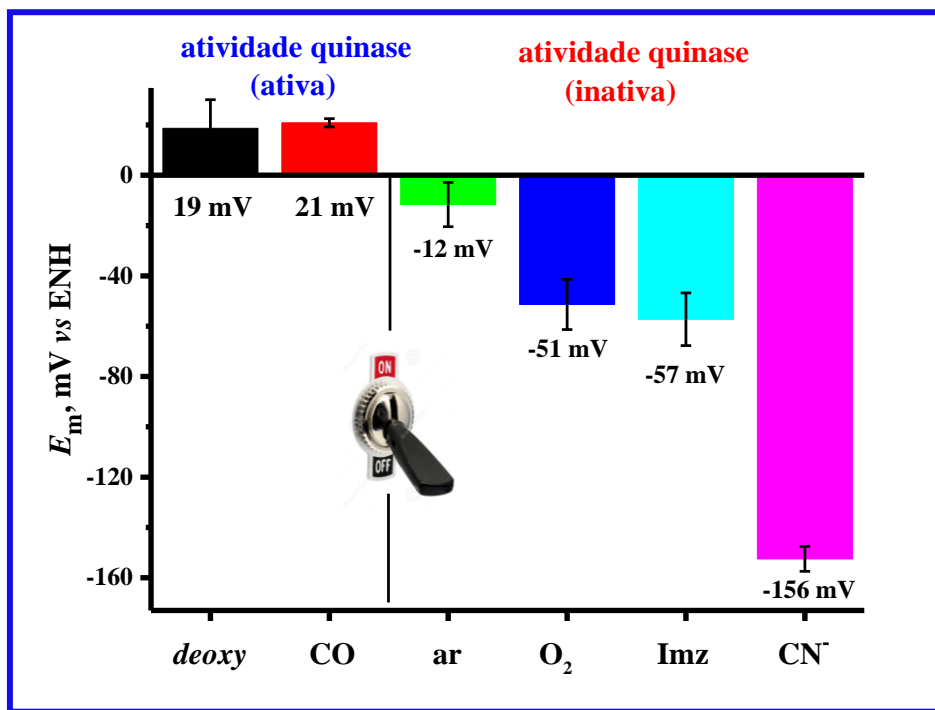
O potencial de redução determinado para a proteína em sua forma cianomet-*ReFixL* foi de -156 mV. Como pode ser visto no inset da **Figura 27a** o processo não apresenta histerese significativa. O deslocamento de potencial relativo à proteína na sua forma pentacoordenada em pH 9,5 foi de -145 mV. Assim como para a forma imz-*ReFixL*, o deslocamento de potencial foi o esperado termodinamicamente, uma vez que ele se trata de um ligante para a forma oxidada, com a magnitude do deslocamento de potencial sendo relacionada às constantes de ligação para cada caso. De fato, este deslocamento é refletido pelas constantes de ligação reportadas na literatura para CN^- e imidazol a proteína *ReFixL*, com a constante de ligação ao ligante CN^- sendo aproximadamente 100 vezes maior que a constante de ligação ao imidazol²³. A mesma tendência nas constantes de ligação foi observada para as proteínas *BjFixL* e *RmFixL*^{3, 88}. Os valores dos potenciais redox destas proteínas na presença de ligantes, todavia,

não foram determinados. O ligante cianeto, da mesma forma que o ligante O₂, induz alterações conformacionais significativas que levam ao estado inativo da proteína.

4.1.3 *Potencial de redução versus atividade quinase*

A função fisiológica da proteína *ReFixL* é modulada pela associação/dissociação de O₂. A proteína, todavia, é capaz de se ligar a espécies que atuam como falsos sinalizadores, ou seja, se ligam à proteína e induzem mudanças conformacionais necessárias para desativar a atividade quinase do sistema, mesmo não fazendo parte do sistema *in vivo*, como é o caso dos ligantes imidazol e CN⁻. Por outro lado, há espécies, como o ligante CO, que se ligam à proteína sem alterar significativamente sua estrutura nem a atividade quinase. Em sua forma *met-ReFixL* a proteína apresenta atividade quinase. Assim, sua reação de redução não apresenta alteração em sua atividade quinase, o mesmo é observado para proteína *BjFixL* e com base em suas estruturas cristalinas este comportamento é atribuído à similaridade em suas estruturas⁵⁴. Os experimentos de espectroeletrólise realizados neste trabalho mostraram que os valores dos potenciais redox dos sistemas estudados não são afetados simplesmente pelos valores das constantes de afinidade da proteína aos ligantes, mas sim, talvez mais fortemente, por fatores conformacionais que parecem contradizer a tendência termodinâmica. Balland e colaboradores⁹ observaram a influência das interações ocorridas no microambiente da proteína *BjFixL* em termos de potencial de redução por meio de mutações no resíduo Arg-220. Foi observada uma diminuição nos valores de potencial quando este resíduo foi substituído por resíduos de glutamina, isoleucina, ácido glutâmico e histidina, que possibilitaram diferentes interações de hidrogênio no microambiente do grupo heme. Correlacionando os valores dos potenciais com a atividade quinase da proteína *ReFixL* nos diferentes estados pode-se observar uma dependência entre os dois fatores. A **Figura 28** exibe as tendências de atividade quinase em relação ao potencial.

Figura 28 — Gráfico de barras relacionando atividade quinase da proteína *ReFixL* e seu potencial de redução das formas *deoxy-ReFixL*, *CO-ReFixL*, *oxi-ReFixL* (em ar), *oxi-ReFixL* (em O_2), *Imz-ReFixL* e *cianomet-ReFixL*.



Fonte: Referência ⁸⁵

O gráfico de barras ilustrado na **Figura 28** indica que os ligantes que desativam a atividade quinase induzem um deslocamento negativo nos valores de potencial de redução. Esse comportamento é atribuído à estabilização do estado férrico do grupo heme. Já os ligantes que mantêm a atividade quinase, induzem valores positivos de potencial. A tendência observada é curiosa do ponto de vista termodinâmico, particularmente da físico-química inorgânica, uma vez que se esperaria que ligantes com capacidade π retiradora (CO e O_2) que se ligam exclusivamente na forma reduzida de Fe^{2+} induzissem um deslocamento positivo nos valores de potencial em decorrência do aumento de estabilidade do estado reduzido do centro metálico. Pode-se concluir, portanto, que as alterações conformacionais que levam ao estado inativo da proteína geram uma maior exposição ao solvente e induzem deslocamentos negativos nos valores de potenciais.

5 CONCLUSÕES

A proteína FixL do organismo *Rhizobium etli* foi expressa e purificada. Ao fim do processo de purificação da proteína foi possível identifica-la em sua forma met-*ReFixL* evidenciada por seu espectro UV-Vis e testes de reatividade realizados com agentes redutores e oxidantes. A proteínas foi expressa em sua forma *holo* e em sua forma nativa. Por meio de análises de eletroforese de gel desnaturante a proteína *ReFixL* apresentou massa aproximada de 70, consistente com o reportado na literatura. A proteína foi obtida com alto grau de pureza por meio de sucessivas etapas cromatográficas como verificado por espectroscopia de UV-Vis e eletroforese de gel desnaturante (SDS-PAGE). Ao fim da purificação a proteína *ReFixL* apresentou razão de pureza de aproximadamente 0,57.

O potencial de redução da proteína *ReFixL* na sua forma não ligada e diversas formas ligadas foi determinado por titulação espectroeletroquímica. A forma férrica da proteína *ReFixL* mostrou-se mais estável que o estado férrico do domínio heme da proteína *BjFixL*, apresentando potencial de redução 49 mV mais baixo. Os perfis espectroscópicos dos sistemas investigados mostraram que a proteína se liga a CO e O₂ em seu estado reduzido e ao imidazol e CN⁻ no seu estado oxidado. Baseando-se nas afinidade dos ligantes com o centro metálico, termodynamicamente esperava-se um deslocamento positivo no potencial da proteína quando coordenada a CO ou O₂ devido a estabilização da forma reduzida e um deslocamento negativo no potencial de redução da proteína quando coordenada aos ligantes imidazol e CN⁻. O deslocamento negativo de potencial nas formas cianomet-*ReFixL* e imz-*ReFixL* fora observado como previsto, havendo deslocamento de -76 mV na presença de imidazol e -175 mV na presença de cianeto. Todavia, quando FixL se coordena ao CO, que não altera significativamente a atividade quinase da proteína, apesar da alta afinidade da proteína por este ligante no estado reduzido, o potencial foi deslocado apenas +3 mV em relação a forma não ligada, *deoxi-ReFixL*. Adicionalmente, na presença de O₂, contrariamente ao esperado, houve um deslocamento do potencial de redução da proteína no sentido negativo em -70mV. Ao analisar estes sistemas e o efeito provocado na atividade quinase, os ligantes que reconhecidamente desativam a atividade quinase da proteína, como O₂, CN⁻ e imidazol apresentaram potenciais mais negativos que as formas da proteína que possuem atividade quinase, *deoxi-ReFixL* e CO-*ReFixL*. Os resultados apresentados mostram que o potencial de redução da proteína *ReFixL* não foi afetado apenas pela coordenação dos ligantes ao centro metálico, mas também pelas alterações conformacionais que estes causam quando levam a

proteína a um estado inativo. Estas alterações conformacionais ocorrem via redes de interação entre resíduos aminoácidos no microambiente do grupo heme por meio de pontes salinas e ligações de hidrogênio. Possivelmente, a diferença de potencial entre as proteínas *ReFixL* e *BjFixL* estão relacionadas a resíduos aminoácidos não conservados em ambas as proteínas, apesar de não se descartar a possibilidade de ser devido ao uso de domínio isolado *versus* proteína nativa.

REFERÊNCIAS

- 1 AGUEY-ZINSOU, K. F.; BERNHARDT, P. V.; DE VOSS, J. J.; SLESSOR, K. E., Electrochemistry of P450cin: new insights into P450 electron transfer. *Chem Commun (Camb)* 2003, (3), 418-9.
- 2 AONO, S., The Dos family of globin-related sensors using PAS domains to accommodate haem acting as the active site for sensing external signals. *Adv Microb Physiol* 2013, 63, 273-327.
- 3 GILLES-GONZALEZ, M. A.; GONZALEZ, G.; PERUTZ, M. F.; KIGER, L.; MARDEN, M. C.; POYART, C., Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, are a new class of heme protein with distinctive ligand binding and autoxidation. *Biochemistry* 1994, 33 (26), 8067-73.
- 4 GILLES-GONZALEZ, M.-A.; GONZALEZ, G., Chapter 2 - A Surfeit of Biological Heme-based Sensors A2 - GHOSH, ABHIK. In *The Smallest Biomolecules: Diatomics and their Interactions with Heme Proteins*, Elsevier: Amsterdam, 2008; pp 18-65.
- 5 NITSCHKE, A.-L. D. A. W., When Did Hemes Enter the Scene of Life? On the Natural History of Heme Cofactors and Heme-Containing Enzymes. In *Cytochrome Complexes: Evolution, Structures, Energy Transduction, and Signaling, Advances in Photosynthesis and Respiration* Kallas, W. A. C. a. T., Ed. *Springer Science+Business Media Dordrecht*: 2016; pp 13-24.
- 6 SASAKURA, Y.; HIRATA, S.; SUGIYAMA, S.; SUZUKI, S.; TAGUCHI, S.; WATANABE, M.; MATSUI, T.; SAGAMI, I.; SHIMIZU, T., 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. *J Biol Chem* 2002, 277 (26), 23821-7.
- 7 ISHITSUKA, Y.; ARAKI, Y.; TANAKA, A.; IGARASHI, J.; ITO, O.; SHIMIZU, T., Arg97 at the heme-distal side of the isolated heme-bound PAS domain of a heme-based oxygen sensor from Escherichia coli (Ec DOS) plays critical roles in autoxidation and binding to gases, particularly O₂. *Biochemistry* 2008, 47 (34), 8874-84.
- 8 SOUSA, E. H.; TUCKERMAN, J. R.; GONZALEZ, G.; GILLES-GONZALEZ, M. A., DosT and DevS are oxygen-switched kinases in Mycobacterium tuberculosis. *Protein Sci* 2007, 16 (8), 1708-19.
- 9 BALLAND, V.; BOUZHIR-SIMA, L.; ANXOLABEHERE-MALLART, E.; BOUSSAC, A.; VOS, M. H.; LIEBL, U.; MATTIOLI, T. A., Functional implications of the propionate 7-arginine 220 interaction in the FixLH oxygen sensor from Bradyrhizobium japonicum. *Biochemistry* 2006, 45 (7), 2072-84.
- 10 TUCKERMAN, J. R.; GONZALEZ, G.; SOUSA, E. H.; WAN, X.; SAITO, J. A.; ALAM, M.; GILLES-GONZALEZ, M. A., An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control. *Biochemistry* 2009, 48 (41), 9764-74.

- 11 CHAPMAN, S. K.; DAFF, S.; MUNRO, A. W., Heme: The most versatile redox centre in biology? In *Metal Sites in Proteins and Models: Iron Centres*, Hill, H. A. O.; Sadler, P. J.; Thomson, A. J., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1997; pp 39-70.
- 12 PAOLI, M.; MARLES-WRIGHT, J.; SMITH, A., Structure-function relationships in heme-proteins. *DNA Cell Biol* 2002, 21 (4), 271-80.
- 13 BARRICK, D., Replacement of the proximal ligand of sperm whale myoglobin with free imidazole in the mutant His-93-->Gly. *Biochemistry* 1994, 33 (21), 6546-54.
- 14 MCREE, D. E.; JENSEN, G. M.; FITZGERALD, M. M.; SIEGEL, H. A.; GOODIN, D. B., Construction of a bisquo heme enzyme and binding by exogenous ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91 (26), 12847-51.
- 15 GREEN, J.; CRACK, J. C.; THOMSON, A. J.; LEBRUN, N. E., Bacterial sensors of oxygen. *Curr Opin Microbiol* 2009, 12 (2), 145-51; Schneider, S.; Marles-Wright, J.; Sharp, K. H.; Paoli, M., Diversity and conservation of interactions for binding heme in b-type heme proteins. *Nat Prod Rep* 2007, 24 (3), 621-30.
- 16 WANG, S., Bacterial Two-Component Systems: Structures and Signaling Mechanisms. In *Protein Phosphorylation in Human Health*, Huang, C., Ed. InTech: 2012; pp 439-466.
- 17 DAVID, M.; DAVERAN, M. L.; BATUT, J.; DEDIEU, A.; DOMERGUE, O.; GHAI, J.; HERTIG, C.; BOISTARD, P.; KAHN, D., Cascade regulation of nif gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell* 1988, 54 (5), 671-83.
- 18 JOHN W. OWENS, C. J. O. C. A. R. D. K., Characterization of some Low Spin Complexes of Ferric Hemeoctapeptide From Cytochrome-c. *Inorganic Chmica Acta* 1988, 151, 107-116.
- 19 VAN DYKE, B. R.; SALTMAN, P.; ARMSTRONG, F. A., Control of Myoglobin Electron-Transfer Rates by the Distal (Nonbound) Histidine Residue. *Journal of the American Chemical Society* 1996, 118 (14), 3490-3492.
- 20 SOUSA, E. H.; LOPES, L. G.; GONZALEZ, G.; GILLES-GONZALEZ, M. A., Drug discovery targeting heme-based sensors and their coupled activities. *J Inorg Biochem* 2017, 167, 12-20.
- 21 SOUSA, E. H.; GONZALEZ, G.; GILLES-GONZALEZ, M. A., Oxygen blocks the reaction of the FixL-FixJ complex with ATP but does not influence binding of FixJ or ATP to FixL. *Biochemistry* 2005, 44 (46), 15359-65.
- 22 HOU, S.; LARSEN, R. W.; BOUDKO, D.; RILEY, C. W.; KARATAN, E.; ZIMMER, M.; ORDAL, G. W.; ALAM, M., Myoglobin-like aerotaxis transducers in Archaea and Bacteria. *Nature* 2000, 403 (6769), 540-4; Ross, P.; Mayer, R.; Benziman, M., Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev* 1991, 55 (1), 35-58.

- 23 SOUSA, E. H.; TUCKERMAN, J. R.; GONDIM, A. C.; GONZALEZ, G.; GILLES-GONZALEZ, M. A., Signal transduction and phosphoryl transfer by a FixL hybrid kinase with low oxygen affinity: importance of the vicinal PAS domain and receiver aspartate. *Biochemistry* 2013, *52* (3), 456-65.
- 24 PURANIK, M.; NIELSEN, S. B.; YOUN, H.; HVITVED, A. N.; BOURASSA, J. L.; CASE, M. A.; TENGROTH, C.; BALAKRISHNAN, G.; THORSTEINSSON, M. V.; GROVES, J. T.; MCLENDON, G. L.; ROBERTS, G. P.; OLSON, J. S.; SPIRO, T. G., Dynamics of carbon monoxide binding to CooA. *J Biol Chem* 2004, *279* (20), 21096-108.
- 25 VREEDE, J.; VAN DER HORST, M. A.; HELLINGWERF, K. J.; CRIELAARD, W.; VAN AALTEN, D. M., PAS domains. Common structure and common flexibility. *J Biol Chem* 2003, *278* (20), 18434-9.
- 26 SHIMIZU, T.; HUANG, D.; YAN, F.; STRANAVA, M.; BARTOSOVA, M.; FOJTIKOVA, V.; MARTINKOVA, M., Gaseous O₂, NO, and CO in signal transduction: structure and function relationships of heme-based gas sensors and heme-redox sensors. *Chem Rev* 2015, *115* (13), 6491-533.
- 27 LOPEZ, O.; MORERA, C.; MIRANDA-RIOS, J.; GIRARD, L.; ROMERO, D.; SOBERON, M., Regulation of gene expression in response to oxygen in *Rhizobium etli*: role of FnrN in fixNOQP expression and in symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol* 2001, *183* (24), 6999-7006.
- 28 WANG, S. P.; SHARMA, P. L.; SCHOENLEIN, P. V.; ELY, B., A histidine protein kinase is involved in polar organelle development in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, *90* (2), 630-4.
- 29 TAYLOR, B. L.; ZHULIN, I. B., PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999, *63* (2), 479-506.
- 30 DUNHAM, C. M.; DIOUM, E. M.; TUCKERMAN, J. R.; GONZALEZ, G.; SCOTT, W. G.; GILLES-GONZALEZ, M. A., A distal arginine in oxygen-sensing heme-PAS domains is essential to ligand binding, signal transduction, and structure. *Biochemistry* 2003, *42* (25), 7701-8.
- 31 GAO, R.; STOCK, A. M., Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annual Review of Microbiology* 2009, *63* (1), 133-154.
- 32 PARKINSON, J. S.; KOFOID, E. C., Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet* 1992, *26*, 71-112.
- 33 STOCK, J. B.; NINFA, A. J.; STOCK, A. M., Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* 1989, *53* (4), 450-90.
- 34 STOCK, A. M.; ROBINSON, V. L.; GOUDREAU, P. N., Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2000, *69*, 183-215.

- 35 BARRETT, J. F.; HOCH, J. A., Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1998, 42 (7), 1529-36.
- 36 BILWES, A. M.; ALEX, L. A.; CRANE, B. R.; SIMON, M. I., Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* 1999, 96 (1), 131-41.
- 37 Other Transmembrane Receptor Classes: Signaling by TGF- β Receptors, TNF Receptors, Toll Receptors, and Notch. In *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2014; pp 631-660.
- 38 ROBERTS, D. M.; LIAO, R. P.; WISEDCHAISRI, G.; HOL, W. G. J.; SHERMAN, D. R., Two Sensor Kinases Contribute to the Hypoxic Response of Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of biological chemistry* 2004, 279 (22), 23082-23087.
- 39 RICKMAN, L.; SALDANHA, J. W.; HUNT, D. M.; HOAR, D. N.; COLSTON, M. J.; MILLAR, J. B.; BUXTON, R. S., A two-component signal transduction system with a PAS domain-containing sensor is required for virulence of Mycobacterium tuberculosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 314 (1), 259-67.
- 40 MARINA, A.; MOTT, C.; AUZENBERG, A.; HENDRICKSON, W. A.; WALDBURGER, C. D., Structural and mutational analysis of the PhoQ histidine kinase catalytic domain. Insight into the reaction mechanism. *J Biol Chem* 2001, 276 (44), 41182-90.
- 41 CAPRA, E. J.; LAUB, M. T., Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annual Review of Microbiology* 2012, 66 (1), 325-347.
- 42 BHATE, M. P.; MOLNAR, K. S.; GOULIAN, M.; DEGRADO, W. F., Signal Transduction in Histidine Kinases: Insights from New Structures. *Structure* 2015, 23 (6), 981-994.
- 43 COCK, P. J.; WHITWORTH, D. E., Evolution of prokaryotic two-component system signaling pathways: gene fusions and fissions. *Molecular biology and evolution* 2007, 24 (11), 2355-7.
- 44 WANG, S., Protein Phosphorylation in Human Health. In *InTech*, Huang, C., Ed. 2012.
- 45 CHEUNG, J.; HENDRICKSON, W. A., Sensor domains of two-component regulatory systems. *Curr Opin Microbiol* 2010, 13 (2), 116-23.
- 46 GONG, W.; HAO, B.; MANSY, S. S.; GONZALEZ, G.; GILLES-GONZALEZ, M. A.; CHAN, M. K., Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95 (26), 15177-82.
- 47 ZHULIN, I. B.; TAYLOR, B. L.; DIXON, R., PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem Sci* 1997, 22 (9), 331-3.
- 48 TOMOMORI, C.; TANAKA, T.; DUTTA, R.; PARK, H.; SAHA, S. K.; ZHU, Y.; ISHIMA, R.; LIU, D.; TONG, K. I.; KUROKAWA, H.; QIAN, H.; INOUE, M.;

- IKURA, M., Solution structure of the homodimeric core domain of Escherichia coli histidine kinase EnvZ. *Nat Struct Biol* 1999, 6 (8), 729-34.
- 49 YANG, Y.; INOUE, M., Requirement of both kinase and phosphatase activities of an Escherichia coli receptor (Taz1) for ligand-dependent signal transduction. *J Mol Biol* 1993, 231 (2), 335-42.
- 50 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. *J Biol Chem* 2013, 288 (18), 12437-47.
- 51 NEEDHAM, J. V.; CHEN, T. Y.; FALKE, J. J., Novel ion specificity of a carboxylate cluster Mg(II) binding site: strong charge selectivity and weak size selectivity. *Biochemistry* 1993, 32 (13), 3363-7.
- 52 GILLES-GONZALEZ, M. A.; DITTA, G. S.; HELINSKI, D. R., A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of Rhizobium meliloti. *Nature* 1991, 350 (6314), 170-2.
- 53 GILLES-GONZALEZ, M. A.; GONZALEZ, G.; PERUTZ, M. F., Kinase activity of oxygen sensor FixL depends on the spin state of its heme iron. *Biochemistry* 1995, 34 (1), 232-6.
- 54 SOUSA, E. H.; TUCKERMAN, J. R.; GONZALEZ, G.; GILLES-GONZALEZ, M. A., A memory of oxygen binding explains the dose response of the heme-based sensor FixL. *Biochemistry* 2007, 46 (21), 6249-57.
- 55 GILLES-GONZALEZ, M. A.; GONZALEZ, G.; SOUSA, E. H.; TUCKERMAN, J., Oxygen-sensing histidine-protein kinases: assays of ligand binding and turnover of response-regulator substrates. *Methods Enzymol* 2008, 437, 173-89.
- 56 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. *J Biol Chem* 1993, 268 (22), 16293-7.
- 57 BALLAND, V.; BOUZHIR-SIMA, L.; KIGER, L.; MARDEN, M. C.; VOS, M. H.; LIEBL, U.; MATTIOLI, T. A., Role of arginine 220 in the oxygen sensor FixL from Bradyrhizobium japonicum. *J Biol Chem* 2005, 280 (15), 15279-88.
- 58 GONG, W.; HAO, B.; CHAN, M. K., New mechanistic insights from structural studies of the oxygen-sensing domain of Bradyrhizobium japonicum FixL. *Biochemistry* 2000, 39 (14), 3955-62.
- 59 HAO, B.; ISAZA, C.; ARNDT, J.; SOLTIS, M.; CHAN, M. K., Structure-based mechanism of O₂ sensing and ligand discrimination by the FixL heme domain of Bradyrhizobium japonicum. *Biochemistry* 2002, 41 (43), 12952-8.
- 60 HIRATA, S.; MATSUI, T.; SASAKURA, Y.; SUGIYAMA, S.; YOSHIMURA, T.; SAGAMI, I.; SHIMIZU, T., Characterization of Met95 mutants of a heme-regulated phosphodiesterase from Escherichia coli. Optical absorption, magnetic circular

- dichroism, circular dichroism, and redox potentials. *Eur J Biochem* 2003, 270 (23), 4771-9.
- 61 DUTTON, P. L., Redox Potentiometry: Determination of Midpoint potentials of Oxidation-Reduction Components of Biological Electron-Transfer Systems *Methods in Enzymology* 1978, 54, 411-435.
 - 62 TANG, K.; KNIPP, M.; LIU, B. B.; COX, N.; STABEL, R.; HE, Q.; ZHOU, M.; SCHEER, H.; ZHAO, K. H.; GARTNER, W., Redox-dependent Ligand Switching in a Sensory Heme-binding GAF Domain of the Cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC7120. *J Biol Chem* 2015, 290 (31), 19067-80.
 - 69 FOURMOND, V.; LEGER, C., Protein Electrochemistry: Questions and Answers. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2016, 158, 1-41.
 - 70 HE, F. M.; BERNHARDT, P. V., Cobalt cage complexes as mediators of protein electron transfer. *J Biol Inorg Chem* 2016.
 - 71 KILMARTIN, J. R.; BERNHARDT, P. V.; DHOUIB, R.; HANSON, G. R.; RILEY, M. J.; KAPPLER, U., Effects of mutations in active site heme ligands on the spectroscopic and catalytic properties of SoxAX cytochromes. *J Inorg Biochem* 2016.
 - 72 Kalimuthu, P.; Ringel, P.; Kruse, T.; Bernhardt, P. V., Direct electrochemistry of nitrate reductase from the fungus *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta* 2016, 1857 (9), 1506-1513.
 - 73 FULTZ, M. L.; DURST, R. A., Mediator compounds for the electrochemical study of biological redox systems: a compilation. *Analytica Chimica Acta* 1982, 140 (1), 1-18.
 - 74 CRUMBLISS, S. D. A. A. L., Spectroelectrochemistry. In *Spectroelectrochemistry*, RSC Publishing Cambridge, UK, 2008.
 - 75 BERNHARDT, P. V.; CHEN, K. I.; SHARPE, P. C., Transition metal complexes as mediator-titrants in protein redox potentiometry. *J Biol Inorg Chem* 2006, 11 (7), 930-6.
 - 76 M. MAEDER, P. K. *Reactlab REDOX*, JPlus consulting Pty Ltd: Perth, Western Australia, 2016.
 - 77 OLEA, C.; BOON, E. M.; PELLICENA, P.; KURIYAN, J.; MARLETTA, M. A., Probing the function of heme distortion in the H-NOX family. *ACS Chem Biol* 2008, 3 (11), 703-10.
 - 78 KITANISHI, K.; KOBAYASHI, K.; KAWAMURA, Y.; ISHIGAMI, I.; OGURA, T.; NAKAJIMA, K.; IGARASHI, J.; TANAKA, A.; SHIMIZU, T., 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* 2010, 49 (49), 10381-93.

- 79 YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J.; MESSING, J., Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 1985, 33 (1), 103-19.
- 80 DE BOER, H. A.; COMSTOCK, L. J.; VASSER, M., The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, 80 (1), 21-5.
- 81 DONALD VOET, J. G. V., *Bioquímica*. Artmed: Porto Alegre, 2013; p 1481.
- 82 DAVID L. NELSON, M. M. C., *Princípios de Bioquímica do Lehninger* 5 ed ed.; Artmed: Porto Alegre, 2011; p 1274.
- 83 COLLINS, C. H.; BRAGA, G.; BONATO, P. S., *Fundamentos de cromatografia*. Editorada Unicamp: 2006.
- 84 Disponível em:
http://www.expasy.org/proteomics/protein_sequences_and_identification. Acessado em 03/07/2017.
- 85 CREASER, I. I.; HARROWFIELD, J. M.; HERLT, A. J.; SARGESON, A. M.; SPRINGBORG, J.; GEUE, R. J.; SNOW, M. R., Sepulchrate: a macrobicyclic nitrogen cage for metal ions. *Journal of the American Chemical Society* 1977, 99 (9), 3181-3182.
- 86 DONLEVY, T. M.; GAHAN, L. R.; HAMBLEY, T. W.; STRANGER, R., Synthesis and spectroscopic properties of the encapsulated cobalt(III) complexes derived from the unsymmetrically substituted ligand 5-methyl-5-(4-amino-2-azabutyl)-3,7-dithianonane-1,9-diamine (N4S2). *Inorganic Chemistry* 1992, 31 (21), 4376-4382.
- 87 BRUCE, J. I.; GAHAN, L. R.; HAMBLEY, T. W.; STRANGER, R., Synthesis, structure, and spectroscopy of encapsulated complexes of cobalt(III) derived from the ligand 5-methyl-5-(4-amino-2-thiabutyl)-3,7-diazanonane-1,9-diamine (N5S). *Inorganic Chemistry* 1993, 32 (26), 5997-6002.
- 88 BERNHARDT, P. V.; BYGOTT, A. M. T.; GEUE, R. J.; HENDRY, A. J.; KORYBUT-DASZKIEWICZ, B. R.; LAY, P. A.; PLADZIEWICZ, J. R.; SARGESON, A. M.; WILLIS, A. C., Stabilization of Cobalt Cage Conformers in the Solid State and Solution. *Inorganic Chemistry* 1994, 33 (20), 4553-4561.
- 89 REES, D. C., Electrostatic influence on energetics of electron transfer reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985, 82 (10), 3082-3085.
- 90 MOORE, G. R.; PETTIGREW, G. W.; ROGERS, N. K., Factors influencing redox potentials of electron transfer proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986, 83 (14), 4998-4999.

- 91 GILLES-GONZALEZ, M. A.; GONZALEZ, G., Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. *J Inorg Biochem* 2005, 99 (1), 1-22.
- 92 TUCKERMAN, J. R.; GONZALEZ, G.; DIOUM, E. M.; GILLES-GONZALEZ, M. A., Ligand and oxidation-state specific regulation of the heme-based oxygen sensor FixL from *Sinorhizobium meliloti*. *Biochemistry* 2002, 41 (19), 6170-7.
- 93 ADAR, F., The Porphyrins In *The Porphyrins* Dolphin, D., Ed. Academic press New York San Francisco London: Vancouver, 1978; Vol. III, pp 167-206.
- 94 JOHNSON, D. L.; LEWIS, B. C.; ELLIOT, D. J.; MINERS, J. O.; MARTIN, L. L., Electrochemical characterisation of the human cytochrome P450 CYP2C9. *Biochemical Pharmacology* 2005, 69 (10), 1533-1541.
- 95 SHANKLAND, R. C. W. A. R. S., *Handbook of Chemistry and Physics*. 44^o ed.; The Chemical Rubber Publishing Co: 1962.
- 96 KEY, J.; MOFFAT, K., Crystal structures of deoxy and CO-bound bjFixLH reveal details of ligand recognition and signaling. *Biochemistry* 2005, 44 (12), 4627-35.
- 97 ATKINS, P. O., TINA; ROURKE, J.; WELLER, M.; ARMSTRONG, F. and HAGERMAN, M. *Shriver and Atkins' Inorganic Chemistry*. fifth edition ed.; Oxford University Press: England, 2010; Clark, W. M., *Oxidation-reduction potential of organic systems*. Waverly Press: Baltimore, Maryland, 1960.
- 98 FRITZ, B.G.; HU, X.; BRAYLE, J.L.; BERRY, R.E.; WALKER, F.A.; MONTFORT, W.R. Oxidation and loss of heme in soluble guanylyl cyclase from *Manduca sexta*. *Biochemistry* 2011, 50, 5813-5815.
- 99 HONORIO-FELICIO, N.; CAREPO, M. S.; DE, F. P. T.; DE FRANCA LOPES, L. G.; SOUSA, E. H.; DIOGENES, I. C.; BERNHARDT, P. V., The Heme-Based Oxygen Sensor *Rhizobium etli* FixL: Influence of Auxiliary Ligands on Heme Redox Potential and Implications on the Enzyme Activity. *J Inorg Biochem* 2016, 164, 34-41.
- 100 CHURCH, A. K.; WARSHEL, A., Control of the redox potential of cytochrome c and microscopic dielectric effects in proteins. *Biochemistry* 1986, 25 (7), 1675-81.
- 101 GILLES-GONZALEZ, M. A.; CACERES, A. I.; SOUSA, E. H.; TOMCHICK, D. R.; BRAUTIGAM, C.; GONZALEZ, C.; MACHIUS, M., A proximal arginine R206 participates in switching of the *Bradyrhizobium japonicum* FixL oxygen sensor. *J Mol Biol* 2006, 360 (1), 80-9.
- 102 WINKLER, W. C.; GONZALEZ, G.; WITTENBERG, J. B.; HILLE, R.; DAKAPPAGARI, N.; JACOB, A.; GONZALEZ, L. A.; GILLES-GONZALEZ, M. A., Nonsteric factors dominate binding of nitric oxide, azide, imidazole, cyanide, and fluoride to the rhizobial heme-based oxygen sensor FixL. *Chem Biol* 1996, 3 (10), 841-50.

- 103 CHO, H. Y.; CHO, H. J.; KIM, Y. M.; OH, J. I.; KANG, B. S., Structural insight into the heme-based redox sensing by DosS from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 2009, 284 (19), 13057-67.
- 104 BASUDHAR, D.; MADRONA, Y.; YUKL, E. T.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; NISHIDA, C. R.; MOENNE-LOCCOZ, P.; ORTIZ DE MONTELLANO, P. R., Distal Hydrogen-bonding Interactions in Ligand Sensing and Signaling by *Mycobacterium tuberculosis* DosS. *J Biol Chem* 2016, 291 (31), 16100-11.
- 105 PARRISH, N. M.; DICK, J. D.; BISHAI, W. R., Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology* 6 (3), 107-112.
- 106 IOANOVICIU, A.; MEHARENNA, Y. T.; POULOS, T. L.; ORTIZ DE MONTELLANO, P. R., DevS oxy complex stability identifies this heme protein as a gas sensor in *Mycobacterium tuberculosis* dormancy. *Biochemistry* 2009, 48 (25), 5839-48.
- 107 KUMAR, A.; TOLEDO, J. C.; PATEL, R. P.; LANCASTER, J. R., JR.; STEYN, A. J., *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104 (28), 11568-73.
- 108 SASAKURA, Y.; YOSHIMURA-SUZUKI, T.; KUROKAWA, H.; SHIMIZU, T., Structure-function relationships of EcDOS, a heme-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli*. *Acc Chem Res* 2006, 39 (1), 37-43.
- 109 OELZE, M. L.; KANDBINDER, A.; DIETZ, K. J., Redox regulation and overreduction control in the photosynthesizing cell: complexity in redox regulatory networks. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1780 (11), 1261-72; Lopez-Mirabal, H. R.; Winther, J. R., Redox characteristics of the eukaryotic cytosol. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1783 (4), 629-40.
- 110 SHENTON, D.; GRANT, C. M., Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 2003, 374 (Pt 2), 513-9.
- 111 MOLITOR, B.; STASSEN, M.; MODI, A.; EL-MASHTOLY, S. F.; LAURICH, C.; LUBITZ, W.; DAWSON, J. H.; ROTHER, M.; FRANKENBERG-DINKEL, N., A heme-based redox sensor in the methanogenic archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *J Biol Chem* 2013, 288 (25), 18458-72.
- 112 IOANOVICIU, A.; YUKL, E. T.; MOENNE-LOCCOZ, P.; DE MONTELLANO, P. R., DevS, a heme-containing two-component oxygen sensor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 2007, 46 (14), 4250-60.
- 113 SLIGAR, S. G.; GUNSALUS, I. C., A thermodynamic model of regulation: modulation of redox equilibria in camphor monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976, 73 (4), 1078-82.
- 114 COWLEY, A. B.; KENNEDY, M. L.; SILCHENKO, S.; LUKAT-RODGERS, G. S.; RODGERS, K. R.; BENSON, D. R., Insight into heme protein redox potential control

and functional aspects of six-coordinate ligand-sensing heme proteins from studies of synthetic heme peptides. *Inorg Chem* 2006, 45 (25), 9985-10001.