

**Universidade de Lisboa**

Faculdade de Ciências

Departamento de Química e Bioquímica



**CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO CITOCROMO  
DO TIPO C QUE FORMA "NANOFIOS" DE  
HEMOS EM *GEOBACTER SULFURREDUCTENS***

**Ana Paula Nascimento Fernandes**

DISSERTAÇÃO

Mestrado em Bioquímica

(Especialização em Bioquímica)

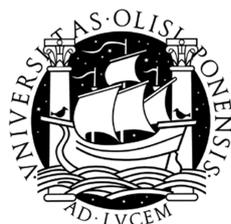
2012



**Universidade de Lisboa**

Faculdade de Ciências

Departamento de Química e Bioquímica



**CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO CITOCROMO  
DO TIPO C QUE FORMA "NANOFIOS" DE  
HEMOS EM *GEOBACTER SULFURREDUCTENS***

**Ana Paula Nascimento Fernandes**

Dissertação orientada pelo Prof. Dr. Carlos Salgueiro  
(FCT/UNL, orientador externo) e pela Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria  
Luísa Serralheiro (FCUL, orientadora interna)

Mestrado em Bioquímica

(Especialização em Bioquímica)

2012







Neste trabalho não foi adoptado o novo acordo ortográfico.



O trabalho experimental que conduziu à elaboração desta dissertação de Mestrado foi realizado na Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.



Durante a realização desta dissertação foram apresentados trabalhos sob forma de:

- **Publicação**

Morgado, L., A.P. Fernandes, J.M. Dantas, M.A. Silva & C.A. Salgueiro, *On the road to improve the bioremediation and electricity harvesting skills of G. sulfurreducens: functional and structural characterization of multihaem cytochromes*. Invited review submitted to Biochem. Soc. Trans, 2012.

- **Comunicação oral**

Morgado, L., A.P. Fernandes, J.M. Dantas, M.A. Silva & C.A. Salgueiro, *On the road to improve the bioremediation and electricity harvesting skills of G. sulfurreducens: functional and structural characterization of multiheme cytochromes*. Electron transfer at the microbe-mineral interface, Abril de 2012, Norwich, UK.

- **Posters**

Fernandes, A.P. & C.A. Salgueiro, *A NMR-based approach to unveil the functional properties of "nanowires" of hemes*. IV Ibero-American NMR Meeting - VI GERMN Bienal Meeting - III Iberian NMR Meeting, Setembro de 2012, Aveiro, Portugal.

Morgado, L., A.P. Fernandes, J.M. Dantas, M.A. Silva & C.A. Salgueiro, *On the road to improve the bioremediation and electricity harvesting skills of G. sulfurreducens: functional and structural characterization of multiheme cytochromes*. Electron transfer at the microbe-mineral interface, Abril de 2012, Norwich, UK.

Morgado, L., M.A. Silva, A.P. Fernandes, J.M. Dantas, M.S. Sousa, M. Bruix & C.A. Salgueiro, *NMR as a tool for the improvement of the bioremediation and electricity harvesting skills of Geobacter: structural studies on heme proteins*. 2nd PT NMR meeting, Fevereiro de 2012, Caparica, Portugal.



## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador externo, o Professor Doutor Carlos Salgueiro, por todos os conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade, confiança e apoio que sempre demonstrou.

À Professora Isabel Couto pelo apoio e pela disponibilização de material biológico.

Ao Dr. Yuri Y. Londer e à Dra. Marianne Schiffer, do Argonne National Laboratory, Chicago (EUA), pelo auxílio prestado relativamente ao trabalho experimental, quer pela disponibilização de material biológico, quer pelas úteis informações a nível do protocolo de crescimento e expressão heteróloga dos domínios individuais e fragmentos do citocromo GSU1996.

Às colegas Leonor Morgado, Marta Silva e Joana Dantas pelo apoio e pela partilha de conhecimentos.

Aos meus sogros, Clara e Artur, pelo auxílio que sempre concederam.

Aos meus pais, por todos estes anos.

Ao Paulo, por toda a ajuda, dedicação e incentivo quer em dias de sol, quer em dias de chuva e por estar sempre incondicionalmente presente, até mesmo na minha ausência.

Ao meu querido Henrique, pelo tempo que não repartimos e pelo seu sorriso, que a tudo dá sentido.



## RESUMO

O citocromo dodeca-hémico GSU1996, da bactéria *Geobacter sulfurreducens*, é uma proteína de estrutura linear, constituída por quatro domínios (A a D) e que actua, putativamente, como “nanofio” molecular, transferindo electrões entre proteínas periplasmáticas ou para proteínas da membrana externa.

Neste trabalho, testou-se a aplicação de uma estratégia modular ao estudo deste novo e complexo citocromo *c*. Foi realizada a expressão heteróloga em *E. coli* de cada domínio individual e do fragmento CD que constitui o GSU1996. Dado o baixo rendimento na expressão dos domínios A e B, testaram-se alguns factores com vista à optimização das suas condições de expressão. No caso do domínio A, o melhor resultado ocorreu em *E. coli* JCB7123 induzida com 50  $\mu$ M de IPTG, obtendo-se um rendimento final de 0,15 mg de proteína por litro de cultura.

Efectuou-se a atribuição dos sinais aos substituintes hémicos dos domínios A, C e D no estado reduzido através de experiências de Ressonância Magnética Nuclear. A abordagem modular foi validada na atribuição de sinais ao fragmento CD, em que se utilizou como guia a atribuição realizada nos domínios individuais que o compõem.

Para determinação de parâmetros termodinâmicos, realizaram-se testes de re-oxidação aos domínios A e D a pH 8,0 e 16°C, tendo sido possível identificar os perfis de oxidação dos diferentes grupos hemo apenas no primeiro caso. Contrariamente ao esperado para um grupo hemo com coordenação axial His-Met e analogamente ao observado no domínio C, o grupo hemo IV é o que sofre maior grau de oxidação no primeiro passo de oxidação-redução, seguindo-se o grupo hemo I e, finalmente, o grupo hemo III.

Titulações de oxidação-redução do domínio A seguidas por espectroscopia de UV-visível indicam que nas condições experimentais utilizadas existe reversibilidade entre os processos. O valor de  $E_{app}$  é -130 mV, sendo muito semelhante ao do domínio D.

**Palavras-chave:** Citocromos *c* multi-hémicos; “nanofios” de hemos; *Geobacter sulfurreducens*; expressão heteróloga; ressonância magnética nuclear



## ABSTRACT

The dodecahemic cytochrome GSU1996, from the bacterium *Geobacter sulfurreducens*, is a linear structure protein, composed of four domains (A to D) which acts, putatively, as a molecular “nanowire” and transfers electrons between periplasmic or to outer membrane proteins.

In the present work, the application of a modular strategy to the study of this new and complex cytochrome *c* was tested. Heterologous expression of each individual domain and tandem CD that constitute GSU1996 was performed in *E. coli*. Optimization was made in order to overcome the low yield obtained with domains A and B. Regarding domain A, the best result was attained through expression in *E. coli* JCB7123 induced with 50  $\mu$ M IPTG, and a final yield of 0,15 mg of protein per liter of culture was obtained.

The assignment of the signals from the heme substituents of domains A, C and D in the reduced state was accomplished through the spectra acquired with Nuclear Magnetic Resonance experiments. The modular approach was validated with the assignment of the signals to the tandem CD, in which was used the assignment of the individual domains C and D as a guide to achieve the tandem’s assignment.

In order to determine thermodynamic parameters, re-oxidation assays were performed with domains A and D. It was possible to identify the redox patterns of the different hemes at pH 8,0 and 16°C only for domain A. Against expectations and analogously to domain C, heme IV, with axial coordination His-Met, was the most oxidized in the first oxidation step, followed by heme I and finally, heme III.

Redox titrations from domain A monitored by UV-visible spectroscopy show that in the experimental conditions used there is reversibility between both processes.  $E_{app}$  in these conditions is -130 mV and it is very similar to that of domain D.

**Keywords:** Multihemic cytochromes *c*; “nanowires” of hemes; *Geobacter sulfurreducens*; heterologous expression; nuclear magnetic resonance



# ÍNDICE DE CONTEÚDOS

AGRADECIMENTOS .....	I
RESUMO .....	III
ABSTRACT .....	V
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	XIII
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>GEOBACTER</i> .....	2
1.1.1 <i>A bactéria Geobacter sulfurreducens</i> .....	2
1.2 CITOCROMOS DE TIPO C.....	4
1.2.1 <i>Citocromos de tipo c em Gs</i> .....	6
<b>2 METODOLOGIA PARA CARACTERIZAÇÃO DE “NANOFIOS” DE HEMOS EM SOLUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
2.1 CLONAGEM, SEQUENCIAÇÃO E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE CITOCROMOS C EM <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	17
2.2 CARACTERIZAÇÃO DE CENTROS REDOX EM PROTEÍNAS MULTI-HÉMICAS .....	19
2.2.1 <i>Equilíbrios de oxidação-redução</i> .....	19
2.2.2 <i>Estudo das propriedades redox em citocromos multi-hémicos por espectroscopia de RMN</i> ....	20
2.2.3 <i>Estratégia para a caracterização funcional do GSU1996</i> .....	29
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
2.3.1 <i>Materiais e equipamentos</i> .....	30
2.3.2 <i>Métodos</i> .....	34
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
3.1 SEQUENCIAÇÃO, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS A, B, C E D E FRAGMENTO CD DO CITOCROMO GSU1996 .....	48
3.2 CARACTERIZAÇÃO DE CENTROS REDOX EM PROTEÍNAS MULTI-HÉMICAS .....	54
3.2.1 <i>Atribuição dos sinais aos grupos hemo</i> .....	54
3.2.2 <i>2D <sup>1</sup>H-EXSY – Ordem de oxidação dos grupos hemo</i> .....	68
3.2.3 <i>Titulações de oxidação-redução seguidas por espectroscopia de visível</i> .....	72
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>5 TRABALHO FUTURO.....</b>	<b>77</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>A</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.....	3
FIGURA 2.....	4
FIGURA 3.....	6
FIGURA 4.....	8
FIGURA 5.....	9
FIGURA 6.....	12
FIGURA 7.....	14
FIGURA 8.....	17
FIGURA 9.....	20
FIGURA 10.....	21
FIGURA 11.....	24
FIGURA 12.....	25
FIGURA 13.....	26
FIGURA 14.....	27
FIGURA 15.....	28
FIGURA 16.....	30
FIGURA 17.....	31
FIGURA 18.....	49
FIGURA 19.....	50
FIGURA 20.....	52
FIGURA 21.....	53
FIGURA 22.....	53
FIGURA 23.....	54
FIGURA 24.....	55
FIGURA 25.....	55
FIGURA 26.....	56
FIGURA 27.....	57
FIGURA 28.....	58
FIGURA 29.....	60
FIGURA 30.....	61
FIGURA 31.....	61
FIGURA 32.....	63
FIGURA 33.....	64
FIGURA 34.....	65
FIGURA 35.....	66
FIGURA 36.....	68
FIGURA 37.....	69
FIGURA 38.....	70
FIGURA 39.....	70
FIGURA 40.....	71
FIGURA 41.....	73
FIGURA 42.....	74



## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1.....	3
TABELA 2.....	10
TABELA 3.....	10
TABELA 4.....	11
TABELA 5.....	13
TABELA 6.....	13
TABELA 7.....	18
TABELA 8.....	32
TABELA 9.....	32
TABELA 10.....	33
TABELA 11.....	34
TABELA 12.....	40
TABELA 13.....	41
TABELA 14.....	44
TABELA 15.....	59
TABELA 16.....	67
TABELA 17.....	72
TABELA A1.....	D
TABELA A2.....	E
TABELA A3.....	F
TABELA A4.....	G



# ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

## LISTA DE ABREVIATURAS

- **Abs**, Absorvância
- **AMP**, Ampicilina
- **BCA**, Ácido bicinconínico, do inglês *Bicinchoninic acid*
- **bis-His**, Histidina-histidina
- **CLO**, Cloranfenicol
- **COSY**, Espectroscopia de correlação homonuclear, do inglês *correlation spectroscopy*
- **Cys**, Aminoácido cisteína, do inglês *cysteine*
- **EDTA**, Ácido etilenodiamina tetracético, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*
- **EXSY**, Espectroscopia de permuta química, do inglês *exchange spectroscopy*
- **FID**, Decaimento livre da magnetização induzida, do inglês *free induction decay*
- **Gs**, *Geobacter sulfurreducens*
- **His-Met**, Histidina-metionina
- **IPTG**, Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo, análogo da lactose, do inglês *isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside*
- **LA**, Meio rico de cultura (sólido) Luria agar
- **LB**, Meio rico de cultura (líquido) Luria Broth
- **MacA**, Citocromo *c* associado à membrana, do inglês *metal-reduction associated cytochrome*
- **NaPi**, Tampão fosfato de sódio
- **NOE**, Efeito nuclear de Overhauser, do inglês *nuclear Overhauser enhancement*
- **NOESY**, Espectroscopia bidimensional de correlação devido ao efeito nuclear de Overhauser, do inglês *nuclear Overhauser enhancement spectroscopy*
- **OmcB**, **OmcF**, **OmcG**, **OmcH**, Citocromos *c* associados à membrana externa, do inglês *outer membrane c-type cytochromes*
- **OmcS**, Citocromo *c* associado aos pili, do inglês *outer membrane c-type cytochrome S*
- **PgcA**, Citocromo *c* periplasmático, do inglês *periplasmic GEMM-regulated cytochrome A*, em que os *GEMM* são abreviatura para genes relacionados com o ambiente, membranas e motilidade (do inglês *genes related to the environment, membranes and motility*)
- **Phe**, Aminoácido fenilalanina, do inglês *phenylalanine*
- **pI**, Ponto isoelétrico
- **PpcA**, Citocromo *c* periplasmático, do inglês *periplasmic c-type cytochrome A*

- **PSA**, Persulfato de Amónia
- **TEMED**, N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
- **r<sub>cs</sub>**, Desvios devido a correntes de anel, do inglês *ring current shift*
- **RMN**, Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
- **rmsd**, Raíz quadrada da média dos quadrados das distâncias, do inglês *root mean square deviation*
- **SDS-PAGE**, Electroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, do inglês *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
- **TOCSY**, Espectroscopia de correlação total de *spin*, do inglês *total correlated spectroscopy*
- **Tyr**, Aminoácido tirosina, do inglês *tyrosine*

#### LISTA DE SÍMBOLOS

- **1D**, Unidimensional
- **<sup>1</sup>H**, Átomo de hidrogénio, protão
- **<sup>2</sup>H**, Deutério
- **2xYT**, Meio rico de cultura *yeast/tryptone*
- **2D**, Bidimensional
- **Å**, Unidade de comprimento, angstrom
- **c<sub>3</sub>**, Citocromo tetra-hémico de tipo c
- **c<sub>7</sub>**, Citocromo tri-hémico de tipo c
- **Da**, Unidade de massa, dalton
- **e<sup>-</sup>**, Electrão
- **δ**, Desvio químico
- **g**, Unidade de força centrífuga relativa (RCF). RCF é a força que actua sobre as amostras durante a centrifugação e é expressa em múltiplos do campo gravitacional da Terra (g)
- **Hz**, Unidade de frequência, Hertz
- **M**, Unidade de concentração molar, mol.dm<sup>-3</sup>
- **mM**, Unidade de concentração, milimolar
- **nm**, Unidade de comprimento, nanómetro
- **rpm**, Rotações por minuto
- **ppm**, Partes por milhão





# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Bactérias do género *Geobacter*

As bactérias do género *Geobacter* desempenham um papel fundamental em ciclos biogeoquímicos que ocorrem em diversos solos e sedimentos, como no caso do acoplamento da oxidação de compostos orgânicos à redução de óxidos insolúveis de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Mn}^{4+}$  [10]. Outro exemplo está relacionado com a metanogénese da matéria orgânica. Este é um processo fundamental no ciclo do carbono, que ocorre em ambientes anaeróbios como solos, sedimentos aquáticos e tracto gastrointestinal de animais. Ocorre através de interacções sintróficas, como a transferência electrónica, entre diferentes espécies de microorganismos [11]. Em ambientes naturais, as espécies de *Geobacter* trocam electrões com parceiros sintróficos, como por exemplo, microorganismos metanogénicos dos géneros *Methanosarcina* ou *Methanobacterium* [12]. A metanogénese é igualmente uma parte fulcral da produção de energia sustentável e da digestão metanogénica de resíduos domésticos e industriais [13].

Estudos anteriores demonstraram também que estas bactérias possuem a capacidade de oxidar hidrocarbonetos aromáticos em águas contaminadas por petróleo e seus derivados [14, 15] e de reduzir anaerobiamente vários metais tóxicos solúveis à sua forma insolúvel (urânio, chumbo e crómio, por exemplo) e à sua forma de vapor (mercúrio) [16]. Para além disso, são capazes de transferir electrões para superfícies de eléctrodos, o que viabiliza a produção de electricidade a partir de sedimentos aquáticos e lixo orgânico [6, 17].

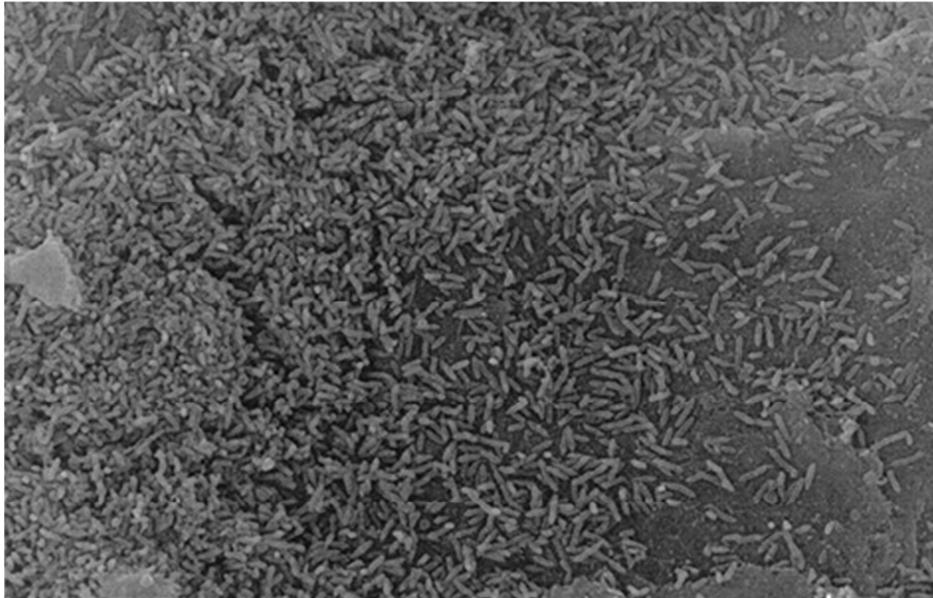
O potencial biológico das várias espécies de *Geobacter* está na origem da crescente procura de novas estratégias para a sua aplicação no campo da biorremediação e da produção de bioenergia [18].

### 1.1.1 A bactéria *Geobacter sulfurreducens*

Esta bactéria Gram-negativa da família *Geobacteraceae* e pertencente às  $\delta$ -proteobactérias, foi denominada de *Geobacter sulfurreducens* (*Gs*) por ter sido a primeira do género a apresentar a capacidade de reduzir enxofre elementar [19].

Foi inicialmente isolada da superfície de sedimentos de uma vala contaminada com hidrocarbonetos em Norman, Oklahoma (Estados Unidos da América) [19].

É quimio-organotrófica não fermentativa e não formadora de esporos, apresentando células em forma de bastonete com dimensões de cerca de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de comprimento por 0,5  $\mu\text{m}$  de largura (Figura 1). Cresce a uma temperatura óptima de 35°C, tolerando concentrações de cloreto de sódio no meio que podem ir até metade da concentração da água do mar (10 g/L) [19].



**Figura 1** – Imagem de bactérias *Geobacter sulfurreducens*, obtida por microscopia electrónica de varrimento. In Bond *et al.*, 2003 [6].

Utiliza dadores de electrões como acetato e hidrogénio, que são oxidados na presença de  $Fe^{3+}$ . Para além do  $Fe^{3+}$ , a *Gs* tem a capacidade de usar outros aceitadores de electrões solúveis e não solúveis (Tabela 1).

**Tabela 1** – Exemplos de aceitadores de electrões de *Geobacter sulfurreducens*.

Aceitador de electrões	Referência
Pirofosfato férrico solúvel	
Citrato de $Fe^{3+}$	
Óxido férrico insolúvel de baixa cristalinidade	
$Co^{3+}$ -EDTA	[19]
Enxofre elementar	
Malato	
Fumarato	
Pertecnetato de amónia - com $Tc^{7+}$	[20]
Acetato de uranilo - com $U^{6+}$	[21]
AQDS (antraquinona 2,6-disulfonato)	[21]
Oxigénio	[22]

Embora tenha sido inicialmente classificada como anaeróbia estrita, estudos posteriores demonstraram que consegue sobreviver quando exposta ao oxigénio atmosférico, sendo inclusivamente capaz de crescer na sua presença se este se encontrar somente em pequenas quantidades no meio (até 10%  $O_2$ ) [22]. A capacidade de tolerar oxigénio e de o utilizar como aceitador final de electrões poderá constituir uma explicação para a presença de *Gs* em ambientes oxidativos à sub-superfície, bem como para a sua predominância como

microorganismo redutor de  $\text{Fe}^{3+}$  nestes mesmos ambientes quando os níveis de oxigênio diminuem [15].

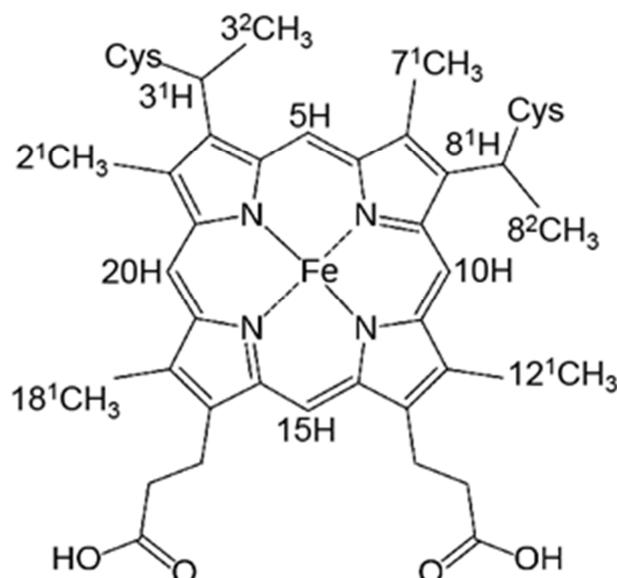
A redução de aceptadores de electrões insolúveis ocorre extracelularmente, sendo a *Gs* capaz de transferir electrões através da membrana externa para o exterior das células. Estas bactérias são capazes de transferir electrões para eléctrodos, tendo alguns estudos demonstrado que, no caso de células microbianas de combustível, constituem a espécie que produz as mais elevadas densidades de corrente [23, 24].

Os citocromos são os componentes maioritários das suas vias de transferência electrónica. A sequenciação completa do genoma da *Gs* desvendou a existência de mais de cem genes codificantes para citocromos de tipo *c*, sendo que destes, setenta e três codificam para citocromos *c* multi-hémicos [25].

A *Gs* tem sido utilizada como modelo para o estudo da família *Geobacteraceae* e, em particular, para este tipo de citocromos uma vez que, não só as culturas de *Gs* podem ser crescidas em laboratório, como o seu genoma foi já completamente sequenciado, tendo sido desenvolvido um sistema para a sua manipulação genética [25, 26].

## 1.2 Citocromos de tipo *c*

As hemoproteínas, como os citocromos, são proteínas conjugadas que possuem como grupo prostético o grupo hemo. Este grupo é constituído por um anel porfirínico tetrapirrólico cujo centro contém um ião de ferro (Figura 2). Este ião de ferro pode estar no estado de oxidação ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) [3, 27].



**Figura 2** – Representação esquemática do grupo hemo *c* de acordo com a nomenclatura definida pela IUPAC-IUB [3].

Os citocromos *c* têm grupos hemo covalentemente ligados à proteína através de duas ligações tioéter com resíduos de cisteínas (Cys). Estas encontram-se dispostas na sequência da proteína de acordo com o padrão de resíduos de aminoácidos Cys-Xxx-Xxx-Cys-His, em que o resíduo de histidina (His) é um dos dois ligandos extraplanares (também designados axiais) do ferro hémico e Xxx-Xxx representam dois resíduos de aminoácidos variáveis.

Estes citocromos podem agrupar-se em quatro classes com base na homologia das suas sequências [28-30]:

- **Classe I.** A família mais numerosa de citocromos *c* insere-se na designada classe I e inclui o citocromo *c* mitocondrial e o citocromo  $c_{551}$  de *Pseudomonas aeruginosa* [31]. Os grupos hemo possuem como ligandos axiais uma histidina e uma metionina, respectivamente, e o local de ligação ao grupo hemo está próximo da região N-terminal da proteína.
- **Classe II.** A classe II inclui os citocromos mono-hémicos com a ligação ao grupo hemo perto da região C-terminal da proteína, como o citocromo *c'* de *Rhodospirillum molischianum* [32] e o citocromo  $c_{556}$  de *Rhodopseudomonas palustris* [33].
- **Classe III.** A classe III é constituída pelos citocromos multi-hémicos com ligação axial histidina-histidina (bis-His). Este tipo de coordenação axial é responsável pelos baixos potenciais de redução apresentados por estas proteínas. Entre os citocromos *c* multi-hémicos da classe III, os citocromos  $c_3$  das bactérias redutoras de enxofre e sulfato são os mais bem estudados [34, 35]. Os seus quatro grupos hemo são numerados consecutivamente I, II, III e IV, de acordo com a ordem em que os resíduos de cisteína aos quais estão ligados se encontram na sequência de aminoácidos. Nesta classe incluem-se também os citocromos tri-hémicos  $c_7$  das bactérias redutoras de  $Fe^{3+}$  [21, 36, 37], que são estruturalmente homólogos aos citocromos tetra-hémicos  $c_3$ , mas com a ausência do grupo hemo II e do segmento da cadeia de aminoácidos que o mantém ligado à estrutura. Os grupos hemo são designados I, III e IV devido à homologia estrutural com os citocromos tetra-hémicos  $c_3$  [38].
- **Classe IV.** Usualmente, a classe IV engloba os citocromos multi-hémicos que contêm ambas as coordenações axiais bis-His e His-Met, como o centro de reacção fotossintético de *Rhodopseudomonas viridis* [39].

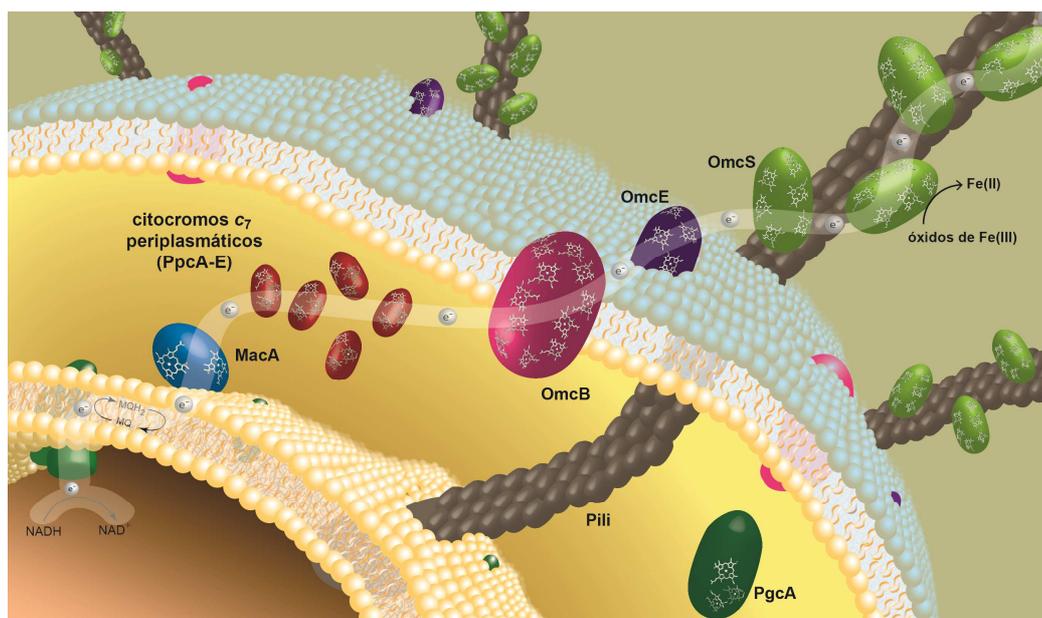
Os citocromos de tipo *c* desempenham diversas funções, incluindo transferência de electrões, processos de apoptose e de *foldings* de proteínas [40]. O modo de acção dos citocromos

envolve a transferência de electrões associada a uma mudança reversível no estado de oxidação do ião ferro do grupo prostético.

### 1.2.1 Citocromos de tipo *c* em *Gs*

Para além das localizações habituais na membrana interna e no compartimento periplasmático, também foram encontrados citocromos *c* na membrana externa de *Gs* (Figura 3) [41].

Embora as funções fisiológicas da maior parte dos citocromos *c* de *Gs* permaneçam ainda incertas, foi demonstrado o seu envolvimento em diversos mecanismos e vias celulares através de estudos proteómicos e de deleção de genes [42-45]. Algumas destas proteínas participam em processos respiratórios: os citocromos PpcA e MacA são exemplos de citocromos associados à redução de óxidos insolúveis de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{U}^{6+}$  [42].



**Figura 3** – Localização de alguns citocromos de tipo *c* em *Gs*: MacA, associado à membrana; PgcA e PpcA – E, periplasmáticos; OmcB e OmcE, de membrana externa e OmcS, associado aos pili. Adaptado de Morgado *et al.*, 2012 [2].

Os citocromos de *Gs* poderão também estar envolvidos em processos de regulação, estando relacionados com o controlo dos níveis da expressão génica. Aparentemente, os citocromos OmcF, OmcG e OmcH estão ligados ao processo de controlo da maior ou menor expressão do gene *omcB*, com reflexo na quantidade de OmcB nas células e, logo, na extensão a que ocorre a redução do  $\text{Fe}^{3+}$  [43, 44].

Outros citocromos, especialmente os que têm o maior número de grupos hemo, foram apontados como sendo potenciais reservatórios de electrões – os denominados “nanofios” de hemos [45]. Como cada um dos múltiplos grupos hemo é capaz de transportar um electrão, na sua globalidade estas proteínas poderão constituir uma reserva de electrões em *Gs*. Se assim for, esta bactéria será capaz de manter a produção contínua de energia em situações de exaustão temporária de aceptadores de electrões extracelulares, usufruindo de uma margem temporal para se realojar em ambientes mais propícios à sua sobrevivência [8].

Durante a biorremediação de urânio *in situ*, por exemplo, as células de *Geobacter* são extremamente planctónicas e encontram-se frequentemente afastadas de  $\text{Fe}^{3+}$ . Este é um dos seus aceptadores de electrões mais abundante, constituindo a base para o seu crescimento e expansão em ambientes naturais [46, 47]. A comparação de seis espécies de *Geobacter* cujo genoma já foi sequenciado (*G. bemidjensis*, *G. lovleyi*, *G. metallireducens*, *G. strain FRC-32*, *G. sulfurreducens* e *G. uraniireducens*) [48] demonstrou que este género codifica para uma maior diversidade de citocromos de tipo *c* que a encontrada em quaisquer outros microorganismos [25, 49]. Assim, os melhores candidatos para providenciar uma solução à falta de  $\text{Fe}^{3+}$  são, efectivamente, os citocromos oxidados localizados para além da membrana citoplasmática, que podem actuar como condensadores e aceitar electrões transportados através desta, permitindo a respiração contínua na ausência deste aceptador [18, 45]. Na prática, é possível observar a olho nu a profusão de citocromos de tipo *c* presente nas células em crescimento sob condições de quantidades reduzidas de aceptadores electrónicos, devido à coloração rosa a avermelhada das culturas. Esta hipótese é também suportada por estudos realizados em biofilmes de *Gs* a produzir corrente eléctrica. Assim, foi demonstrado que estes biofilmes têm capacitância semelhante a supercondensadores sintéticos, fenómeno que poderá dever-se aos citocromos de tipo *c* expressos nas células [50].

#### 1.2.1.1 “Nanofios” de hemos

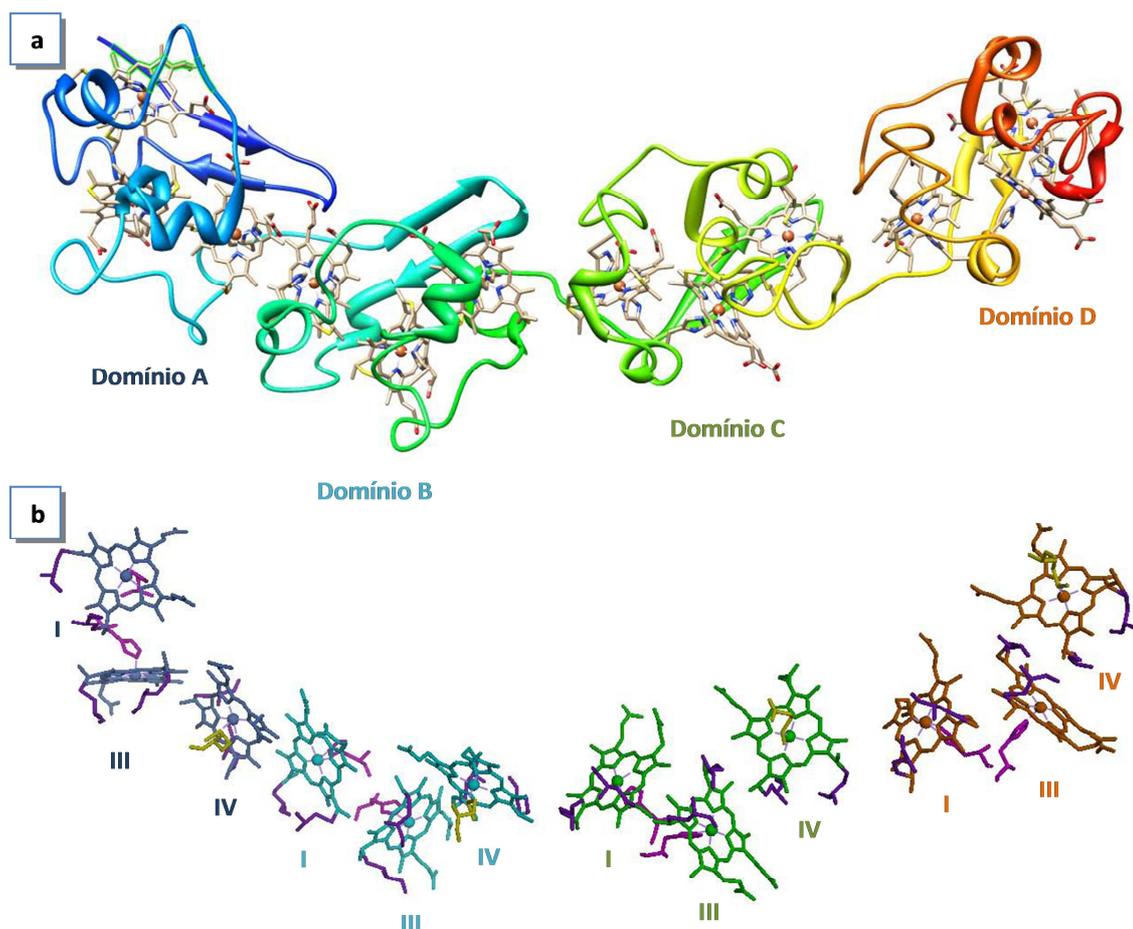
Foram identificados três “nanofios” de hemos no genoma de *Gs*: GSU2210 (com 27 grupos hemo), GSU0592 e GSU1996 (ambos com 12 grupos hemo) [51]. Foram também encontradas proteínas homólogas das últimas duas no genoma de *G. metallireducens* e *G. uraniireducens* [1, 51].

Em estudos previamente realizados, foi detectada uma maior abundância do GSU1996 em condições de crescimento nas quais está presente citrato de  $\text{Fe}^{3+}$  solúvel como aceptador de electrões ao invés de óxido de  $\text{Fe}^{3+}$  insolúvel. Embora a identidade de sequência entre o GSU1996 e o homólogo GSU0592 seja de cerca de 50%, verificou-se que tanto este citocromo como o

GSU2210 foram expressos mais abundantemente em condições de crescimento com óxido de  $\text{Fe}^{3+}$  insolúvel presente como aceitador de electrões [52]. Isto terá implícito a participação destes "nanofios" homólogos na redução do  $\text{Fe}^{3+}$ , e, tal como já antes tinha sido observado para as proteínas da família dos citocromos  $c_7$  (PpcA a E), o seu envolvimento em diferentes vias celulares de redução deste metal [53].

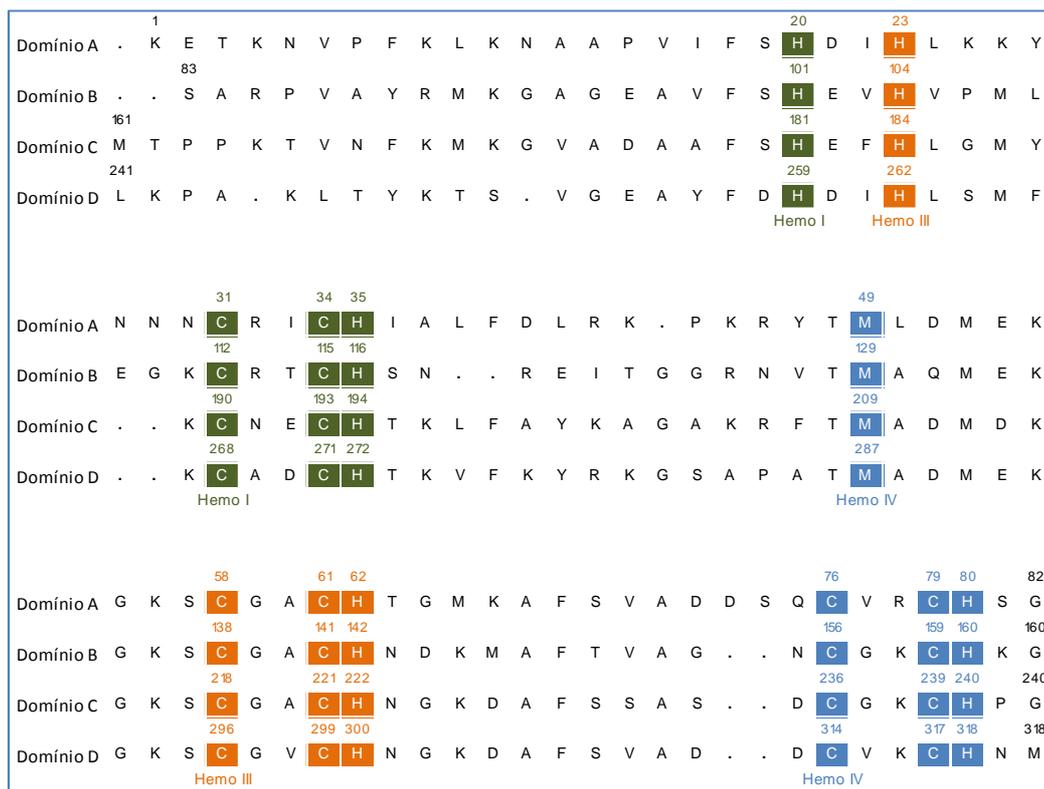
#### 1.2.1.1.1 Citocromo dodeca-hémico GSU1996

De entre os "nanofios" de hemos identificados até à presente data apenas para o citocromo dodeca-hémico GSU1996 (42,27 kDa) foi determinada a sua estrutura [8]. Os dados obtidos por cristalografia de raios-X mostraram que este citocromo tem uma estrutura linear de 12 nm de comprimento, em forma de meia-lua (Figura 4a). Os doze grupos hemo estão dispostos ao longo da cadeia polipeptídica, formando um "nanofio" de hemos [8].



**Figura 4** – a. Estrutura do citocromo dodeca-hémico GSU1996 (PDB ID: 3OV0, [8]); b. Disposição espacial dos grupos hemo na estrutura obtida por cristalografia de raios-X, com os ligandos axiais representados (metioninas a amarelo; histidinas a magenta e cisteínas a púrpura). Imagem gerada com o programa UCSF Chimera 1.6.3 [9].

Os grupos hemo estão divididos por quatro domínios com três grupos hemo cada. Estes domínios, denominados A, B, C e D, apresentam elevada homologia de sequência entre si (Figura 5) e estão ligados através de pequenos segmentos da cadeia polipeptídica. Apresentam também homologia aos citocromos *c<sub>7</sub>*, sendo designados por domínios de tipo *c<sub>7</sub>* [51] uma vez que divergem dos citocromos *c<sub>7</sub>* na natureza da ligação axial do grupo hemo IV. Assim, enquanto nos citocromos *c<sub>7</sub>* as ligações axiais nos três grupos hemo são bis-His, cada um dos domínios de tipo *c<sub>7</sub>* deste "nanofio" apresenta coordenação axial mista. Deste modo, os grupos hemo I e III têm coordenação bis-His ao passo que o grupo hemo IV tem coordenação axial histidina-metionina (His-Met) [51]. A nomenclatura dos grupos hemo é mantida semelhante à dos citocromos *c<sub>3</sub>* e *c<sub>7</sub>*: respectivamente I, III e IV na ordem de ligação aos seus motivos Cys-Xxx-Xxx-Cys-His na sequência de aminoácidos (Figura 4b) [1, 51]. Os grupos hemo adjacentes encontram-se a distâncias de van der Waals (as distâncias de contacto mais curtas estão entre 3,5 e 4,5 Å), o que permite a eficiente troca de electrões entre eles (Tabelas 2 e 3) [8].



**Figura 5** – Alinhamento da sequência de aminoácidos dos quatro domínios do GSU1996. Os resíduos de ligação aos grupos hemo I, III e IV (assinalados a verde, laranja e azul) correspondem, respectivamente, aos sextos ligandos axiais e ao motivo Cys-Xxx-Xxx-Cys-His.

Cada um dos domínios de tipo *c<sub>7</sub>* inclui duas folhas  $\beta$  ligadas por uma dobra, à qual se seguem voltas intercaladas por vários segmentos helicoidais. Estes segmentos helicoidais contêm os resíduos de ligação aos grupos hemo (as duas cisteínas e os ligandos axiais, incluindo a

metionina que coordena o grupo hemo IV em cada domínio) (Figura 4a). Os grupos hemo formam o núcleo hidrofóbico dos domínios, em conjunto com várias cadeias laterais aromáticas e/ou hidrofóbicas [51].

**Tabela 2** – Geometria dos grupos hemo em cada domínio do citocromo dodeca-hémico GSU1996. Os valores indicados foram obtidos a partir das estruturas obtidas por cristalografia de raios-X para o GSU1996, fragmentos AB e CD e ainda para o domínio C [8, 51].

Domínios		GSU1996			GSU1996		
		Fragmento AB	Fragmento CD	Domínio C	Fragmento AB	Fragmento CD	Domínio C
		Distância entre ferros hémicos (Å)			Ângulo entre planos dos grupos hemo (°)		
A	I-III	11,2	11,2		69	82	
	I-IV	18,1	18,5		22	23	
	III-IV	12,0	11,9		61	63	
B	I-III	11,4	11,2		81	77	
	I-IV	18,0	18,3		24	27	
	III-IV	11,8	11,7		65	58	
C	I-III	11,5	11,5	11,4	71		73
	I-IV	17,9	17,8	17,8	25		25
	III-IV	11,9	12,0	12,0	56		56
D	I-III	11,2	11,3		83		79
	I-IV	18,0	18,0		25		24
	III-IV	11,9	12,1		63		60

**Tabela 3** – Geometria dos grupos hemo adjacentes entre domínios do citocromo dodeca-hémico GSU1996. Os valores indicados foram obtidos a partir das estruturas obtidas por cristalografia de raios-X para o GSU1996, fragmentos AB e CD e ainda para o domínio C [8, 51].

Domínios	Grupos hemo IV – I	GSU1996		GSU1996	
		Fragmento AB	Fragmento CD	Fragmento AB	Fragmento CD
		Distância (Å) entre:		Ângulo entre planos dos grupos hemo (°)	
A – B		9,5	9,7	8,0	19,5
		$2^1CH_3-2^1CH_3$	$2^1CH_3-2^1CH_3$		
		2,6	2,3		
B – C		14,3		80,1	
		$3^2CH_3-2^1CH_3$			
		2,8			
C – D		13,2	14,6	32,1	41,3
		$2^1CH_3-20H$	$3^2CH_3-2^1CH_3$		
		3,4	4,9		

A região N-terminal da proteína contém os domínios A e B, que constituem uma unidade estrutural alongada, enquanto a região C-terminal é composta por dois domínios mais independentes entre si (domínios C e D) [8].

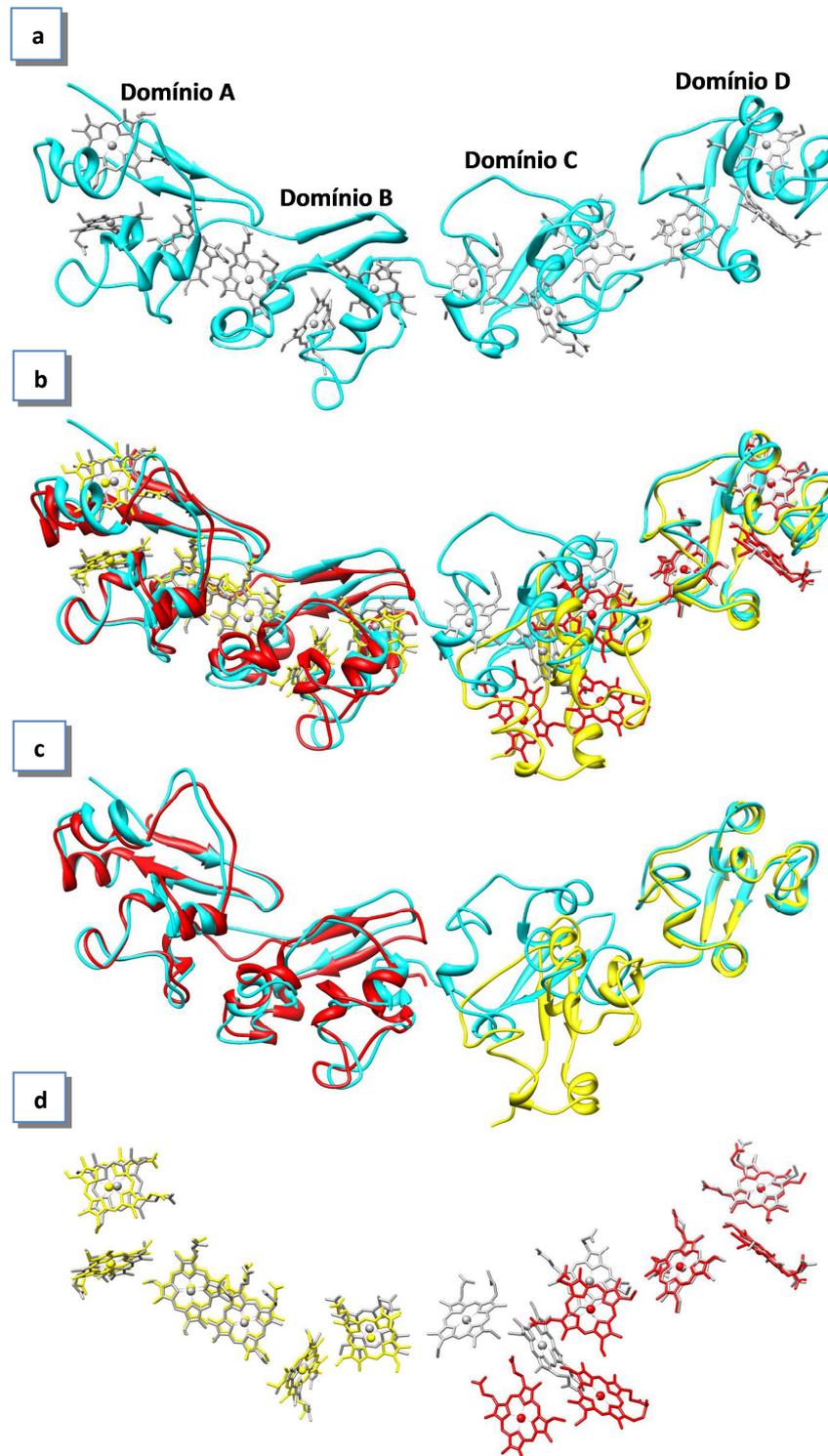
O citocromo dodeca-hémico GSU1996 poderá actuar como um "nanofio" molecular, transferindo electrões entre proteínas periplasmáticas ou para proteínas da membrana externa [8]. Tal como nos citocromos *c<sub>7</sub>* de *Gs*, este "nanofio" de hemos também contém na sua cadeia polipeptídica uma maior percentagem de resíduos de aminoácidos carregados positivamente (lisinas e argininas) do que resíduos de carga negativa (ácidos aspártico e glutâmico). Com base na sequência de aminoácidos, a carga global positiva localizada em cada domínio diminui da região N-terminal da proteína para a região C-terminal, sendo o domínio A o mais positivo e o domínio D o menos positivo [8]. Estudos anteriores apontaram para uma localização sub-celular do GSU1996 na membrana citoplasmática ou membrana externa [25, 49]. Assim, Pokkuluri *et al.* especularam que o excesso de cargas positivas presentes na região AB poderiam corresponder a um local de interacção desta proteína com a membrana através de interacções electrostáticas [8]. Deste modo, citocromos multi-hémicos ligados à membrana externa poderão actuar como redutases terminais de metais nestas bactérias [54, 55].

Os genes que codificam para cada um dos domínios (A a D), para fragmentos de dois domínios (AB, BC e CD) e para a proteína completa foram clonados e expressos em *Escherichia coli* (*E. coli*) (Tabela 4) [51, 56, 57].

**Tabela 4** – Domínios e fragmentos clonados [51, 56]. Parâmetros calculados com a ferramenta *Compute pI/Mw* [58]. As massas moleculares incluem um valor de 616 Da por grupo hemo [59]. Na determinação do ponto isoeléctrico não é contabilizada a contribuição dos grupos propionato presentes nos grupos hemo.

Proteína	Sequência de resíduos de aminoácidos	Massa molecular/kDa	Ponto isoeléctrico teórico
Domínios	A KETKNVPFKLKNAAPVIFSHDIHLKYYNNCRICHALFDLRKPKRYTMLD MEKGKSCGACHTGMKAFSVADDSQCVRCHSG	11,14	9,41
	B SARPVAYRMKGAGEAVFSHEVHVPMLGKCRCTCHSNREITGGRNVTMA QMEKGKSCGACHNDKMAFTVAGNCGKCHKG	10,21	9,24
	C MTPPKTVNFKMKGVADAAFSHEFHLMGYKCNECHTKLFAYKAGAKRFT MADMDKGKSCGACHNGKDAFSSASDCGKCHPG	10,50	8,97
	D LKPAKLYKTSVGEAYFDHDIHLSMFKCADCHTKVFKYRKGSPATMAD MEKGKSCGVCHNGKDAFSVADDCVKCHNM	10,47	8,56
Fragmentos	AB KETKNVPFKLKNAAPVIFSHDIHLKYYNNCRICHALFDLRKPKRYTMLD MEKGKSCGACHTGMKAFSVADDSQCVRCHSGSARPVAYRMKGAGEAV FSHEVHVPMLGKCRCTCHSNREITGGRNVTMAQMEKGKSCGACHNDK MAFTVAGNCGKCHKGM	21,47	9,41
	BC ARPVAYRMKGAGEAVFSHEVHVPMLGKCRCTCHSNREITGGRNVTMAQ MEKGKSCGACHNDKMAFTVAGNCGKCHKGMTPPKTVNFKMKGVADA AFSHEFHLMGYKCNECHTKLFAYKAGAKRFTMADMDKGKSCGACHNGK DAFSSASDCGKCHPG	20,61	9,18
	CD KGMTPPKTVNFKMKGVADAAFSHEFHLMGYKCNECHTKLFAYKAGAKR FTMADMDKGKSCGACHNGKDAFSSASDCGKCHPGLKPAKLYKTSVGE AYFDHDIHLSMFKCADCHTKVFKYRKGSPATMADMEKGKSCGVCHNG KDAFSVADDCVKCHNM	21,14	8,96

As estruturas obtidas por cristalografia de raios-X do domínio C e dos fragmentos AB e CD expressos isoladamente foram também determinadas [8, 51]. Assim, a estrutura do fragmento AB é muito semelhante à parte N-terminal encontrada no GSU1996, sendo as interações entre grupos hemo essencialmente as mesmas (Figura 6).



**Figura 6** – Sobreposição das estruturas obtidas por cristalografia de raios-X do GSU1996 [8] e dos fragmentos AB e CD (PDB ID: 3OUQ e 3OUE, respectivamente, [8]): **a.** cadeia polipeptídica e grupos hemo do GSU1996; **b.** sobreposição da cadeia polipeptídica e grupos hemo do GSU1996 e dos fragmentos AB e CD; **c.** sobreposição das cadeias polipeptídicas do GSU1996 e dos fragmentos AB e CD; **d.** sobreposição dos grupos hemo do GSU1996 e dos fragmentos AB e CD. Imagens geradas com o programa UCSF Chimera 1.6.3 [9].

No fragmento CD, tal como no GSU1996, ambos os domínios C e D aparecem separados por uma pequena região de ligação. Contudo, a associação entre estes dois domínios é consideravelmente diferente no fragmento e no GSU1996. Deste modo, na estrutura do fragmento os dois domínios parecem estar associados de forma linear, enquanto no GSU1996 há uma curvatura significativa entre eles (Figura 6).

Os potenciais globais de redução ( $E_{app}$ , que corresponde ao valor do potencial da solução obtido quando as fracções oxidada e reduzida são iguais) foram medidos para os domínios C e D, para os fragmentos AB e CD e para o GSU1996 (Tabela 5).

**Tabela 5** – Potenciais globais de redução padrão a 25°C e pH 7,9.

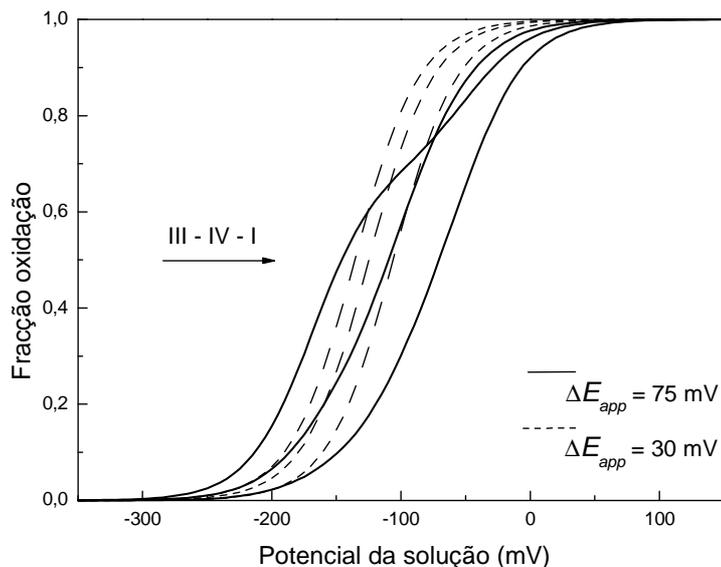
Proteína	$E_{app}/mV$	Referência
GSU1996	-119	[8]
Fragmento AB	-123	[8]
Fragmento CD	-122	[8]
Domínio C	-105	[51]
Domínio D	-133	[8]

Contudo, a caracterização microscópica (ver secção 2.2) de cada um dos grupos hemo e, logo, as propriedades funcionais, foi apenas efectuada para o domínio C (Tabela 6) [1].

**Tabela 6** – Parâmetros termodinâmicos determinados para o domínio C [1]. Os valores a itálico representam as interacções redox e redox-Bohr entre os quatro centros. Os valores a negrito correspondem aos potenciais de redução dos grupos hemo e à energia de desprotonação do centro redox-Bohr na proteína totalmente reduzida e protonada.

	Energias/meV			
	Grupos Hemo			Centro protonável
	I	III	IV	
I	<b>-106</b>	<i>44</i>	<i>7</i>	<i>-4</i>
III		<b>-136</b>	<i>40</i>	<i>-25</i>
IV			<b>-125</b>	<i>-13</i>
Centro protonável				<b>340</b>
Coordenação axial	His-His	His-His	His-Met	

Neste domínio, os potenciais de redução dos grupos hemo são diferentes, sendo fortemente modulados pela estrutura da proteína e por interacções redox [1]. Ao contrário do esperado para um grupo hemo com coordenação axial His-Met, o grupo hemo IV não é o que apresenta o potencial de redução mais elevado. Este domínio apresenta assim um intervalo de potencial de operação alargado, permitindo possivelmente a sua interacção com uma diversa panóplia de parceiros (Figura 7) [1].



**Figura 7** – Frações oxidadas de cada grupo hemo do domínio C a pH 7,0. As linhas a cheio foram calculadas como função do potencial de redução da solução, tendo por base os valores da Tabela 6. As linhas a tracejado foram geradas assumindo a inexistência de interações redox entre pares de grupos hemo. A seta indica, da esquerda para a direita, a ordem de aumento de valores de  $E_{app}$  dos grupos hemo.  $\Delta E_{app}$  corresponde à separação de  $E_{app}$  entre os grupos hemo I e III para cada conjunto de linhas. Adaptado de Morgado *et al.*, 2009 [1].

A relevância dos “nanofios” de hemos encontrados em *Gs* faz com que a sua caracterização seja uma meta a atingir com brevidade. Neste sentido, a determinação dos parâmetros físico-químicos é crítica para a elucidação dos mecanismos funcionais que acontecem entre estas proteínas e outras moléculas que com elas interactuem.

Este trabalho teve como objectivo principal o desenvolvimento de uma estratégia para a caracterização funcional do citocromo dodeca-hémico GSU1996 em solução, com base na sua constituição modular. Descreve-se assim uma estratégia eficaz para atribuir os sinais dos substituintes hémicos, na qual se utilizaram os domínios C e D, em conjunto com o fragmento CD para inferir sobre a validade da aproximação modular na atribuição de sinais aos substituintes hémicos dos vários grupos hemo. Foi a primeira vez que tal metodologia foi utilizada na atribuição de sinais de substituintes hémicos, tendo demonstrado ser uma ferramenta promissora para adquirir conhecimentos acerca deste tipo de proteínas em solução.

Os objectivos secundários visaram a caracterização funcional de cada um dos quatro domínios individuais desta proteína, bem como de fragmentos constituídos por dois domínios cada. Com este trabalho, pretendeu-se assim contribuir para a optimização do processo de expressão heteróloga e purificação, bem como realizar uma caracterização preliminar destas proteínas.

## **2 METODOLOGIA PARA CARACTERIZAÇÃO DE “NANOFIOS” DE HEMOS EM SOLUÇÃO**

O estudo de citocromos multi-hémicos em solução, quer a nível estrutural quer bioquímico, implica a obtenção de quantidades suficientes de amostra pura, pelo que estudos detalhados destas proteínas encontram-se muitas vezes limitados devido às pequenas quantidades disponíveis. O seu isolamento a partir de *Gs*, para além de ser um processo moroso, requer o crescimento de grandes volumes de cultura em condições anaeróbias, utilizando meios de cultura complexos e dispendiosos. Para além disso, o elevado número de citocromos presentes em *Gs* é um desafio acrescido no processo de purificação. Assim, a clonagem das proteínas e o desenvolvimento de um sistema de expressão heteróloga capaz de produzir estas proteínas constituem as duas etapas iniciais a concretizar para viabilizar a sua caracterização.

Após a obtenção das proteínas puras, pode então prosseguir-se com a terceira etapa, de caracterização propriamente dita. A metodologia que permite o estudo detalhado das propriedades funcionais dos centros redox em proteínas multi-hémicas foi descrita anteriormente por Turner *et al.* [60, 61]. O primeiro passo desta metodologia consiste na atribuição dos sinais aos prótons hémicos nos espectros obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN) na forma reduzida e/ou oxidada. De seguida, são realizadas titulações de oxidação-redução em que os sinais dos metilos hémicos de cada grupo hemo são seguidos através de técnicas de espectroscopia de RMN bi-dimensional (2D) que permitem observar sinais em permuta química nos diferentes estados de oxidação (2D EXSY). Os dados obtidos por RMN a partir destas titulações, em conjunto com os dados obtidos a partir de titulações de oxidação-redução seguidas por espectroscopia de visível, permitem a determinação dos parâmetros termodinâmicos de um citocromo multi-hémico. Estes incluem os potenciais de redução de cada um dos grupos hemo, a energia de desprotonação dos centros protonáveis, os valores de  $pK_a$  dos centros redox-Bohr, as interações redox entre grupos hemo e as interações redox-Bohr [62].

Na Figura 8, resumem-se as etapas experimentais subjacentes à caracterização de citocromos *c* multi-hémicos em solução. Nos pontos seguintes, descreve-se cada uma das etapas experimentais realizadas neste trabalho, bem como os materiais utilizados e procedimentos experimentais seguidos.



**Figura 8** – Resumo das etapas experimentais de caracterização de citocromos *c* multi-hémicos em solução.

## 2.1 Clonagem, sequenciação e expressão heteróloga de citocromos *c* em *Escherichia coli*

A bactéria *E. coli* é o hospedeiro de eleição para a expressão de citocromos *c*. Isto deve-se a factores como a abundância de vectores de expressão, a ausência de expressão de citocromos *c* endógenos durante o crescimento aeróbio, a rapidez e facilidade de manutenção das culturas e também ao baixo custo económico envolvido no processo.

A sobre-produção de proteínas recombinantes em *E. coli* provou ser bem sucedida para numerosas proteínas de fontes eucarióticas e procarióticas. No entanto, as tentativas de expressão heteróloga de citocromos *c* falharam por diversas vezes, essencialmente devido à baixa eficiência nas modificações covalentes pós-traducionais. Este problema agrava-se na expressão de proteínas contendo vários grupos hemo. De facto, a produção de citocromos *c* periplasmáticos envolve um mecanismo celular que é responsável pelo transporte da apoproteína e grupos hemo através da membrana interna, pela manutenção das cisteínas na sua forma reduzida no ambiente oxidativo do periplasma e, finalmente, pela formação das ligações covalentes destes resíduos aos grupos hemo.

Para a expressão de citocromos *c* em condições anaeróbias, a *E. coli* utiliza o chamado sistema I, que inclui um transportador, um sistema redox do tipo tioredoxina, um *chaperone* de grupos hemo e um sintetase, num total de oito proteínas [63]. Este sistema é codificado pelo

*cluster* de genes *ccmA* até *ccmH*, que é parte do chamado operação *aeg-46,5* [64], activo apenas em condições anaeróbias. Para conseguir colocar esta maquinaria celular a funcionar em condições aeróbias, o *cluster* referido foi clonado no vector pACYC184 [65], passando a designar-se por pEC86 [66]. A co-expressão deste plasmídeo em conjunto com um segundo contendo o péptido líder OmpA (cuja função é direccionar o polipéptido nascente para o periplasma) e os genes do citocromo desejado, está na base do sistema desenvolvido por Londer *et al.* [51, 56, 57, 67] para expressão heteróloga de citocromos *c* em *E. coli* sob condições de aerobiose.

Neste sistema, é utilizada a sequência do promotor *lac* no plasmídeo que contém o gene da proteína de interesse e a expressão é induzida por adição de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Este indutor é um substrato não metabolizável, análogo da lactose, que induz a expressão do operação *lac* em *E. coli*. O mecanismo de acção do IPTG envolve a sua ligação ao repressor *lac*, provocando a alteração da sua conformação. A inactivação previne a repressão, permitindo assim a transcrição dos genes contidos neste operação [68].

Devido às dificuldades de expressão heteróloga inerentes ao tamanho do citocromo GSU1996 e ao elevado número de grupos hemo que contém, bem como para avaliar a contribuição de cada domínio para a estrutura global, estudos anteriores fizeram uma aproximação baseada na constituição modular desta proteína [1, 8, 51, 56, 57]. Assim, numa primeira abordagem, cada um dos seus domínios (A a D) foi clonado a partir de *Gs* e expresso isoladamente em *E. coli*, seguindo-se fragmentos de dois domínios cada (denominados fragmentos AB, BC e CD) e finalmente, a proteína completa, GSU1996 [51, 56, 57].

Os rendimentos obtidos para a expressão dos vários domínios e fragmentos encontram-se descritos na Tabela 7.

**Tabela 7** – Rendimentos obtidos por expressão heteróloga em *E. coli* para os diferentes domínios, fragmentos e GSU1996.

	Proteína	Rendimento (mg/L)	Referência
Domínios	A	-*	
	B	0,20	[51]
	C	0,25	
	D	1,10	
Fragmentos	AB	0,20	
	BC (menor)	0,03	
	BC (maior)	0,16	
	CD	2,40	
	GSU1996	0,50	[57]

\* Os níveis de expressão foram considerados demasiado baixos, pelo que a purificação deste domínio não foi realizada pelos autores.

## 2.2 Caracterização de centros redox em proteínas multi-hémicas

### 2.2.1 Equilíbrios de oxidação-redução

A análise termodinâmica de proteínas multi-hémicas pode ser efectuada macro ou microscopicamente. Contudo, apenas esta última pode fornecer informação específica acerca de cada grupo hemo (centro redox). Deste modo, para estudar em detalhe os mecanismos de oxidação-redução nestas proteínas é necessário estabelecer um modelo que contabilize todas as espécies redox existentes, desde a forma completamente reduzida até à forma completamente oxidada.

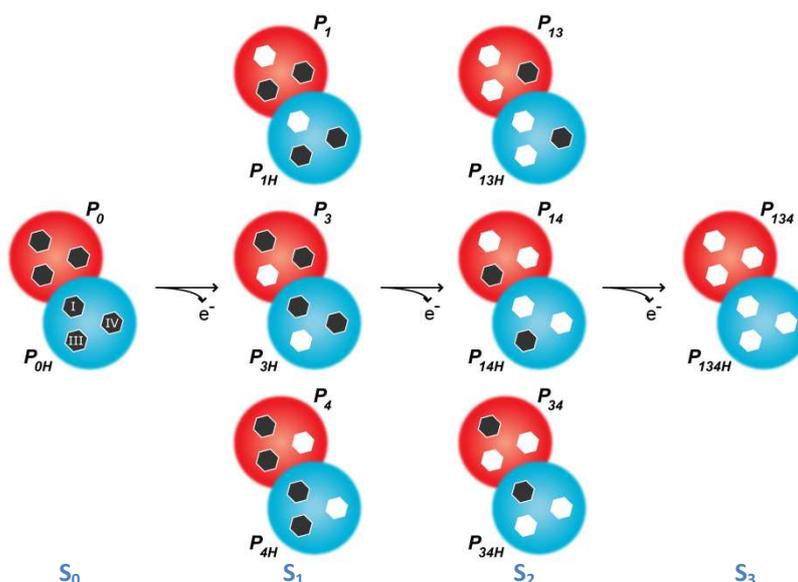
O número de microestados destas proteínas em cada uma das formas (protonada e não protonada) pode facilmente ser calculado através de combinações de eventos, tendo em consideração o número de grupos hemo. Assim, considerando um único centro protonável (também designado por centro redox-Bohr), o número de microestados pode ser encontrado através da relação:

$$\text{Número de microestados} = 2 \times 2^{\text{número de hemos}} \quad \text{Equação 1}$$

Esta relação corresponde ao total do número de microestados nas formas protonada e desprotonada das proteínas.

Como exemplo, nos citocromos  $c_7$  há um total de dezasseis microestados redox para os três grupos hemo individuais [69]. Para estes citocromos, o modelo mais simples que se pode considerar encontra-se indicado na Figura 9.

Segundo este modelo, os dezasseis microestados (oito para a forma protonada e oito para a forma desprotonada) podem ser agrupados de acordo com o número total de grupos hemo oxidados (0 a 3) em quatro estados macroscópicos de oxidação ( $S_0$  a  $S_3$ ). O estado 0 corresponde à proteína completamente reduzida, o estado 1 ao conjunto dos microestados com um só grupo hemo oxidado e assim sucessivamente até à proteína completamente oxidada (estado de oxidação 3). Por sua vez, os estados macroscópicos de oxidação estão interligados por três etapas de oxidação-redução, envolvendo cada uma delas a transferência de um electrão.



**Figura 9** – Modelo para a distribuição eletrônica numa proteína tri-hêmica com equilíbrio protônico associado, apresentando os dezasseis microestados possíveis. Os hexágonos representam os três grupos hemo (I, III e IV), que podem estar reduzidos (preto) ou oxidados (branco), nos microestados protonado (azul) e desprotonado (vermelho). Os microestados estão agrupados em quatro estados de oxidação ( $S_0$  a  $S_3$ ), de acordo com o número de grupos hemo oxidados. Respectivamente,  $P_{0H}$  e  $P_0$  representam os microestados protonado e desprotonado para os grupos hemo totalmente reduzidos e  $P_{ijkH}$  e  $P_{ijk}$  indicam os microestados protonados e desprotonados em que  $i, j$  e  $k$  são os grupos hemo que sofrem oxidação nesse microestado particular. Adaptado de Morgado *et al.*, 2012 [7].

## 2.2.2 Estudo das propriedades redox em citocromos multi-hémicos por espectroscopia de RMN

A espectroscopia de RMN tem demonstrado ser uma excelente técnica para estudar as propriedades redox em citocromos multi-hémicos, visto permitir sondar individualmente cada centro redox. Desta forma, providencia informação essencial para elucidar os mecanismos funcionais da proteína.

### 2.2.2.1 Princípios da técnica de RMN

A técnica de RMN está relacionada com a rotação (*spin*) dos núcleos em torno de um eixo. Assim, na presença de um campo magnético, os *spins* nucleares com número quântico de *spin*,  $I$ , diferente de zero encontram-se maioritariamente alinhados segundo a direcção do campo aplicado. No caso particular de *spins* nucleares com número quântico de *spin*  $I = \frac{1}{2}$ , existem apenas dois níveis energéticos, correspondentes às orientações permitidas relativamente ao campo aplicado (Figura 10).

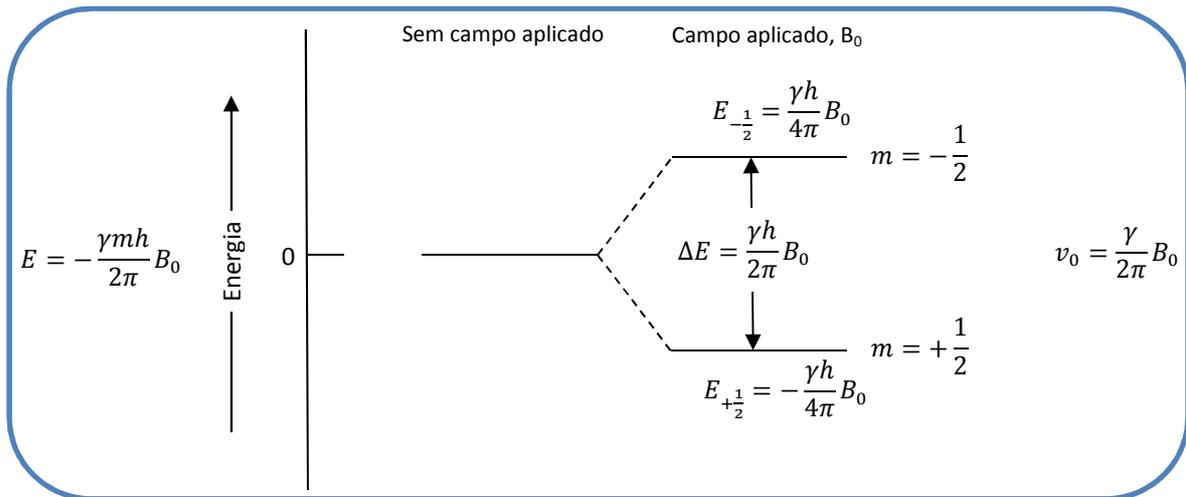


Figura 10 – Um núcleo com  $I = \frac{1}{2}$  pode adoptar duas orientações na presença de um campo magnético  $B_0$ , caracterizadas pelos números magnéticos quânticos  $m = +\frac{1}{2}$  e  $m = -\frac{1}{2}$  e que originam dois níveis energéticos. Podem promover-se transições entre os dois níveis aplicando uma radiação electromagnética com frequência  $\nu$ , que obedeça à condição de Planck. Adaptado de Skoog *et al.*, 1998 [4].

Em situação de equilíbrio, o nível energético mais baixo, alinhado segundo a direcção do campo aplicado, encontra-se ligeiramente mais populado e, conseqüentemente, existe uma magnetização global segundo esta direcção. As transições entre estes dois níveis energéticos podem ser estimuladas pela aplicação de um impulso de radiofrequência. Com a aplicação deste impulso, os *spins* nucleares que se encontram no nível inferior absorvem energia e, em seguida, relaxam voltando ao equilíbrio inicial. A conseqüente recuperação da magnetização inicial ocorre exponencialmente e origina o decaimento livre da magnetização induzida (FID).

A espectroscopia de RMN consiste na análise do processo de excitação dos diferentes grupos de *spin* e da subsequente relaxação até ao restabelecimento do equilíbrio inicial. O processamento do FID, através de uma transformação de Fourier, dá origem ao espectro de RMN. Um espectro de RMN é um traçado da radiofrequência aplicada em função da absorção. Os sinais nos espectros são designados de ressonâncias, sendo a frequência de cada sinal denominada de desvio químico ( $\delta$ ). O desvio químico corresponde à frequência de ressonância expressa em relação a um composto padrão, cuja localização se define como sendo 0 partes por milhão (ppm). Por questão de simplificação, expressa-se a escala em partes por milhão, sendo esta independente da frequência do espectrómetro de RMN:

$$\text{Desvio químico, } \delta = \frac{\text{frequência do sinal} - \text{frequência do padrão}}{\text{frequência do espectrómetro}} \times 10^6$$

**Equação 2**

Uma experiência de RMN unidimensional (1D RMN) simples consiste na excitação de todos os núcleos da proteína através de um impulso de radiofrequência não selectivo de 90° e na aquisição subsequente das respostas de todos os grupos de *spin* durante a recuperação da magnetização inicial que ocorre durante o tempo  $t$ .

No caso das moléculas em análise apresentarem um elevado número de resíduos, a sobreposição de sinais obtidos após o processamento do FID é inevitável. Este é um dos principais problemas inerentes aos espectros de 1D RMN.

Contudo, com o desenvolvimento de técnicas de RMN multidimensionais tem sido possível suplantar esta dificuldade.

Uma experiência de RMN bidimensional (2D RMN) é composta por uma sequência de quatro estados. O primeiro, designado por estado de preparação consiste, tal como nas experiências de 1D RMN, na excitação dos núcleos da molécula com um impulso de radiofrequência. No segundo estado, estado de evolução, o sistema evolui durante um determinado tempo,  $t_1$ . A transferência de magnetização (também designada por transferência de coerência) entre os grupos de *spins* ocorre durante um terceiro estado, o estado de mistura. Este estado termina com aquisição do FID durante um período de tempo  $t_2$  (estado de detecção) e é normalmente precedido da aplicação de um outro impulso. Sempre que ocorra transferência de magnetização entre grupos de *spins* com diferente frequência de precessão observar-se-á no espectro de 2D RMN uma conectividade entre essas frequências. A análise de diferentes formas de transferência de magnetização entre os grupos de *spins* permite obter informação distinta, mas no entanto, complementar.

#### 2.2.2.1.1 Transferência de magnetização através de ligações químicas

Em experiências de espectroscopia de correlação homonuclear (COSY) e de correlação total de *spin* (TOCSY) a transferência de magnetização ocorre através das ligações químicas entre grupos de prótons acoplados [70]. Nestas, a transferência de magnetização ocorre entre núcleos do mesmo tipo:

- COSY – é utilizada na identificação de *spins* acoplados entre si. Os espectros apresentam sinais que correspondem a prótons ligados até dois átomos de distanciamento.
- TOCSY – é semelhante ao COSY, uma vez que também são observados os sinais cruzados dos prótons acoplados. Contudo, os sinais cruzados são observados não só para os núcleos que estão directamente acoplados, mas também entre núcleos

que estão ligados por uma cadeia de acoplamentos. Assim, podem observar-se as correlações entre prótons pertencentes ao mesmo sistema de *spin*.

#### 2.2.2.1.2 Transferência de magnetização através de permuta química e/ou relaxação dipolar

Nas experiências de espectroscopia 2D de correlação devido ao efeito nuclear de Overhauser (NOESY) e de EXSY, a transferência de magnetização ocorre através de permuta química e/ou relaxação dipolar entre dois núcleos, ou seja, as correlações são estabelecidas entre núcleos que estão fisicamente próximos, independentemente de existir ou não uma ligação química entre eles [70].

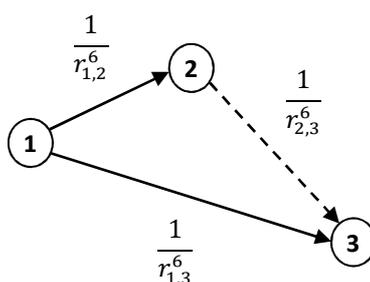
Estas técnicas baseiam-se no efeito nuclear de Overhauser (NOE), em que átomos próximos (até cerca de 5 Å) sofrem relaxação cruzada. O NOE para um próton define-se como a variação fraccional da intensidade do sinal, quando um outro sinal ressonante é saturado. A intensidade deste efeito é proporcional ao inverso da sexta potência da distância entre os núcleos irradiado e observado:

$$NOE \propto \frac{1}{\langle r \rangle^6} f(\tau_c) \quad \text{Equação 3}$$

Nesta equação,  $f(\tau_c)$  corresponde à função de correlação, que descreve a modulação do acoplamento dipolo-dipolo com um tempo de correlação  $\tau_c$  [5]. Os NOE observados dependem assim da distância  $r$  entre prótons ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) e dos tempos de correlação,  $\tau_c$ . Para cada par de átomos de hidrogénio, o valor de  $\tau_c$  é determinado pelo movimento aleatório das moléculas em solução (como consequência dos choques entre elas – movimento browniano), que depende do tamanho e forma das proteínas e também da viscosidade do solvente. Para além disso, pode ser afectado por movimentos intramoleculares. Por estas razões,  $f(\tau_c)$  pode variar para diferentes pares de átomos de hidrogénio numa molécula proteica [5].

Ambiguidades adicionais podem ocorrer devido à extinção parcial de NOE  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  individuais através de processos competitivos de relaxação de *spin*, como por exemplo, difusão de *spin*, permuta química ou conformacional e interações com outros *spins* electrónicos ou nucleares. Por outro lado, como resultado da rápida mobilidade intramolecular, um dado NOE pode ser resultado de amostragem ao longo de um intervalo de distâncias entre os dois átomos de hidrogénio de interesse [71].

A difusão de *spin* (Figura 11) ocorre como consequência da dependência dos NOE com o inverso da sexta potência da distância internuclear (Equação 3), uma vez que a transferência de magnetização entre dois *spins* através de múltiplos passos curtos pode ser mais eficiente que a transferência num apenas passo através de uma distância directa mais longa [5].



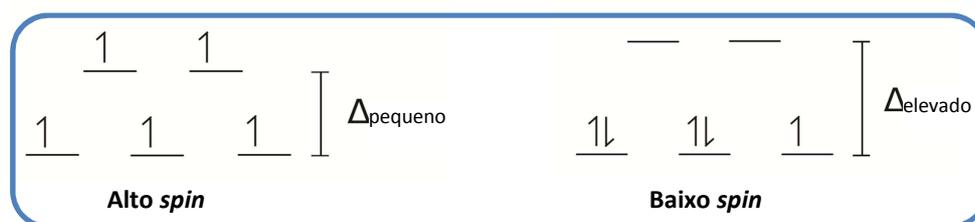
**Figura 11** – Difusão de *spin*. A transferência de magnetização entre dois átomos de hidrogênio 1 e 3 na presença de outros átomos de hidrogênio ocorre através de duas vias competitivas: por NOE directo através da distância  $r_{1,3}$  e por difusão de *spin*, que ocorre por dois ou mais passos, via átomos de hidrogênio intervenientes. In Wütrich, 2003 [5].

As duas técnicas 2D referidas caracterizam-se por:

- NOESY – as correlações são estabelecidas com base na relaxação cruzada nuclear de Overhauser entre *spins* nucleares durante os períodos de mistura. O espectro adquirido é semelhante ao de COSY, com sinais na diagonal e sinais cruzados. No entanto, os sinais cruzados ligam ressonâncias de núcleos que estão espacialmente perto, ao invés dos que estão acoplados através de ligações químicas entre si.
- EXSY – quando a técnica de NOESY é utilizada na detecção de permutas químicas e conformacionais, é chamada de EXSY.

### 2.2.2.2 Características gerais dos espectros de RMN dos citocromos *c* de baixo *spin*

Os compostos de coordenação podem ser classificados, quanto ao estado de *spin* electrónico, em compostos de alto *spin* ou de baixo *spin*. Assim, a forma como os electrões se encontram distribuídos pelas orbitais depende da quantidade de energia que é necessária para emparelhar dois electrões numa só orbital (baixo *spin*, há um número mínimo de electrões desemparelhados) em oposição a deixá-los desemparelhados com o custo de colocar um ou mais deles em orbitais diferentes (alto *spin*, há um número máximo de electrões desemparelhados) [72]. Os complexos de ferro podem ter cinco electrões desemparelhados por íão de ferro, com cada uma das orbitais 3*d* ocupadas por um electrão ou, alternativamente, podem ter apenas um electrão desemparelhado, com os cinco electrões *d* colocados nas três orbitais inferiores (Figura 12) [72]. As configurações de alto *spin* ocorrem quando o íão de ferro do grupo hemo está penta-coordenado, enquanto as configurações de baixo *spin* ocorrem quando está hexa-coordenado, independentemente do estado de oxidação (+2 ou +3).

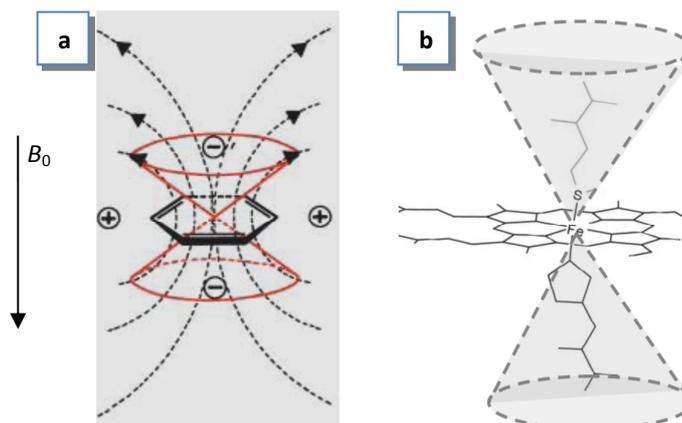


**Figura 12** – Estados de *spin* electrónico no ferro. No caso em que as orbitais se encontram energeticamente mais próximas ( $\Delta_{\text{pequeno}}$ , ou seja, inferior à energia de emparelhamento,  $P$ ), os electrões estão distribuídos unitariamente por cada uma delas (configuração de alto *spin*). Quando o gasto energético para distribuir os electrões por diferentes orbitais é elevado ( $\Delta_{\text{elevado}}$ , ou seja, superior a  $P$ ), os electrões encontram-se maioritariamente emparelhados (configuração de baixo *spin*).

Nos espectros de RMN é possível discriminar entre estes dois estados. De facto, os citocromos *c* de alto *spin* apresentam sinais num intervalo muito mais alargado que os citocromos *c* de baixo *spin*, quer no estado reduzido, quer no estado oxidado. Os citocromos *c* de alto *spin* podem apresentar, respectivamente, sinais acima de 15 ppm e de 40 ppm nos estados reduzido e oxidado, enquanto os citocromos de baixo *spin* apresentam sinais abaixo de 12 ppm no estado reduzido e abaixo de 40 ppm no estado oxidado. Citocromos *c* com coordenação axial His-Met nos seus grupos hemo, como é o caso das proteínas em estudo, são geralmente de baixo *spin*. Em espectros de UV-visível, proteínas no estado oxidado com este tipo de coordenação podem ser detectadas, uma vez que apresentam uma banda característica a cerca de 695 nm [29].

Para proteínas de baixo peso molecular, em que o ferro hémico se encontra na configuração de baixo *spin* tanto no estado reduzido (diamagnético,  $S = 0$ ) como no estado oxidado (paramagnético,  $S = \frac{1}{2}$ ), podem obter-se espectros de  $^1\text{H}$ -RMN bastante diferentes mas igualmente bem resolvidos em ambos os estados de oxidação.

Apesar da complexidade destes espectros, no caso dos citocromos *c* de baixo peso molecular, a presença de grupos hemo em geral e o estado de *spin* do ião  $\text{Fe}^{\text{nt}}$  em particular, podem facilitar a identificação de uma série de ressonâncias. Entre estas, incluem-se as dos prótons do grupo hemo. Os desvios provocados pelas correntes de anel na forma diamagnética e pela interacção com o electrão desemparelhado na forma paramagnética deslocam algumas destas ressonâncias para fora da zona de maior agrupamento de sinais, podendo facilitar a sua identificação (Figura 13) [73-75]. A atribuição de algumas ressonâncias hémicas pode ser extremamente útil na obtenção de informação estrutural, na monitorização de processos redox e no estabelecimento dos locais de interacção com outros parceiros redox.



**Figura 13** – Correntes de anel. **a.** Campo local devido a corrente de anel à volta de anéis de resíduos aromáticos em solução, induzido por um campo magnético estático exterior. A forma do campo devido a corrente de anel é indicada pelo duplo cone e pelas linhas de campo magnético a tracejado. O sinal negativo indica que as linhas de RMN dos átomos de  $^1\text{H}$  localizados no interior do cone na estrutura tridimensional da proteína estão desviados para campo alto (lado direito de um espectro de RMN), enquanto os átomos fora do cone estão desviados para campo baixo. **b.** O grupo hemo comporta-se como um anel aromático de grandes dimensões.

#### 2.2.2.2.1 Forma diamagnética

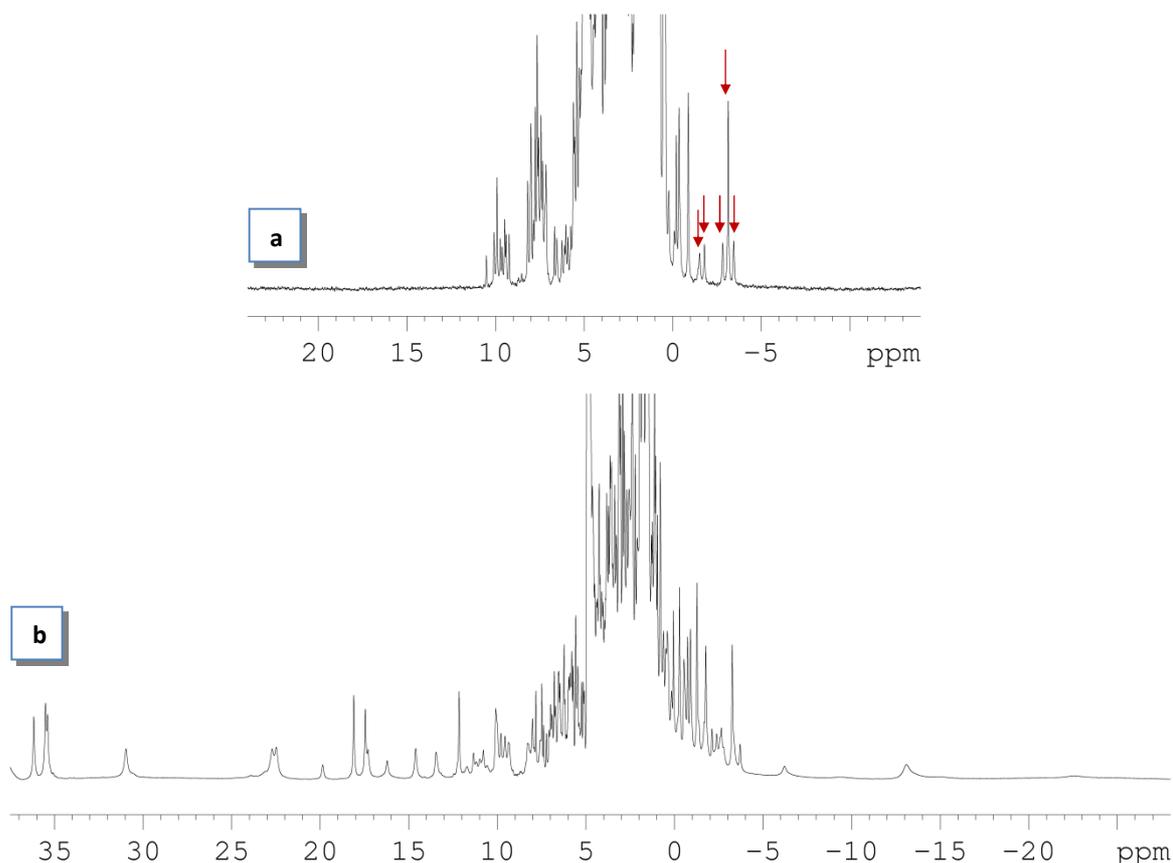
As ressonâncias dos prótons no espectro de RMN de um ferrocitocromo (estado reduzido) de baixa *spin* (diamagnético), encontram-se tipicamente numa zona compreendida entre -5 e 12 ppm (Figura 14a), situadas maioritariamente entre 0 e 5 ppm. Os desvios positivos (ou seja, desvios para maiores valores de ppm, também designados por desvios para campo baixo ou para altas frequências) e negativos devem-se fundamentalmente às correntes de anel produzidas pelo grupo hemo.

Os prótons localizados no plano do grupo hemo surgem em regiões típicas do espectro: prótons meso entre 8 e 10 ppm; prótons metino das pontes tioéter entre 5 e 8 ppm; metilos hémicos entre 2,5 e 5 ppm; grupos metilo das pontes tioéter entre -1 e 3 ppm e os grupos propionato substituintes do grupo hemo, embora com um padrão não característico devido à geometria variável que apresentam relativamente ao plano do grupo hemo, surgem também entre 2,5 e 5 ppm.

#### 2.2.2.2.2 Forma paramagnética

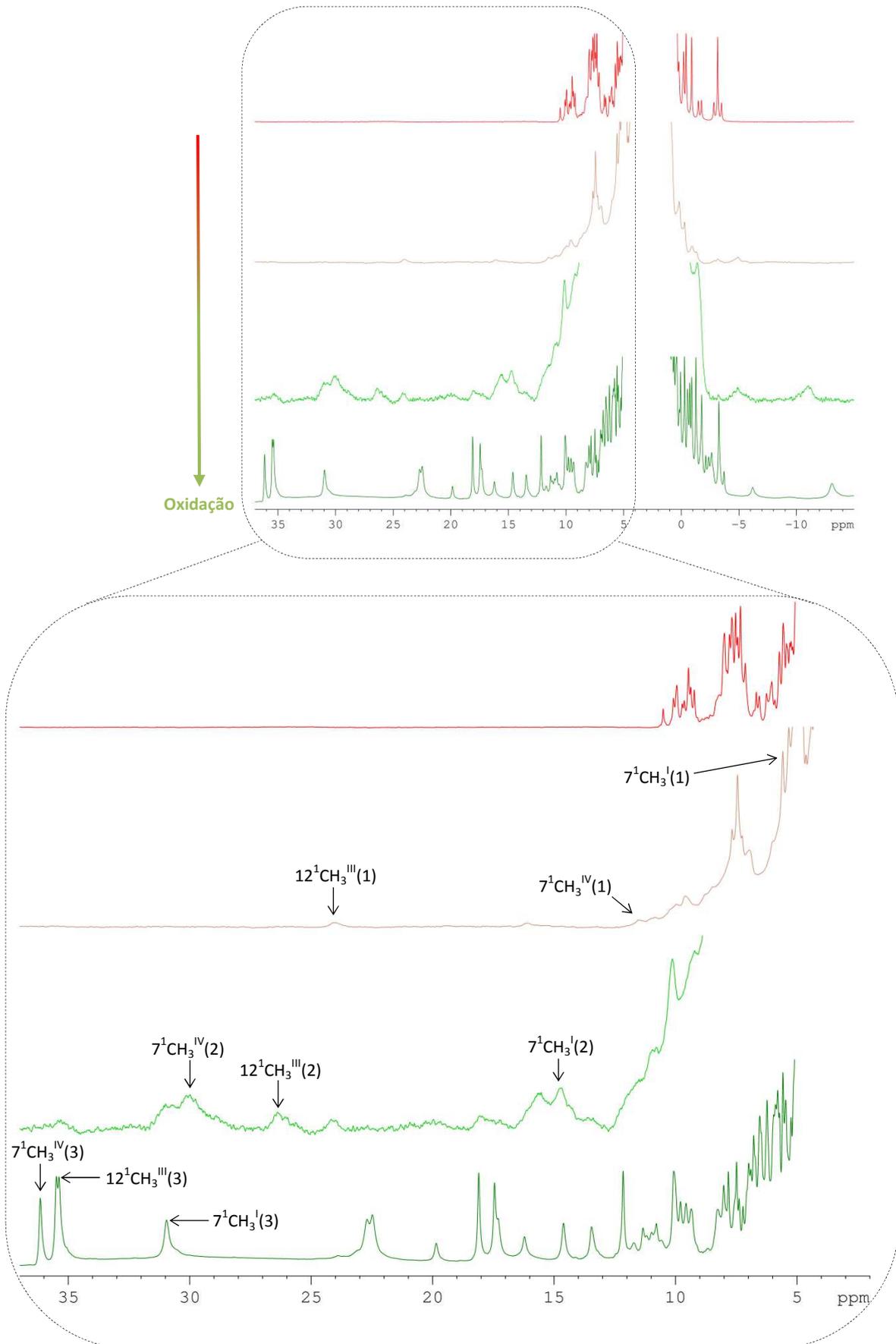
Uma situação completamente oposta à descrita para os ferrocitocromos é a que se verifica nos espectros de RMN dos ferricitocromos (estado oxidado). Em resultado das diferentes interações entre o electrão desemparelhado dos átomos de ferro dos grupos hemo e os núcleos em observação, as ressonâncias encontram-se dispersas, cobrindo janelas espectrais maiores e tornando mais difícil a definição de regiões típicas para os desvios químicos [76].

Consequentemente, atribuir as ressonâncias é também mais difícil. As exceções dizem respeito a alguns grupos metilo hémicos que são desviados para campo baixo, ou prótons dos sistemas de *spin* dos ligandos axiais desviados para campo alto (Figura 14b).



**Figura 14** – Espectros de 1D <sup>1</sup>H-RMN do domínio C na forma **a.** reduzida e **b.** oxidada, a pH 8,0 e 16°C. No espectro da forma reduzida, as setas assinalam os prótons da metionina axial do grupo hemo IV e no espectro da forma oxidada está assinalada a zona dos metilos hémicos.

Pelo descrito, os sinais dos substituintes hémicos, nomeadamente os grupos metilo, surgem em regiões completamente distintas do espectro, tanto na forma reduzida como oxidada. Assim, no caso particular em que a interconversão entre os microestados pertencentes ao mesmo estado de oxidação (permuta intramolecular) é rápida e a interconversão entre diferentes estados de oxidação (permuta intermolecular) é lenta na escala de tempo de RMN, é possível observar um conjunto separado de ressonâncias correspondentes aos prótons dos grupos metilo hémicos para cada estado de oxidação (Figuras 9 e 15).



**Figura 15** – Perfil de reoxidação do domínio C a 16°C e pH 8,0, seguido por 1D  $^1\text{H-NMR}$ . A seta indica o sentido da oxidação. A expansão (em baixo) mostra a zona do espectro correspondente a campo baixo, desde a forma completamente oxidada (espectro inferior) até à forma completamente reduzida (espectro superior). A expansão mostra as posições dos grupos metilo  $7^1\text{CH}_3^{\text{I}}$ ,  $12^1\text{CH}_3^{\text{III}}$ ,  $7^1\text{CH}_3^{\text{IV}}$  nos estados de oxidação 1, 2 e 3. Os grupos hemo I, III e IV estão representados, respectivamente, por I, III e IV.

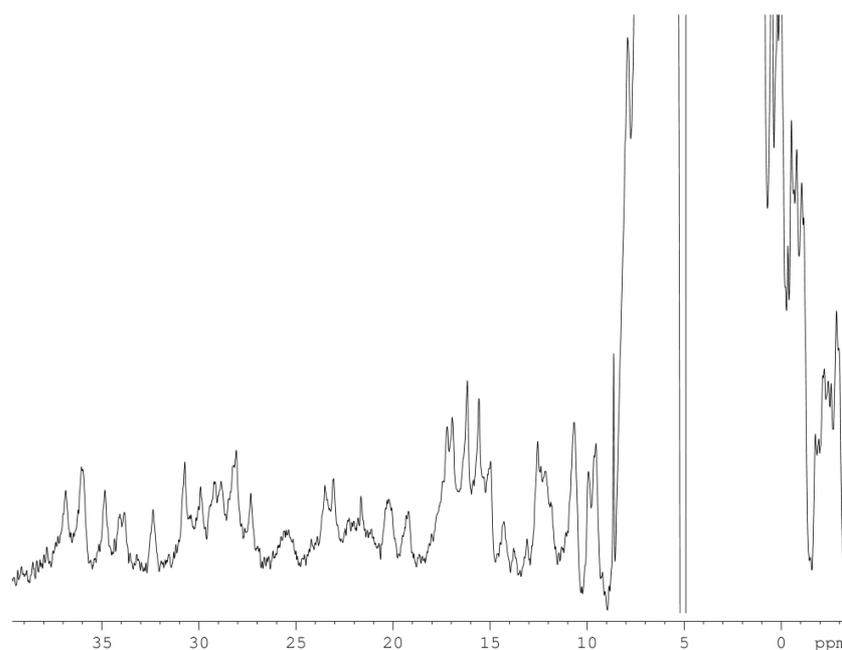
A variação dos desvios é proporcional ao grau de oxidação do grupo hemo a que esse metilo pertence e, conseqüentemente a variação dos seus desvios químicos pode ser utilizada para definir os padrões de oxidação de cada grupo hemo [60, 77, 78].

Contudo, identificar os padrões de oxidação individuais a partir da re-oxidação das proteínas por técnicas de 1D RMN é extremamente difícil, pelo que se utilizam técnicas de RMN bi-dimensionais para ultrapassar este problema. Os metilos hémicos são os mais adequados para seguir o grau de oxidação de um dado grupo hemo uma vez que, à medida que o processo de oxidação da proteína progride, as suas ressonâncias migram para regiões do espectro de RMN em que a abundância de sinais provenientes de outros protões é baixa, tornando-os mais facilmente identificáveis que aos restantes substituintes hémicos [1].

### 2.2.3 Estratégia para a caracterização funcional do GSU1996

A atribuição dos protões hémicos por RMN bi-dimensional (12 por grupo hemo), como explicado por Turner *et al.* [61], foi aplicada com sucesso a vários citocromos multi-hémicos. Nestas proteínas, os sinais dos protões são atribuídos a cada um dos protões hémicos (por exemplo, protões metilo e meso) e também a cada um dos múltiplos grupos hemo que contêm. São exemplos o ferrocitocromo  $c_3$  de *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) (13 kDa) [61], o citocromo  $c_3$  de *Shewanella frigidimarina* (11,78 kDa) [79] – aos quais foi atribuído o conjunto de 48 sinais provenientes dos seus quatro grupos hemo – e o citocromo  $c_7$  PpcA de *Gs* (9,6 kDa) [80], com o conjunto dos 36 protões identificados.

No caso do GSU1996, tem-se um total de 144 protões de doze grupos hemo para atribuir a cada um deles, numa proteína com uma massa molecular três a quatro vezes superior às proteínas previamente mencionadas. No entanto, o tamanho e elevado número de grupos hemo nesta proteína leva a uma forte diminuição na qualidade dos espectros de RMN, devido ao alargamento dos sinais adquiridos (Figura 16) e inviabiliza a aplicação directa da metodologia descrita. Do mesmo modo, os 8192 microestados em solução tornam virtualmente impossível estudá-lo com as estratégias previamente descritas. Contudo, uma vez que esta é uma proteína modular, poderá usar-se a informação recolhida através do estudo de cada um dos domínios e/ou fragmentos da proteína para viabilizar a atribuição dos sinais dos substituintes hémicos e determinação dos parâmetros termodinâmicos deste citocromo complexo. De facto, Pokkuluri *et al.* [8] utilizaram com sucesso a abordagem modular na avaliação da influência e contribuição das interacções entre domínios para a estrutura obtida por cristalografia de raios-X do GSU1996.



**Figura 16** – Espectro de 1D  $^1\text{H}$ -RMN do citocromo dodeca-hémico GSU1996 na forma oxidada, a pH 8,0 e 25°C.

Para concretizar esta abordagem no estudo do GSU1996 em solução, seguem-se então as etapas experimentais de caracterização de citocromos multi-hémicos previamente mencionadas (Figura 8), sendo efectuada uma aproximação sequencial na etapa de caracterização funcional. Deste modo, os domínios constituem a base de partida para caracterizar os fragmentos, que por sua vez constituem os alicerces necessários para a caracterização do GSU1996 (Figura 17).

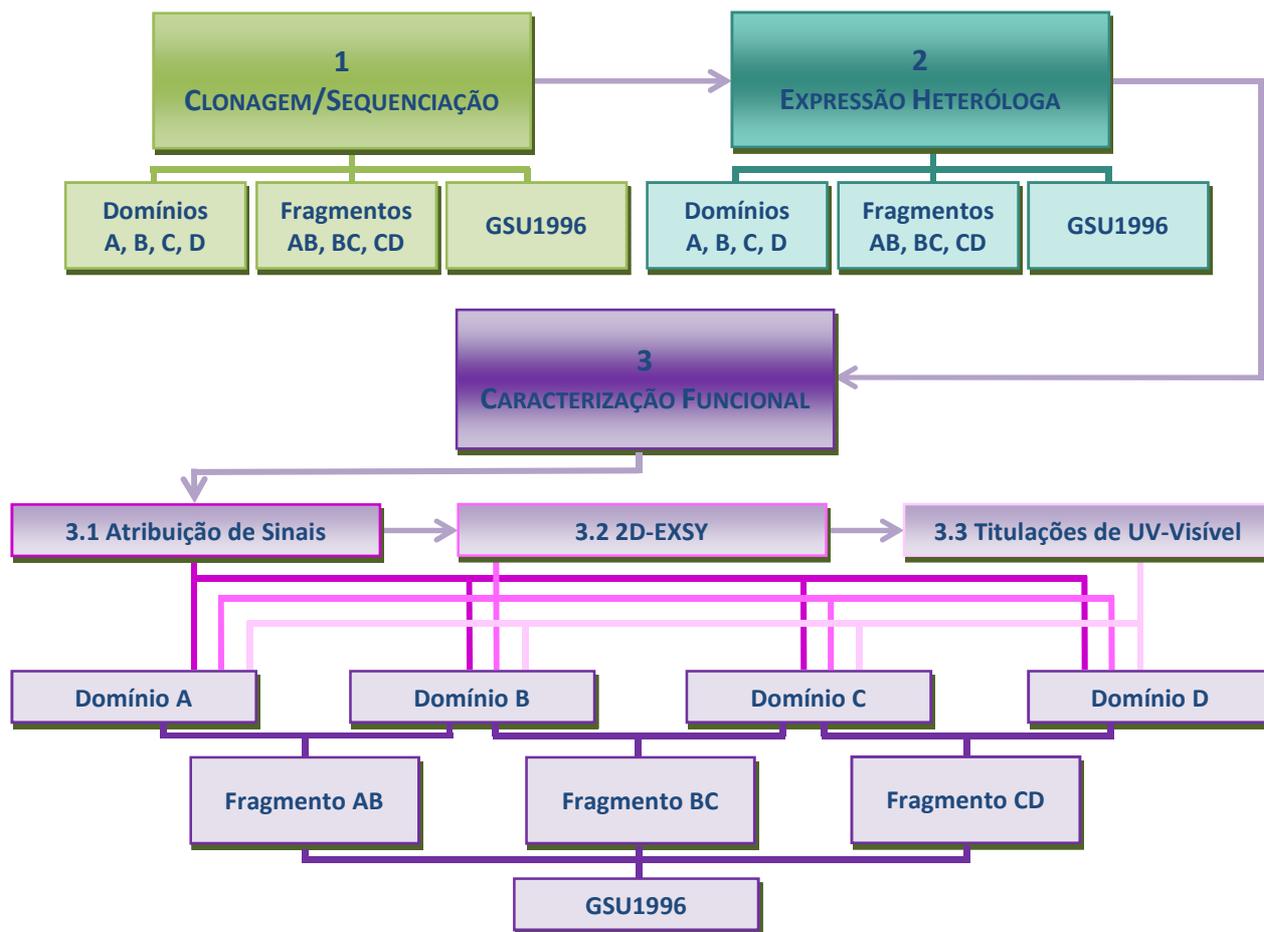
Este trabalho visou aprofundar ao máximo cada uma das etapas descritas. No entanto, no espaço temporal em que o mesmo decorreu, foi apenas possível concluir as fases que a seguir se descrevem.

## 2.3 Materiais e Métodos

### 2.3.1 Materiais e equipamentos

#### 2.3.1.1 Estirpes bacterianas

Neste trabalho utilizaram-se as estirpes de *E. coli* BL21(DE3) [81] e JCB7123 [82] co-transformadas com o plasmídeo pEC86 (com marca de resistência para o antibiótico cloranfenicol), que foram gentilmente cedidas pelo Dr. Yuri Y. Londer (Argonne National Laboratory, Chicago, EUA). Utilizaram-se também as estirpes de *E. coli* DH5 $\alpha$  (Novagen), cedida pela Dra. Isabel Couto (Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa) e Tuner(DE3) (Novagen), cedida pela Dra. Sofia Pauleta (REQUIMTE/CQFB, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa).



**Figura 17** – Etapas experimentais para a caracterização do citocromo dodeca-hémico GSU1996.

### 2.3.1.2 Plasmídeos

Para expressar cada um dos quatro domínios e o fragmento CD utilizaram-se conjuntamente o plasmídeo pEC86 [66] e o respectivo plasmídeo que codifica para cada um dos domínios e fragmento do GSU1996 (com marca de resistência para o antibiótico ampicilina) [51, 56, 57].

Todos os plasmídeos utilizados foram produzidos e disponibilizados pelo Dr. Yuri Y. Londer.

### 2.3.1.3 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados para o crescimento das estirpes de *E. coli* descrevem-se na Tabela 8. Todos os meios foram preparados com água desionizada e autoclavados durante 20 minutos a 120°C e 1,0×10<sup>5</sup> Pa de pressão.

**Tabela 8** – Composição (por litro) dos meios de cultura utilizados no crescimento das várias estirpes de *E. coli* [83].

Meio	Composição
Meio Luria Broth (LB)	10,0 g de Peptona de caseína (Fluka) 5,0 g de Extracto de levedura (HiMedia) 10,0 g de NaCl (Panreac)
Meio Luria Agar (LA)	10,0 g de Peptona de caseína (Fluka) 5,0 g de Extracto de levedura (HiMedia) 10,0 g de NaCl (Panreac) 20,0 g de Agar-agar (Nzytech)
Meio 2×YT	16,0 g de Peptona de caseína (Fluka) 10,0 g de Extracto de levedura (HiMedia) 5,0 g de NaCl (Panreac)
Meio 2×YT (sólido)	16,0 g de Peptona de caseína (Fluka) 10,0 g de Extracto de levedura (HiMedia) 5,0 g de NaCl (Panreac) 15,0 g de Agar-agar (Nzytech)

### 2.3.1.4 Tampões

Os tampões utilizados neste trabalho descrevem-se na Tabela 9. Os tampões Tris-ácido etilenodiamina tetra-acético (TE) pH 8,0 e 1,0 M Tris-HCl pH 8,0 foram autoclavados nas mesmas condições referidas para os meios de cultura. O tampão de lise foi preparado com água desionizada e autoclavada, tendo-se preparado uma solução de sacarose que foi esterilizada através de filtro de 0,22 µm de poro (Whatman) antes da sua adição a este tampão.

**Tabela 9** – Composição (por litro) dos tampões utilizados nas várias etapas experimentais [51, 56, 57, 68].

Tampão	Composição
TE pH 8,0	1,0 mM Ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA) pH 8,0 (Sigma) 0,01 M Tris-HCl pH 8,0
Tampão de lise	0,10 M pH 8,0 Tris-HCl 0,50 mM pH 8,0 EDTA 0,58 M Sacarose (Fisher Scientific)
1,0 M Tris-HCl pH 7,0	121,1 g de Tris (Nzytech)
1,0 M Tris-HCl pH 8,0	
1,0 M Tris-HCl pH 8,5	Ajustou-se ao pH desejado pela adição de HCl (Carlo Erba).
100 mM Fosfato de sódio pH 7,75	75,5 mL de 1,0 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Panreac) 24,4 mL de 1,0 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Panreac)
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	61,0 g de Tris Ajustou-se ao pH desejado pela adição de HCl.
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	182,0 g de Tris Ajustou-se ao pH desejado pela adição de HCl.
Tampão de electroforese SDS-PAGE	3,0 g de Tris 14,4 g de Glicina (Nzytech) 1,0 g Dodecilsulfato de sódio (SDS) (Fluka)
Tampão de amostra SDS-PAGE	66 mM Tris-HCl pH 6,8 2% (p/v) SDS 26% (v/v) Glicerol (Fluka) 717 mM β-mercaptoetanol (Merck) 0,01% (p/v) Azul de bromofenol (Sigma-Aldrich)

### 2.3.1.5 Outras soluções e reagentes

Outras soluções e reagentes utilizados apresentam-se na Tabela 10 e, onde adequado, ao longo da descrição do protocolo experimental. A solução de ampicilina (AMP) foi preparada com água desionizada e a solução de cloranfenicol (CLO) foi preparada com etanol absoluto (Panreac). As restantes soluções foram preparadas com água desionizada (autoclavada) e, onde necessário, foram esterilizadas através de filtro com 0,22 µm de poro.

**Tabela 10** – Outras soluções e reagentes utilizados [68].

<b>Solução</b>	
<i>Expressão e purificação</i>	
100,0 mg/mL Ampicilina (Nzytech)	
34,0 mg/mL Cloranfenicol (Nzytech)	
40,0 mg/mL IPTG (Nzytech)	
10,0 mg/mL Lisozima (Fluka)	
0,5 M EDTA pH 8,0	
<i>Electroforese SDS-PAGE</i>	
10% SDS	
10% (p/v) Persulfato de Amónia (PSA) (Riedel-de Haën)	
N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina (TEMED) (Fluka)	
30% (37,5:1) Acrilamida/bis-Acrilamida (Merck)	
Solução corante (SDS-PAGE)/L	1,0 g de Azul brilhante de Coomassie R-250 (Merck) 100 mL de Ácido acético (Sigma-Aldrich) 400 mL de Metanol (Sigma-Aldrich)
Solução descorante (SDS-PAGE)/L	100 mL de Ácido acético 400 mL de Metanol
<i>Titulações de oxidação-redução seguidas por espectroscopia de visível</i>	
Agentes redutor/oxidante	Ditionito de sódio (Merck) Ferricianeto de potássio (Merck)
Mediadores	Azul de Metileno (Alfa Aesar) Galocianina (Alfa Aesar) Índigo tetrassulfonato de potássio (Sigma-Aldrich) Índigo trissulfonato de potássio (Acros Organics) Índigo carmim (Sigma) Antraquinona-2,6-dissulfonato (Acros Organics) 2-Hidroxi-1,4-naftoquinona (Alfa Aesar) Antraquinona-2-sulfonato (Aldrich) Safranina O (Alfa Aesar) Diquat (Fluka) Benzilviologénio (Aldrich) Vermelho neutro (Fluka) Metilviologénio (Acros Organics)

### 2.3.1.6 Equipamento

O equipamento específico utilizado encontra-se essencialmente descrito na Tabela 11. Pontualmente, indicam-se ao longo da descrição do protocolo experimental outros materiais e equipamentos utilizados.

**Tabela 11** – Equipamento utilizado.

**Crescimento de culturas, expressão de proteína e isolamento da fracção periplasmática**

Estufa Nahita, 632/6  
 Agitador orbital MaxQ 4000 Thermo Scientific  
 Agitador orbital Gallenkamp  
 Espectrofotómetro UV mini 1240, Shimadzu  
 Congelador Nuair -85°C Ultralow freezer  
 Centrífuga Avanti J-26 XPI Beckman Coulter:

- rotor JA-10 Beckman
- rotor JA-14 Beckman
- rotor JA-25.50 Beckman

**Purificação, concentração e doseamento de proteínas**

Centrífuga Optima LE-80K Beckman Coulter, rotor Beckman 45Ti  
 Centrífuga 5804R Eppendorf, rotor F-34-6-38 Eppendorf  
 Centrífuga Avanti J-26 XPI Beckman Coulter, rotor JA-25.50 Beckman  
 Colunas Econo-Pac HighS BioRad  
 Coluna HiLoad 16/60 Superdex 75 GE Healthcare  
 Espectrofotómetro Ultrospec 2100pro Amersham Biosciences

**Preparação de amostras, aquisição de espectros de RMN e titulações de oxidação-redução seguidas por espectroscopia de visível**

Liofilizador Modulyo Edwards  
 Aparelho de leitura de pH micropH 2001 Crison  
 Aparelho de leitura de pH Meter GLP21 Crison  
 Eléctrodo combinado U402-M3-S7/200 Mettler Toledo  
 Eléctrodo combinado 52 Crison  
 Câmara anaeróbia Labstar, Mbraun  
 Espectrómetro Bruker Avance 600  
 Espectrofotómetro Evolution 300 Thermo Scientific

## 2.3.2 Métodos

### 2.3.2.1 Expressão heteróloga dos domínios A, B, C e D e fragmento CD do citocromo GSU1996 em *E. coli*

Uma vez que a bactéria *E. coli* não é naturalmente transformável, a capacidade para receber ácido desoxirribonucleico (DNA) externo, ou competência, tem de ser induzida. Uma forma de o realizar é através de métodos químicos, utilizando catiões divalentes ou multivalentes, como por exemplo, o cálcio [68, 84].

A *E. coli* contém um envelope celular composto por membrana externa, parede celular e membrana interna. Diversos canais ou zonas de adesão são formadas por fusão da membrana externa e da membrana interna através da parede celular. Embora o mecanismo de transformação não seja conhecido, estudos anteriores indicaram que o transporte das moléculas de DNA através da membrana será realizado por estes canais [85, 86]. Contudo, as cargas negativas do DNA são repelidas pelas regiões negativamente carregadas das macromoléculas que se encontram na superfície exterior da bactéria. Assim, a adição de cloreto de cálcio tem por

objectivo a neutralização das interacções desfavoráveis entre o DNA e os polianiões da superfície exterior [84].

Posteriormente, durante a transformação, o DNA e as células competentes são incubadas em gelo para estabilizar a membrana lipídica, permitindo este passo o aumento das interacções entre os iões de cálcio e os componentes negativos da célula. A mistura reaccional é depois exposta a um curto período de aquecimento, que leva à alteração do estado de fluidez semi-cristalino previamente atingido pela membrana à temperatura de 4°C, permitindo assim a entrada da molécula de DNA na célula através da zona de adesão.

O protocolo de expressão heteróloga utilizado baseou-se nos protocolos descritos na literatura [51, 56, 57].

#### 2.3.2.1.1 Crescimento e manutenção de culturas de *E. coli*

As culturas de *E. coli* foram mantidas em placas de meio LA ou 2xYT (sólido) contendo os antibióticos apropriados quando necessário. Assim, culturas de *E. coli* com o plasmídeo pEC86 foram mantidas em meio com 68 µg/mL de CLO; culturas com os plasmídeos codificantes para os citocromos foram mantidas em meio com 200 µg/mL de AMP e as culturas contendo, simultaneamente, o plasmídeo pEC86 e os plasmídeos com os genes dos citocromos em estudo foram mantidas em meio com 68 µg/mL de CLO mais 200 µg/mL de AMP.

Todas as culturas foram preparadas por incubação a 37°C com agitação durante a noite, excepto se referido o contrário.

Para a preparação de *stocks*, cresceram-se culturas em meio LB contendo os antibióticos apropriados. No dia seguinte, alíquotas de 500 µL suplementadas com glicerol (para uma concentração final de 20% neste composto) foram armazenadas a -80°C.

#### 2.3.2.1.2 Preparação de plasmídeos

O plasmídeo pEC86 e cada um dos plasmídeos com os genes dos citocromos em estudo (domínios A, B, C e D e fragmento CD) foram armazenados em *E. coli* DH5α. Assim, para realizar a expressão das proteínas estudadas neste trabalho foi necessário proceder à preparação de plasmídeos puros a partir dos *stocks* de células, utilizando-se para o efeito o conjunto NZYMiniprep (Nzytech), cujo protocolo se resume de seguida. Foram crescidas culturas durante a noite em meio LB contendo 200 µg/mL AMP, a 30°C e 220 rpm. No dia seguinte, foram recolhidas as células por centrifugação a 5000×g durante 20 minutos. Procedeu-se à lise celular com o tampão de lise fornecido pelo fabricante e, de seguida, centrifugou-se a mistura a 11000×g durante 15 minutos. O sobrenadante foi colocado numa coluna à base de sílica gel, onde o DNA

plasmídico foi selectivamente adsorvido. Após lavagem de contaminantes não adsorvidos e secagem das colunas por dois passos de centrifugação a 11000×g durante 1 minuto, foram eluídos os plasmídeos puros em tampão TE por idêntico passo de centrifugação. O protocolo foi executado à temperatura ambiente, sendo os reagentes e colunas utilizados nos diferentes passos parte integrante do conjunto usado.

Para confirmação da presença dos genes codificantes para as proteínas em estudo, recorreu-se à sequenciação das duas cadeias pelo método de Sanger, efectuada pela empresa Stabvida. Utilizaram-se os *primers* 5'-GGCTCGTATGTTGTGTGGAA (*forward*) e 5'-AAGGGAAGAAAGCGAAAGGA (*reverse*). Os reagentes habitualmente usados pela empresa são da Applied Biosystems, sendo utilizado o conjunto BigDye® Terminator 3 na sequenciação. A reacção de sequenciação foi purificada por cromatografia de filtração em gel e resolvida num sequenciador ABI 3730XL (Applied Biosystems).

Os plasmídeos foram posteriormente doseados com recurso a um espectrómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) e respectivo programa para quantificação de ácidos nucleicos, que se baseia na absorvância a 260 nm e na aplicação da lei de Beer-Lambert. Os plasmídeos foram armazenados a -20°C.

#### 2.3.2.1.3 Preparação de células competentes (Método do cloreto de cálcio)

A preparação de células competentes de *E. coli* foi realizada em três dias consecutivos. No primeiro dia, plaquearam-se as estirpes de *E. coli* em placas de meio LA ou, para as estirpes contendo o plasmídeo pEC86, LA suplementado com 68 µg/mL CLO. Placas adicionais contendo 68 µg/mL CLO mais 200 µg/mL AMP foram utilizadas para controlo de presença do plasmídeo correcto. Foram também realizados controlos de esterilidade do meio e das soluções de antibiótico, incubando duas placas não inoculadas contendo no meio apenas CLO ou CLO mais AMP. Incubaram-se todas as placas durante a noite na estufa a 37°C.

No segundo dia, fizeram-se pré-inóculos em meio 2×YT (suplementado com 68 µg/mL CLO para estirpes com pEC86), cada com uma colónia da respectiva estirpe de *E. coli* e incubaram-se as culturas durante a noite a 37°C com agitação de 220 rpm.

No terceiro dia, inocularam-se *erlenmeyers* contendo 50 mL de meio 2×YT com 500 µL das culturas de *E. coli* crescidas durante a noite e incubaram-se a 37°C, 220 rpm em agitador orbital até se atingir uma densidade óptica a 600 nm de aproximadamente 0,6 (cerca de 3 horas, independentemente da estirpe).

As células foram recolhidas através de centrifugação a 5000×g durante 20 minutos e à temperatura de 4°C.

Os sedimentos foram ressuspensos em 0,1 M CaCl<sub>2</sub> pré-arrefecido em gelo (10 mL por cada 50 mL de cultura original) e colocados em gelo durante 1 hora.

Centrifugaram-se novamente a 5000×g durante 10 minutos, 4°C e ressuspenderam-se os sedimentos em 4 mL de 0,1 M CaCl<sub>2</sub>.

Adicionou-se glicerol pré-arrefecido para uma concentração final de 20% e armazenaram-se as células competentes em alíquotas de 500 µL a -80°C.

#### 2.3.2.1.4 Transformação das estirpes de *E. coli* com os plasmídeos de interesse

A 50 µL de células competentes, descongeladas e mantidas em gelo, adicionou-se 0,5 µL de plasmídeo e incubou-se em gelo durante 30 minutos. De seguida, a preparação foi colocada num banho-maria a 42°C durante 1 minuto e depois novamente em gelo durante o mesmo tempo.

Adicionaram-se 500 µL de meio 2×YT às células e incubou-se durante 1 hora a 30°C, 250 rpm.

As células foram plaqueadas em meio 2×YT suplementado com 68 µg/mL CLO (estirpes transformadas com pEC86) ou 68 µg/mL CLO mais 200 µg/mL AMP (estirpes transformadas com os plasmídeos codificantes para os citocromos de interesse) e incubadas a 37°C durante a noite.

Como controlos, utilizaram-se placas suplementadas com CLO e CLO mais AMP (para controlo de esterilidade de meio e antibióticos) e, conforme o caso, placas preparadas da seguinte forma:

- a) *E. coli*: 2×YT (controlo de viabilidade de células competentes)
- b) *E. coli*: 2×YT com CLO (controlo de eficácia de antibióticos)
- c) *E. coli*: 2×YT com AMP (controlo de eficácia de antibióticos)

ou

- a) *E. coli* com pEC86: 2×YT com CLO (controlo de presença de pEC86/viabilidade de células competentes)
- b) *E. coli* com pEC86: 2×YT com CLO mais AMP (controlo de eficácia de antibióticos)

Os domínios A e B foram expressos com as estirpes de *E. coli* JCB7123, BL21(DE3) e Tuner(DE3) com vista a determinar qual a estirpe mais indicada para otimizar a expressão. Para expressão dos domínios C e D e do fragmento CD utilizou-se a estirpe de *E. coli* JCB7123. Todas as estirpes indicadas continham já o plasmídeo pEC86.

As células transformadas apenas com o plasmídeo pEC86 foram utilizadas na preparação de células competentes, seguindo-se transformação com os plasmídeos codificantes para os

citocromos; as células co-transformadas com ambos seguiram os processos de crescimento/multiplicação celular e expressão proteica descritos a seguir.

#### 2.3.2.1.5 Crescimento de transformantes e expressão de proteína

O crescimento de células de *E. coli* contendo ambos os plasmídeos e a indução da expressão de proteína foram realizados em dois dias consecutivos.

No primeiro dia, seleccionaram-se colónias de transformantes das placas de Petri de véspera e realizou-se um pré-inóculo em meio 2×YT suplementado com 68 µg/mL CLO mais 200 µg/mL AMP. As culturas foram incubadas durante a noite a 30°C com agitação de 220 rpm.

No segundo dia, inocularam-se 10 mL de cultura por cada litro de meio 2×YT suplementado com 68 µg/mL CLO mais 200 µg/mL AMP e incubou-se a 30°C, 180 rpm.

Após cerca de 9 horas em incubação induziu-se a expressão das proteínas através da adição de IPTG à cultura, que ficou durante a noite nas mesmas condições.

Para indução da expressão dos domínios C e D e do fragmento CD utilizou-se uma concentração final de 10 µM de IPTG. Para indução da expressão dos domínios A e B, testaram-se concentrações de 10, 50 e 100 µM de IPTG em cada uma das estirpes.

#### 2.3.2.1.6 Isolamento da fracção periplasmática

As culturas crescidas e induzidas durante a noite foram centrifugadas a 6400×g durante 20 minutos à temperatura de 4°C para recolha das células.

Para provocar a lise da parede celular das bactérias, ressuspendeu-se o sedimento em 30 mL de tampão de lise contendo 0,5 mg/mL de lisozima por litro de cultura original e incubou-se à temperatura ambiente durante cerca de 15 minutos.

Esta enzima hidrolisa ligações  $\beta(1\rightarrow4)$  entre resíduos de ácido N-acetil-murâmico e N-acetil-glucosamina de peptidoglicano presente na parede celular [87]. As células Gram-positivas são mais susceptíveis à lisozima, dado as suas paredes terem uma maior proporção de peptidoglicano que as bactérias Gram-negativas (como *E. coli*) devido à presença de uma membrana externa e uma menor proporção de peptidoglicano. No entanto, estas últimas podem ser mais facilmente hidrolisadas na presença de EDTA, que funciona como quelante dos iões metálicos na membrana externa [88].

De seguida, adicionou-se igual volume de água gelada e incubaram-se os tubos em gelo com leve agitação durante 15 minutos.

Centrifugou-se o lisado a 14700×g, a 4°C durante 20 minutos e recolheu-se o sobrenadante (correspondente à fracção periplasmática), que se armazenou no frigorífico, a 4°C.

### 2.3.2.2 Purificação, concentração e doseamento das proteínas

As proteínas em estudo são extremamente básicas, apresentando elevados pontos isoelétricos (pI; ver Tabela 4 na secção 1.2.1.1.1). Assim, o primeiro passo de purificação passou pela realização de uma cromatografia com um permutador de catiões, previamente equilibrado a pH elevado para possibilitar a adsorção das proteínas de interesse. O isolamento da fracção periplasmática (por choque osmótico com 0,5 M sacarose) descrito anteriormente, funcionou também como uma forma de enriquecer a mistura no citocromo pretendido e minimizar a contaminação com proteínas básicas que pudessem estar ligadas ao DNA.

O segundo passo de purificação correspondeu a uma cromatografia de filtração em gel, com o objectivo de separar contaminantes com massa molecular suficientemente diferente das proteínas em estudo que possam ter permanecido após a cromatografia de troca iónica. A pureza final da proteína foi avaliada por electroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). Neste tipo de electroforese, as proteínas migram através dos poros do gel de poliacrilamida em resposta a um campo eléctrico aplicado. O tratamento com SDS em presença de agentes redutores (como  $\beta$ -mercaptoetanol ou ditioneitol), promove o *unfolding* das cadeias polipeptídicas, originando uma estrutura em forma de bastonete cujo núcleo polipeptídico está coberto por moléculas de SDS. Este detergente confere carga negativa e igual densidade de carga a todas as proteínas, o que permite que migrem através da matriz do gel em direcção do ânodo e faz com que a separação seja realizada apenas com base na sua massa molecular. Assim, proteínas com menor massa molecular migram mais facilmente através da rede de poliacrilamida, apresentando maior mobilidade que proteínas de maior massa. O tamanho dos poros do gel diminui com o aumento da percentagem de acrilamida, pelo que géis com maior percentagem deste composto (cerca de 15%) utilizam-se para separar compostos de baixa massa molecular, enquanto géis com menor percentagem (cerca de 7%) se utilizam para separar compostos de elevada massa molecular. Depois de separadas em gel, as proteínas podem ser visualizadas por coloração do gel com uma solução corante de Coomassie. Esta técnica permite obter informação sobre a pureza e o tamanho da proteína recombinante produzida e purificada [89, 90].

#### 2.3.2.2.1 Purificação

As fracções periplasmáticas foram ultracentrifugadas durante 90 minutos a 22500×g e 4°C. Foram seguidamente concentradas por ultrafiltração utilizando Amicons Ultra-15 (Millipore) com 3 kDa (para os domínios) ou 10 kDa (para o fragmento) de limite de exclusão. Estas fracções foram

depois dialisadas duas vezes em tampão adequado (Tabela 12) e, posteriormente, centrifugadas durante 30 minutos a 9800×g.

**Tabela 12** – Tampões utilizados nos passos de purificação dos citocromos em estudo.

Proteína	Tampão de diálise	Tampões de cromatografia	
		Troca iónica	Filtração em gel
Domínios A B C D	20 mM Tris-HCl pH 8,5	20 mM Tris-HCl pH 8,5	
		10 mM Tris-HCl pH 7,0	20 mM Fosfato de sódio pH 7,75 com 100 mM NaCl
	20 mM Fosfato de sódio pH 5,9	10 mM Tris-HCl pH 7,0	
		20 mM Fosfato de sódio pH 5,9	
Fragmento CD	20 mM Fosfato de sódio pH 5,9	20 mM Fosfato de sódio pH 5,9	

O sistema para cromatografia de troca iónica utilizado continha duas pequenas colunas catiónicas de 5 mL ligadas em série e conectadas a um sistema ÄKTA prime plus (Amersham Biosciences), que permitiu a monitorização da absorvância a 280 nm. As colunas foram previamente equilibradas com tampão adequado (Tabela 12). Após introdução e adsorção da amostra, as colunas foram novamente lavadas com o mesmo tampão para remoção das proteínas não ligadas à coluna nestas condições experimentais. Em seguida, foi aplicado um gradiente contínuo de força iónica entre 0 e 300 mM (domínios C, D e fragmento CD) ou 500 mM (domínios A e B) de NaCl e recolhidas fracções de 1 mL. Nos testes de optimização, à primeira fracção periplasmática com domínio A a ser purificada (recolhida de *E. coli* JCB7123 induzida com 50 µM) foi aplicado um gradiente entre 0 e 300 mM. Posteriormente, todas as fracções foram purificadas com gradiente entre 0 e 500 mM. Durante toda a operação manteve-se um fluxo constante de 1,0 mL/min.

As fracções correspondentes a cada um dos picos de absorção no cromatograma com conteúdo em citocromos c (coloração rosa-avermelhada) foram avaliadas por electroforese SDS-PAGE (Tabela 13), para decidir quais iriam prosseguir para o segundo passo de purificação. As amostras foram diluídas numa proporção de 1:2 em tampão de amostra e aquecidas a 95°C durante 4 minutos previamente à sua introdução no gel. Usaram-se os padrões Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (2-250 kDa, Bio-Rad) ou Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa, New England Biolabs). A electroforese foi realizada a 150 mV em sistema de tampão descontínuo (tampão do gel de concentração e da amostra a pH 6,8, tampão do gel de separação a pH 8,8 e tampão de electroforese a pH 8,3). Os géis foram depois corados com uma solução de azul brilhante de Coomassie.

**Tabela 13** – Composição dos géis utilizados na electroforese SDS-PAGE.

Solução	Volume (mL de solução/10 mL de gel)	
	Gel de concentração 5%	Gel de resolução 15%
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,500	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	2,500
30 % Acrilamida-bisacrilamida	1,700	5,000
10% SDS	0,100	0,100
Água desionizada	5,640	2,345
10% PSA	0,050	0,050
TEMED	0,010	0,005

As fracções para posterior purificação foram concentradas por ultrafiltração em Amicons Ultra-4, 3kDa de limite de exclusão (Millipore) e colocadas em tampão adequado (Tabela 12). O tampão para cada proteína foi escolhido após testes de solubilidade numa gama de concentrações e pH de Tris-HCl e Fosfato de sódio. Estas operações foram realizadas através de vários ciclos de centrifugação de 15 minutos a 5500×g, à temperatura de 4°C.

A amostra foi centrifugada durante 20 minutos a 15000×g e o sobrenadante seguiu para o passo de cromatografia de filtração em gel. Esta foi realizada com um fluxo constante de 0,5 mL/min numa coluna HiLoad 16/60 Superdex 75 (GE Healthcare), que possui intervalo de fraccionamento entre 3 – 70 kDa.

A pureza das amostras foi avaliada por electroforese em gel de SDS-PAGE como descrito acima.

#### 2.3.2.2.2 Concentração das amostras e mudança de solvente

As amostras foram concentradas por ultrafiltração como descrito no passo anterior e o tampão foi permutado com uma solução de 20 mM NaCl em água destilada.

#### 2.3.2.2.3 Doseamento

As proteínas purificadas foram quantificadas pelo método do ácido bicinónico (BCA) [91], utilizando-se para o efeito o sistema Pierce® *BCA protein assay kit* (Thermo Scientific) e o citocromo PpcA [67] como padrão. Este método baseia-se na capacidade de redução do ião  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ , em meio alcalino, pelas proteínas (reação do biureto) e na detecção colorimétrica do ião  $\text{Cu}^+$  através de um reagente que contém BCA. O produto formado, de coloração púrpura e cuja intensidade é proporcional à concentração, é detectado por espectrofotometria de UV-visível a 562 nm. A gama de concentrações abrangida encontra-se dentro do intervalo de 20 a 2000  $\mu\text{g/mL}$ . Para a leitura das absorvâncias foram usadas *cuvettes* de quartzo com 1 cm de percurso óptico (Hellma).

### 2.3.2.3 Preparação de amostras para RMN

Para os estudos de RMN, de forma a reduzir o sinal proveniente das moléculas de água e permutar os prótons lábeis, as amostras concentradas como descrito na secção 2.3.2.2.2, foram liofilizadas. Imediatamente antes de serem colocadas no tubo de RMN, as amostras liofilizadas foram ressuspensas em água deuterada ( $^2\text{H}_2\text{O}$ , 99,9% em  $^2\text{H}$ ; Cambridge Isotope Laboratories) e novamente liofilizadas, sendo este processo repetido duas vezes. A concentração de proteína utilizada nestes estudos variou entre 70  $\mu\text{M}$  (estudos de termodinâmica) e 300  $\mu\text{M}$  (atribuição de sinais aos substituintes hémicos) para um volume final de 550  $\mu\text{L}$  e 250  $\mu\text{L}$  em tampão 80 mM Fosfato de sódio (NaPi) preparado em  $^2\text{H}_2\text{O}$  (99,9% em  $^2\text{H}$ ), ao qual foi adicionado NaCl para perfazer uma força iónica final de 250 mM.

Os valores de pH referidos ao longo deste trabalho são obtidos directamente do aparelho de leitura de pH sem correcção para o efeito isotópico do deutério [92]. A leitura do valor do pH foi efectuada com um eléctrodo combinado. O valor de pH pretendido em cada experiência foi ajustado com uma solução a 40% de hidróxido de sódio deuterado ( $\text{NaO}^2\text{H}$ , 99% em  $^2\text{H}$  da Sigma) e/ou com uma solução a 35% de ácido clorídrico deuterado ( $^2\text{HCl}$ , 99% em  $^2\text{H}$  da Sigma) preparadas em  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

#### 2.3.2.3.1 Preparação de amostras reduzidas

Devido aos baixos potenciais de redução apresentados pelos citocromos utilizados, a sua redução completa só é conseguida por meio de agentes redutores de baixo potencial redox, como por exemplo o ditionito de sódio, cujo potencial de redução é de -500 mV a pH 7,0 [93], ou através de adição de hidrogenase na presença de  $\text{H}_2$  (gás) [93, 94].

Deste modo, após a introdução da amostra, o tubo de RMN foi vedado com um septo de borracha fixo com Parafilm M (American National Can). A redução das amostras foi efectuada sob uma atmosfera de hidrogénio gasoso (U, L'Air Liquide) na presença de hidrogenase de *Desulfovibrio gigas*. A redução da amostra pôde ser visualizada numa primeira análise por uma mudança da cor da solução (de vermelho para cor de rosa) e numa análise subsequente pelo traçado de um espectro de 1D RMN (características similares às da Figura 14).

#### 2.3.2.3.2 Preparação de amostras parcialmente reduzidas

As amostras parcialmente reduzidas foram obtidas a partir de amostras totalmente reduzidas. As amostras reduzidas foram desarejadas com árgon (N46, L'Air Liquide) e, em seguida, cuidadosamente oxidadas com a adição de pequenas quantidades de ar (entre 3 a 5  $\mu\text{L}$ ). Este

processo foi realizado da seguinte forma: o ar foi introduzido nos tubos de RMN através do septo de borracha com o auxílio de uma seringa Hamilton. O grau de oxidação da amostra foi seguidamente avaliado por 1D RMN. Entre cada adição, o tubo de RMN foi agitado e permaneceu em repouso durante alguns minutos antes de se efectuar o espectro de 1D RMN, para estabilização da amostra de proteína.

#### 2.3.2.4 Condições de aquisição e de processamento dos espectros de RMN

Todas as experiências de RMN foram realizadas num espectrómetro a operar a 600,13 MHz para protão, com uma crio-sonda Bruker. Foram usados tubos de RMN de 3 (Wilmad) ou 5 (Norell) mm de diâmetro, respectivamente, nos estudos para atribuição de sinais e de termodinâmica. A temperatura de cada experiência foi controlada através de uma unidade de controlo de temperatura BVT 3000 (Bruker). A calibração da temperatura foi efectuada por intermédio da análise da diferença entre os desvios químicos dos protões dos grupos CH<sub>3</sub> e OH do metanol no interior de um tubo selado [95, 96].

Os desvios químicos do protão foram calibrados usando o sinal residual da água como referência [97].

Os espectros 1D RMN foram adquiridos com 32768 pontos, usando uma largura espectral de 30 kHz e impulsos de 13  $\mu$ s, com pré-saturação da frequência correspondente ao sinal da água durante 1 s.

Os espectros de RMN 2D <sup>1</sup>H-TOCSY e 2D <sup>1</sup>H-NOESY das amostras completamente reduzidas foram adquiridos com tempos de mistura entre 40 – 60 ms e 50 – 400 ms, respectivamente, com uma largura espectral de 8,4 kHz nas duas dimensões e com 512(*t*<sub>1</sub>) x 2048(*t*<sub>2</sub>) pontos.

Os perfis de reoxidação (a pH 8,0) de cada grupo hemo dos domínios A e D foram seguidos por 2D <sup>1</sup>H-NOESY com um tempo de mistura de 25 ms. Os espectros foram adquiridos com uma largura espectral de 30 kHz nas duas dimensões com 256(*t*<sub>1</sub>) x 2048(*t*<sub>2</sub>) pontos.

Todos os espectros de RMN foram processados com o programa TopSpin™ (Bruker Biospin) e analisados através do programa Sparky (T. D. Goddard e D. G. Kneller, SPARKY 3, University of California, San Francisco).

#### 2.3.2.5 Cálculo da contribuição da corrente de anel nos desvios químicos dos substituintes hémicos

As contribuições das correntes de anel (rcs) devidas aos grupos hemo e aminoácidos aromáticos para o desvio químico observado de cada substituinte hémico, foram calculadas pelo Prof. David Turner (Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa) a

partir das estruturas obtidas por cristalografia de raios-X para o domínio C, para os fragmentos AB e CD e para o GSU1996, seguindo a metodologia descrita em Turner *et al.* [61] e Messias *et al.* [98]. Os desvios químicos dos substituintes hémicos foram depois calculados pela diferença entre os desvios químicos dos prótons dos substituintes hémicos na ausência de rcs (Tabela 14) e os valores de rcs calculados, como descrito por Pessanha *et al.* [69].

**Tabela 14** – Desvios químicos de referência aplicados aos substituintes do grupo hemo (na ausência de rcs).

		Substituinte hémico	$\delta$ /ppm
Meso		5H	9,36
		10H	
		15H	
		20H	
Metilo		$2^1\text{CH}_3$	3,48
		$7^1\text{CH}_3$	
		$12^1\text{CH}_3$	
		$18^1\text{CH}_3$	
Pontes tioéter	Metino	$3^1\text{H}$	6,13
		$8^1\text{H}$	
	Metilo	$3^2\text{CH}_3$	2,12
		$8^2\text{CH}_3$	

### 2.3.2.6 Titulações de oxidação-redução seguidas por espectroscopia de visível

As titulações foram realizadas numa câmara anaeróbia sob atmosfera de argón, usando-se um espectrofotómetro equipado com fibras ópticas ligadas ao suporte da *cuvette* no interior da câmara. O suporte da *cuvette* foi adaptado de forma a incorporar uma placa de agitação magnética para permitir a agitação da amostra e a temperatura foi mantida a 16°C através de um banho externo com circulação através do suporte.

O potencial das soluções foi medido com um eléctrodo combinado, calibrado antes de cada titulação com soluções saturadas de quinidrona a pH 7,0 e 4,0 (preparadas de fresco), sendo a calibração novamente confirmada no final.

Utilizaram-se 4 mL de soluções de 10  $\mu\text{M}$  de domínio A em 80 mM NaPi pH 8,0, com NaCl para perfazer uma força iónica final de 250 mM. As titulações foram realizadas como descrito anteriormente [51, 99, 100], com adição de 2  $\mu\text{M}$  de uma mistura de mediadores de oxidação-redução à amostra de proteína (ver Tabela 10 na secção 2.3.1.5).

Para verificar possível ocorrência de histerése, as titulações foram efectuadas em ambas as direcções (redução e oxidação), usando ditionito de sódio como agente redutor e ferricianeto de potássio como agente oxidante. Assim, cada titulação consistiu na adição de uma alíquota (1 a 2

$\mu\text{L}$ ) de uma solução de ditonito de sódio (25 mM ou, durante a fase de maior variação, 12,5 mM) ou de ferricianeto de potássio (17,4 mM ou, durante a fase de maior variação, 8,7 mM). Entre cada adição permitiu-se a estabilização da amostra, sendo depois medido o respectivo potencial e traçado o espectro de visível correspondente entre 300 e 800 nm. Foram realizadas várias titulações até à redução/oxidação total da amostra de proteína.

A fracção reduzida de domínio A foi determinada usando a banda  $\alpha$  (a 551 nm) pelo método descrito na literatura [99, 100]. Resumidamente, as fracções reduzidas foram determinadas através da integração da área correspondente à banda  $\alpha$  entre os pontos isobésticos respectivos. Desta forma, a contribuição óptica dos mediadores foi subtraída pela medição da altura do pico da banda  $\alpha$  em relação à linha recta que liga os seus dois pontos isobésticos. Os valores de potencial medidos experimentalmente foram corrigidos tendo em conta a calibração feita para o eléctrodo a 16°C e o valor do potencial do eléctrodo de platina relativamente ao eléctrodo padrão de hidrogénio (214 mV). O ajuste dos dados experimentais foi efectuado através da equação:

$$f_{\text{reduzida}} = \frac{3+2e^{\left[\frac{(E-E_1^0)F}{RT}\right]}+e^{\left[\frac{(2E-E_1^0-E_3^0)F}{RT}\right]}}{3\left(1+e^{\left[\frac{(E-E_1^0)F}{RT}\right]}+e^{\left[\frac{(2E-E_1^0-E_3^0)F}{RT}\right]}+e^{\left[\frac{(3E-E_1^0-E_3^0-E_4^0)F}{RT}\right]}\right)} \quad \text{Equação 4}$$

cuja dedução se encontra no Anexo 1. Na equação acima,  $E$ ,  $E_1^0$ ,  $E_2^0$  e  $E_3^0$  representam, respectivamente, o potencial medido experimentalmente e o potencial padrão entre cada estado de oxidação (ver Figura 9 na secção 2.2.1);  $F$  representa a constante de Faraday;  $T$ , a temperatura;  $R$ , a constante dos gases ideais e  $n$ , o número de electrões.

Os valores dos potenciais de redução padrão ( $E^0$ ) foram determinados pelo ajuste da Equação 4 aos dados experimentais, utilizando a ferramenta *Solver* do *software* Microsoft Excel (Microsoft. Microsoft Excel. Redmond, Washington: Microsoft, 2010. Computer Software) e considerando  $n = 1$ ,  $F = 96500 \text{ Cmol}^{-1}$ ,  $R = 8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$  e  $T = 289,15 \text{ K}$ .



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Sequenciação, expressão heteróloga e purificação dos domínios A, B, C e D e fragmento CD do citocromo GSU1996

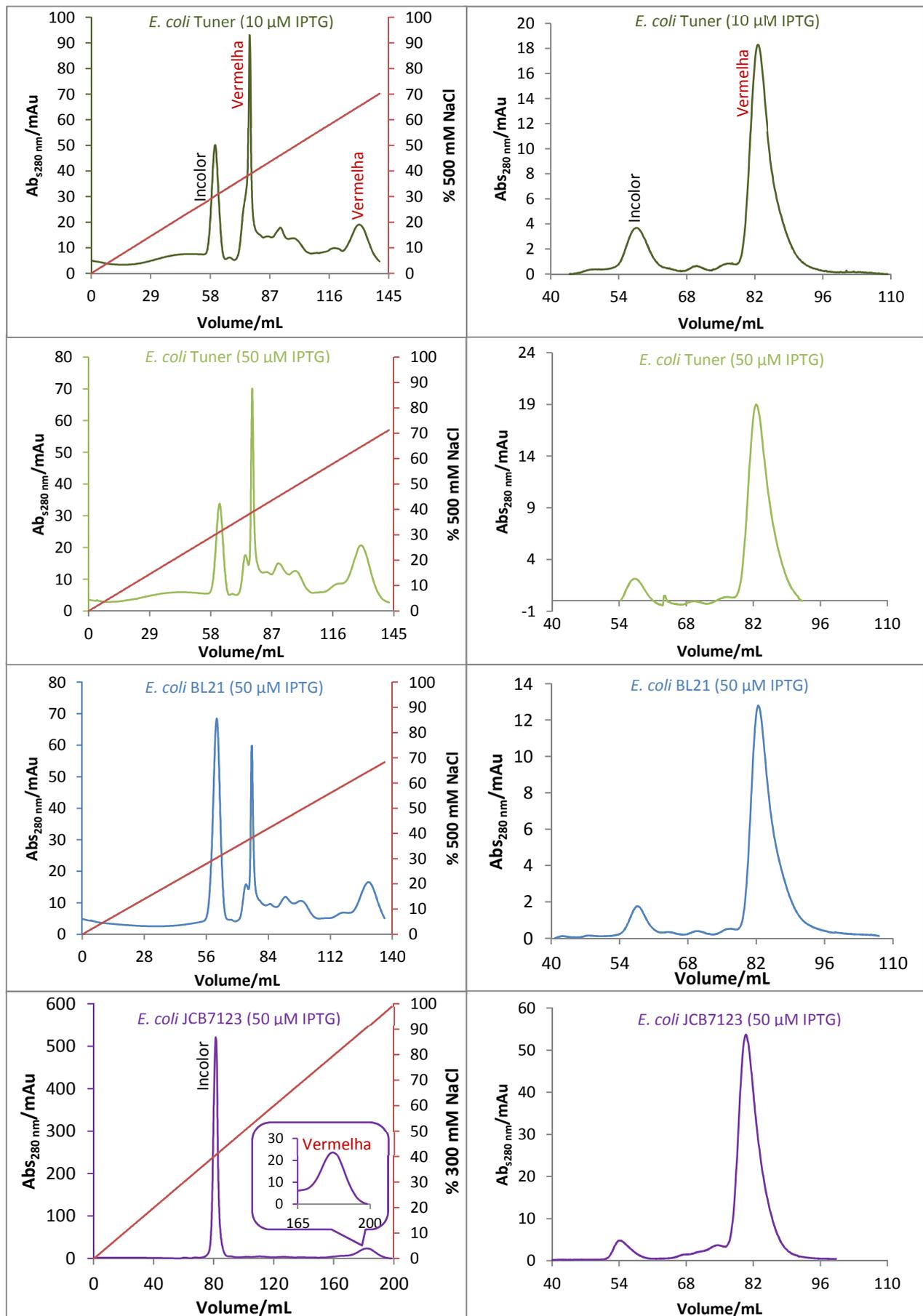
Após a confirmação da presença dos genes codificantes para os citocromos em estudo nos respectivos plasmídeos, como descrito no ponto 2.3.2.1.2, foi realizada a expressão heteróloga das proteínas.

Relativamente à expressão dos domínios A e B, foram efectuadas tentativas de optimização do processo em culturas de *E. coli* com 1 L de volume cada. Em ambos os casos, foram realizados testes de expressão nas estirpes de *E. coli* disponíveis no laboratório, nomeadamente, em BL21 (DE3), Tuner (DE3) e JCB7123 co-transformadas com o plasmídeo pEC86. A indução foi feita com concentrações de IPTG de 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  para cada estirpe utilizada.

As fracções periplasmáticas isoladas só foram purificadas nos casos em que foi observável coloração rosa/avermelhada, característica da presença de citocromos de tipo *c* em solução. Assim, nos testes de expressão do domínio A apenas foram purificadas as fracções recolhidas de *E. coli* Tuner (DE3), induzida com 10 e 50  $\mu\text{M}$  e BL21 (DE3) e JCB7123 induzidas com 50  $\mu\text{M}$  de IPTG. Em relação ao domínio B, purificaram-se as fracções periplasmáticas de *E. coli* Tuner (DE3) induzida com 50  $\mu\text{M}$  e BL21 (DE3) e JCB7123, ambas induzidas com 10 e 50  $\mu\text{M}$  de IPTG. Para a última estirpe, apenas foi realizado o passo de troca iónica.

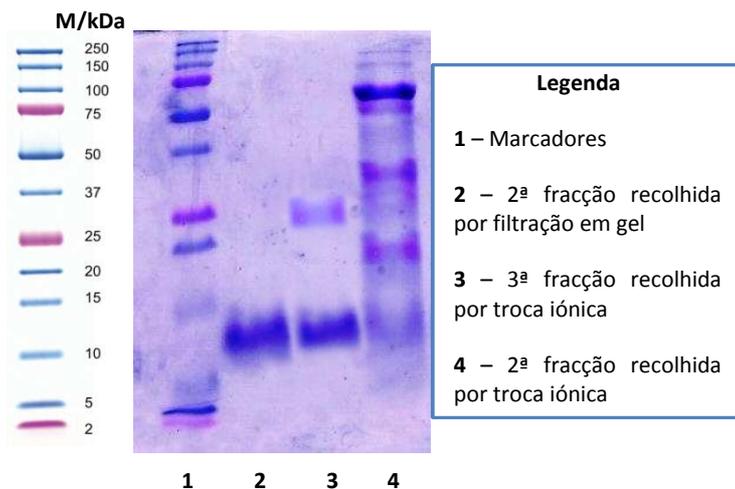
Em relação ao domínio A, durante o primeiro passo cromatográfico (troca iónica), observou-se inicialmente a saída de uma fracção incolor, à qual correspondeu uma primeira banda intensa nos cromatogramas. Seguidamente, ocorreu a saída de duas fracções vermelhas, que correspondem à segunda e terceira bandas mais intensas assinaladas nos cromatogramas da Figura 18. A única excepção verificou-se na purificação da fracção periplasmática isolada de *E. coli* JCB7123 com indução por 50  $\mu\text{M}$  IPTG, na qual se observou a saída de uma única fracção vermelha (segunda banda intensa no cromatograma respectivo da Figura 18). Esta saiu a uma força iónica idêntica à da eluição da terceira fracção nas restantes estirpes.

As fracções vermelhas foram, de seguida, avaliadas por electroforese de SDS-PAGE. Assim, a primeira fracção vermelha apresenta uma banda no gel contendo proteína de massa molecular aparente semelhante à do domínio A e várias bandas com proteínas de massa superior. Uma vez que os pontos isoeléctricos da maioria das proteínas são inferiores ao do domínio (sendo este, por isso, eluído a força iónica elevada), as proteínas eluídas nesta fracção serão contaminantes e não o citocromo de interesse. Tendo em conta a coloração vermelha e o facto de não ser observável na estirpe JCB7123, o contaminante com massa semelhante ao domínio pode corresponder a formas incorrectamente expressas da proteína pretendida (com diferente número de grupos hemo, p.e.).



**Figura 18** – Resultados obtidos por cromatografia de troca iónica (à esquerda, com o gradiente de NaCl representado pela recta a vermelho) e de filtração em gel (à direita) a partir dos testes de expressão do domínio A.

A segunda fracção vermelha (ou, no caso da estirpe JCB7123, a única fracção vermelha recolhida), eluída a maior força iónica, apresentou apenas um conjunto de duas bandas no gel, tendo uma delas massa molecular aparente semelhante à do domínio A. Uma vez que os resultados foram semelhantes em todas as estirpes testadas, na Figura 19 apresentam-se, como exemplo, as fracções recolhidas durante a purificação da fracção periplasmática de *E. coli* Tuner (DE3), induzida com 50  $\mu$ M de IPTG.



**Figura 19** – Teste de expressão de domínio A com a estirpe *E. coli* Tuner (DE3), induzida com 50  $\mu$ M IPTG. Gel obtido por electroforese SDS-PAGE, com as fracções vermelhas recolhidas em cada um dos passos cromatográficos. À esquerda, encontra-se a legenda com as massas moleculares dos marcadores utilizados.

A segunda fracção vermelha (ou, no caso da estirpe JCB7123, a única) foi então seleccionada para o passo cromatográfico seguinte, de filtração em gel (Figura 18). Todos os cromatogramas obtidos neste passo de purificação apresentaram um conjunto de duas bandas mais intensas, sendo a primeira correspondente a uma fracção incolor e a segunda a uma fracção vermelha.

A pureza da fracção vermelha recolhida por filtração em gel foi seguidamente avaliada por electroforese de SDS-PAGE, tendo-se observado a presença de uma só banda, correspondente a proteína pura com massa molecular aparente semelhante à do domínio A (Figura 19). Os espectros adquiridos para esta amostra por UV-visível e RMN mostraram ser característicos de citocromos de tipo *c* (ver Figuras 24, 25, 27 e 28 na secção 3.2.1.1 e Figura 38 na secção 3.2.3). A análise dos espectros obtidos por RMN permitiu também verificar a existência de três grupos hemo e de uma metionina axial. A partir destes dados e dos resultados da sequenciação do gene, pode inferir-se que a proteína purificada é, efectivamente, domínio A.

Tendo em conta que o volume de amostra injectado na coluna de filtração em gel foi exactamente o mesmo em todos os casos, verificou-se que o melhor nível de expressão foi

alcançado com a estirpe *E. coli* JCB7123, com indução por 50  $\mu$ M IPTG. O rendimento, nestas condições, foi de 0,15 mg de proteína por litro de cultura.

Em relação ao domínio B, foi seguido um processo de purificação semelhante ao utilizado no domínio A. Assim, embora os perfis de eluição observados no passo de troca iónica tenham inicialmente sido idênticos, com a saída de uma primeira fracção incolor e uma segunda fracção vermelha, de seguida, não ocorreu uma separação distinta das fracções que corresponderiam à terceira banda de cor vermelha (Figura 20). Estas últimas fracções foram reunidas para avaliação por SDS-PAGE.

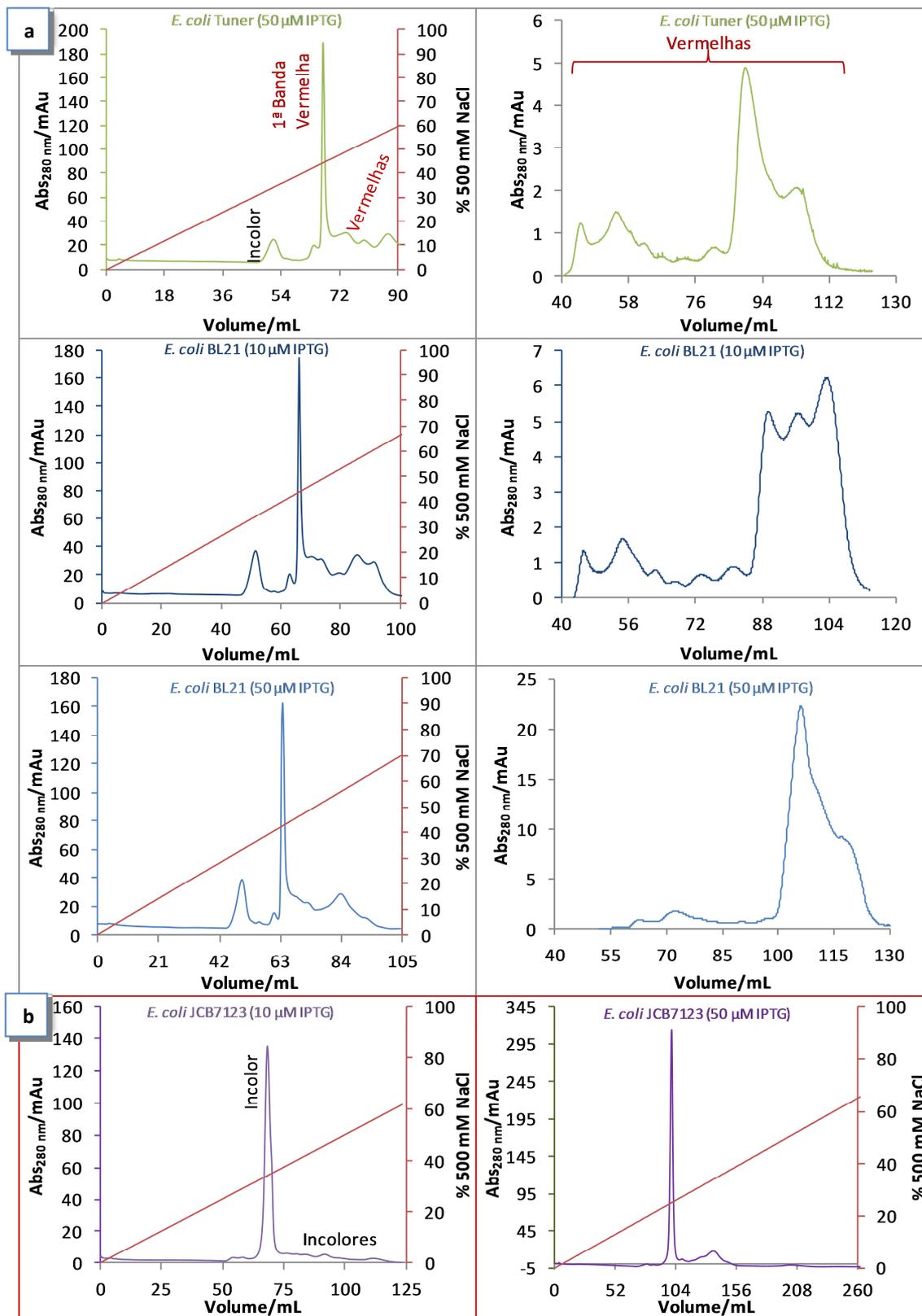
Todas as fracções vermelhas foram sujeitas a electroforese SDS-PAGE. O gel (não apresentado) revelou resultados semelhantes aos obtidos para o domínio A relativamente à primeira fracção vermelha. Contudo, para as fracções vermelhas reunidas foram observadas várias bandas e não apenas duas, como no caso do domínio A.

Não obstante, realizou-se filtração em gel destas últimas fracções reunidas. A única excepção refere-se à purificação das fracções periplasmáticas recolhidas de *E. coli* JCB7123, cuja eluição na cromatografia de troca iónica não resultou na saída de quaisquer fracções vermelhas observáveis. De facto, a maior parte do conteúdo vermelho das fracções periplasmáticas injectadas não adsorveu à coluna, correspondendo a contaminantes.

A filtração em gel, nas condições experimentais deste trabalho, demonstrou não ser a mais apropriada à purificação do domínio B, ocorrendo sobreposição na saída de proteínas contaminantes e/ou possíveis formas diferentes de domínio B. Isto deveu-se à presença de diversas proteínas com massas semelhantes, resultado da junção das fracções vermelhas cuja separação foi indefinida.

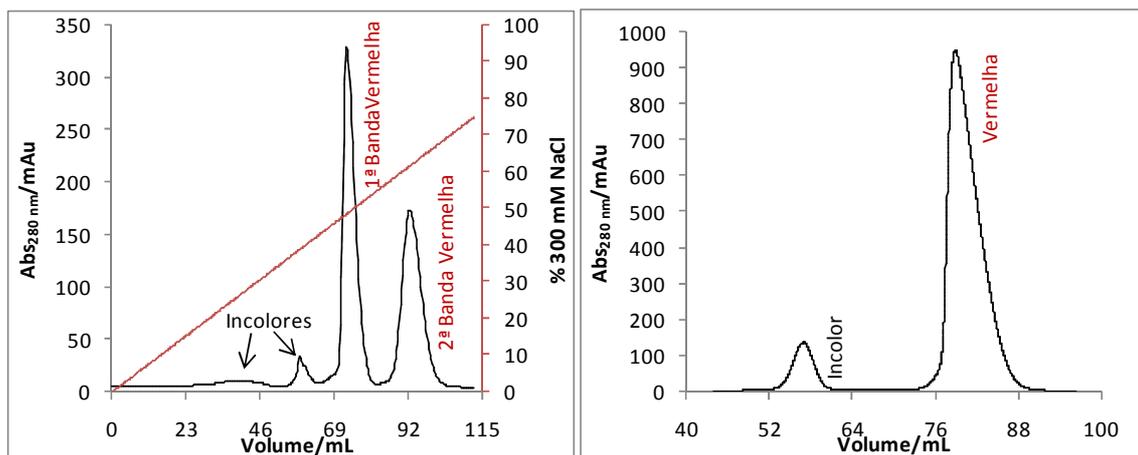
Embora a purificação do domínio B não tenha sido satisfatória, os resultados obtidos por filtração em gel indicam que a estirpe BL21 induzida com 50  $\mu$ M de IPTG é a que apresenta melhor rendimento na expressão desta proteína.

Uma vez que o processo de purificação não permitiu obter proteína pura, a caracterização deste domínio não foi realizada. O procedimento terá assim de ser futuramente optimizado, de modo a permitir o estudo desta proteína.

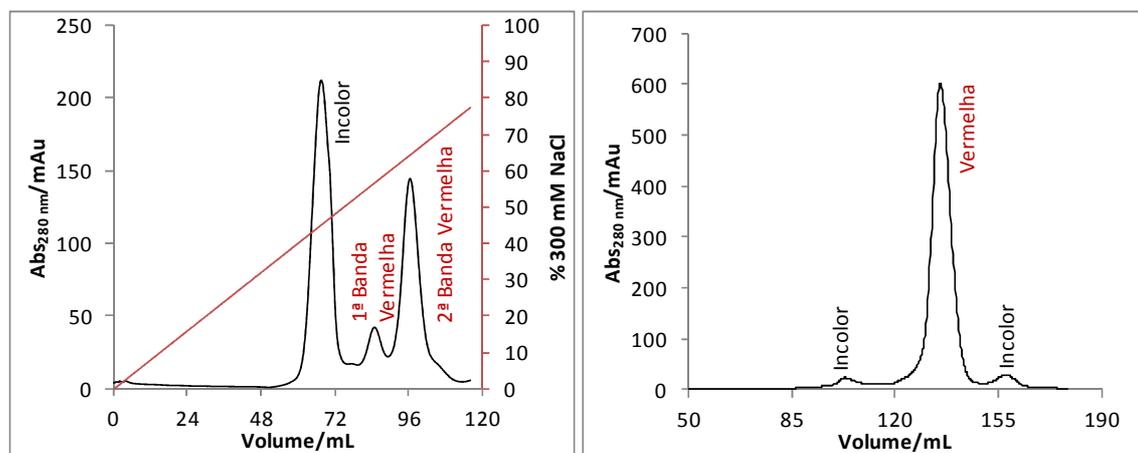


**Figura 20** – Resultados obtidos por **a.** cromatografia de troca iónica (à esquerda, com o gradiente de NaCl representado pela recta a vermelho) e de filtração em gel (à direita) para o domínio B nos testes de expressão; **b.** cromatografia de troca iónica das fracções periplasmáticas obtidas a partir de *E. coli* JCB7123.

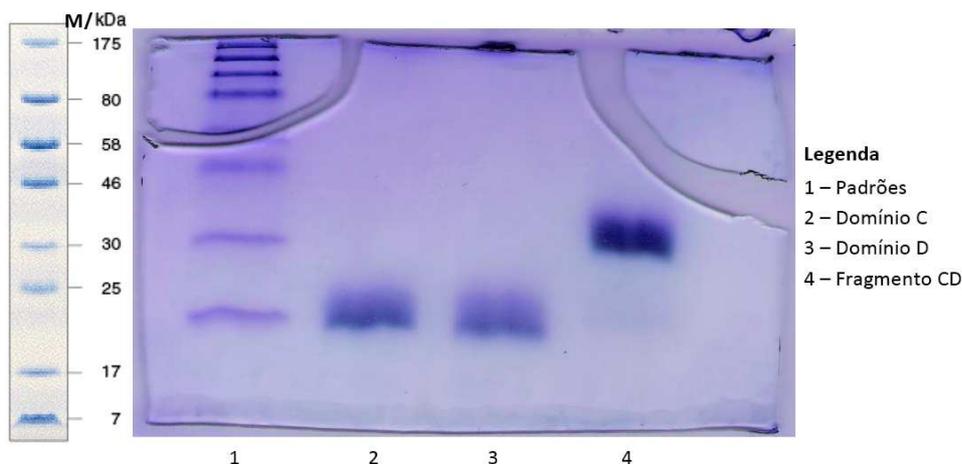
No caso dos domínios C e D e fragmento CD, não foram efectuados procedimentos de optimização de expressão, dado ter sido possível obter quantidades de proteína suficientes com volumes de cultura relativamente pequenos (até cerca de 5 L). A purificação foi realizada como descrito para os domínios A e B. Os resultados obtidos durante o processo de purificação dos domínios C e D foram muito semelhantes, apresentando-se na Figura 21, como exemplo, os cromatogramas obtidos para o domínio D. Na Figura 22, encontram-se os cromatogramas referentes à purificação do fragmento CD. A pureza das proteínas foi avaliada por electroforese de SDS-PAGE após filtração em gel, sendo os resultados apresentados na Figura 23. Os espectros obtidos por RMN (ver secções 3.2.1.1 e 3.2.1.2) são típicos de citocromos *c*, mostrando a presença da metionina axial do grupo hemo IV e confirmando a presença dos três grupos hemo, no caso das proteínas purificadas durante a expressão dos domínios individuais, e dos seis grupos hemo no caso do fragmento CD.



**Figura 21** – Resultados obtidos por cromatografia de troca iónica (à esquerda, com o gradiente de NaCl representado pela recta a vermelho) e de filtração em gel (à direita) na purificação de domínio D.



**Figura 22** – Resultados obtidos por cromatografia de troca iónica (à esquerda, com o gradiente de NaCl representado pela recta a vermelho) e de filtração em gel (à direita) na purificação do fragmento CD.



**Figura 23** – Gel SDS-PAGE realizado no caso da purificação dos domínios C, D e fragmento CD, após filtração em gel. À esquerda, encontram-se os marcadores utilizados.

As amostras puras dos domínios A, C, D e do fragmento CD foram, seguidamente, utilizadas na etapa de caracterização funcional (ver Figura 17 na secção 2.2.3).

## 3.2 Caracterização de centros redox em proteínas multi-hémicas

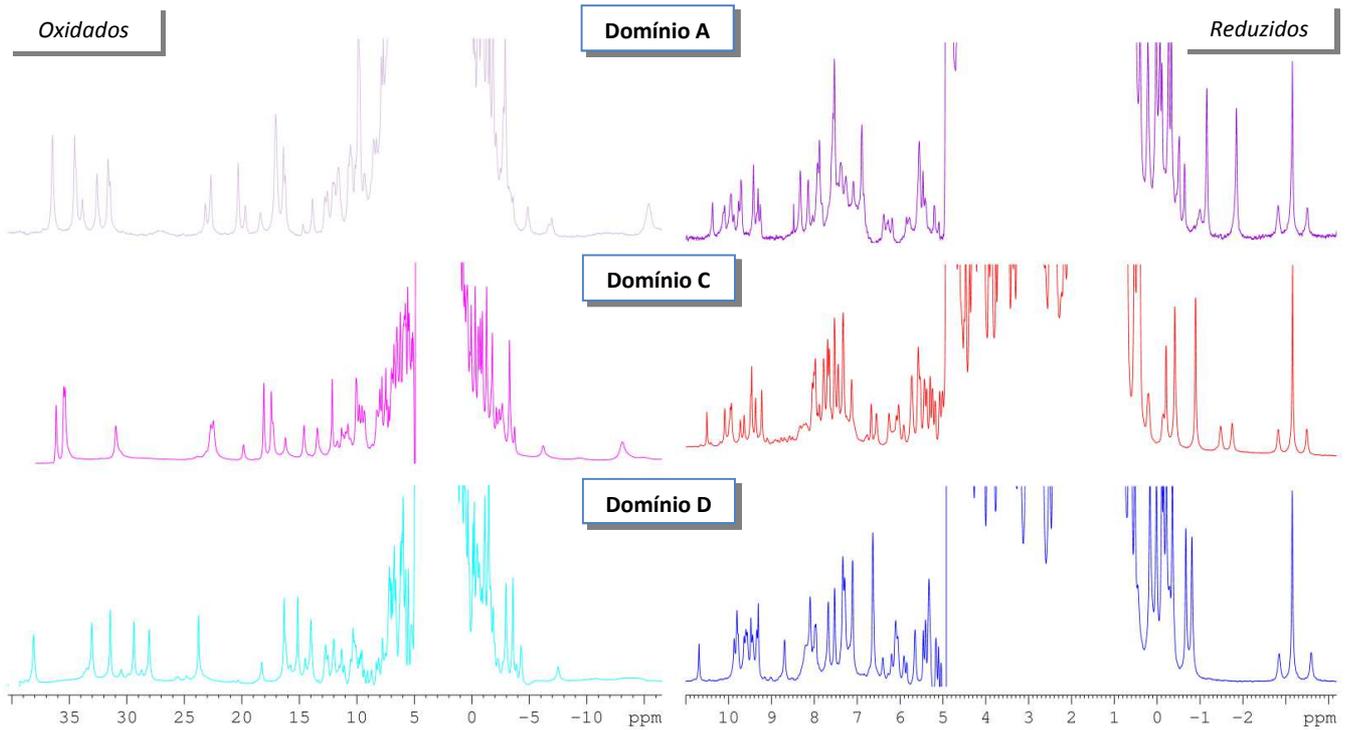
### 3.2.1 Atribuição dos sinais aos grupos hemo

#### 3.2.1.1 Atribuição dos sinais aos substituintes hémicos dos domínios individuais no estado diamagnético

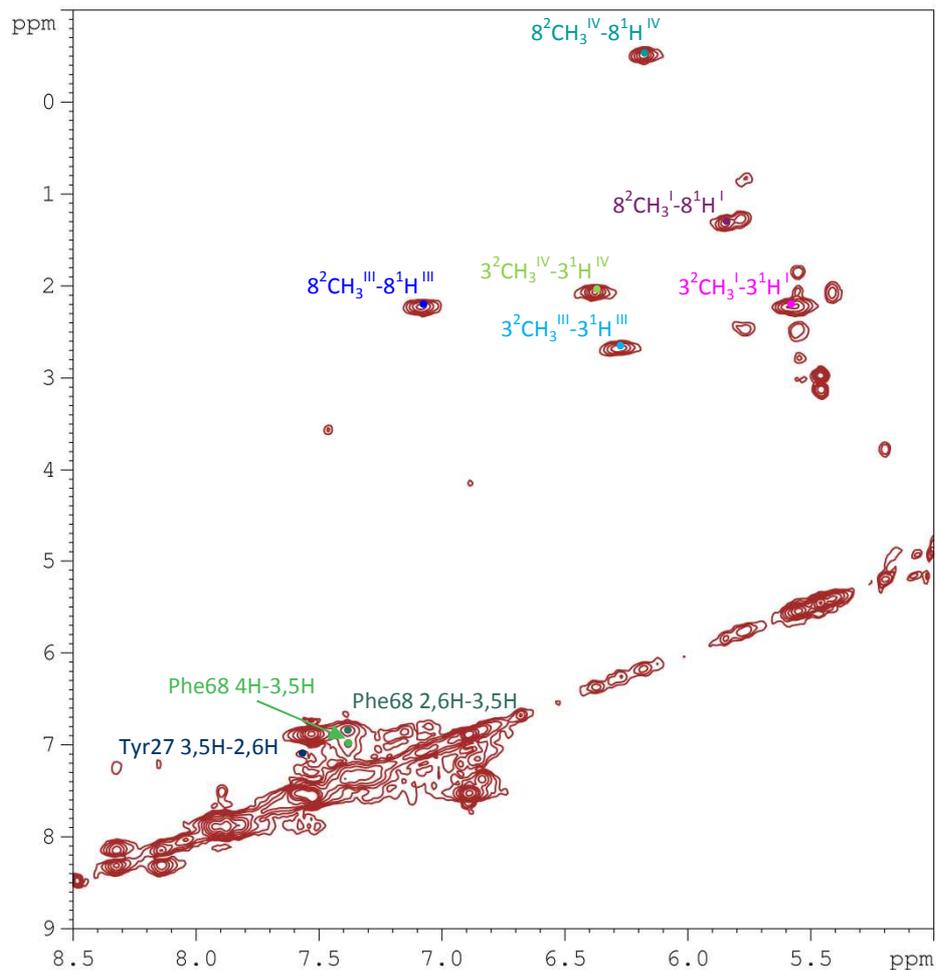
Nos espectros de 1D  $^1\text{H}$ -RMN de cada um dos domínios (Figura 24), podem observar-se picos distintos e bem definidos, que correspondem às ressonâncias de cada um dos substituintes hémicos dos vários grupos hemo. Os espectros no estado oxidado apresentam, como esperado, sinais numa gama mais alargada comparativamente ao estado reduzido. Em ambos os casos, os espectros são típicos de citocromos *c* de baixo *spin* (ver secção 2.2.2.2), com sinais até cerca de 11 ppm no estado reduzido e 37 ppm no estado oxidado.

A identificação das ressonâncias correspondentes aos substituintes dos grupos hemo nas proteínas A, C e D no estado reduzido foi realizada seguindo a estratégia descrita por Turner *et al.* para ferrocitocromos multi-hémicos [61].

Como mencionado anteriormente, no estado reduzido os prótons encontram-se em zonas típicas. Entre os substituintes hémicos, os únicos prótons que apresentam acoplamento escalar (*spin-spin*) são os prótons metino e metilo das pontes tioéter ( $3^1\text{H}/3^2\text{CH}_3$  e  $8^1\text{H}/8^2\text{CH}_3$ ), motivo pelo qual foram os primeiros a ser identificados nos espectros de RMN 2D  $^1\text{H}$ -TOCSY. Como exemplo, apresenta-se na Figura 25 a atribuição realizada no domínio A.

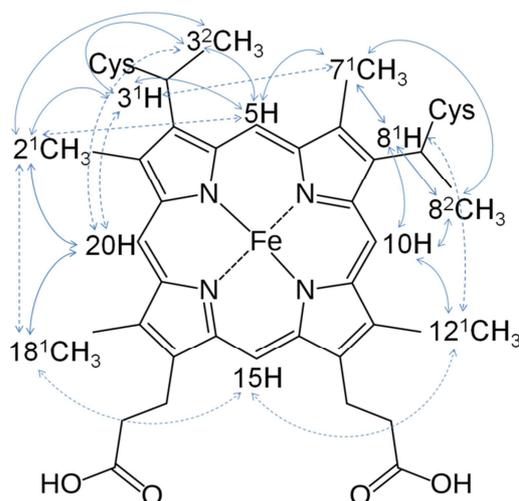


**Figura 24** – Espectros de 1D  $^1\text{H}$ -RMN dos domínios A, C e D no estado oxidado (à esquerda) e no estado reduzido (à direita), a pH 8,0 e 16°C.



**Figura 25** – Expansão do espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ -TOCSY obtido para o domínio A, com os prótons que apresentam acoplamento escalar ( $3^1\text{H}/3^2\text{CH}_3$  e  $8^1\text{H}/8^2\text{CH}_3$ ) e os resíduos aromáticos identificados assinalados.

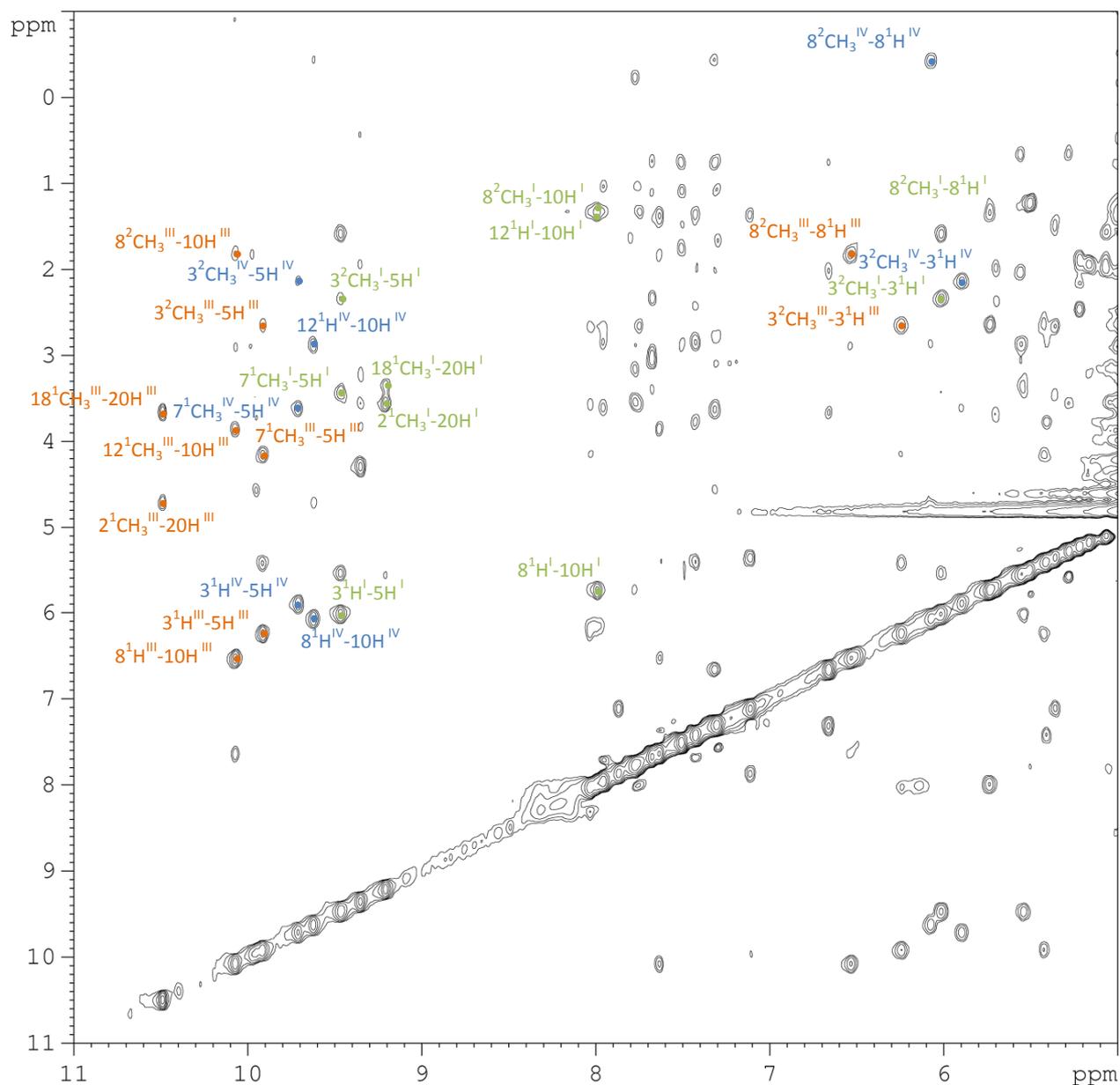
No passo seguinte, através dos espectros de RMN de 2D  $^1\text{H}$ -NOESY adquiridos com valor de tempo de mistura baixo (entre 50 – 100 ms), foram identificados os padrões de conectividades a curta distância que ocorrem entre prótons meso e substituintes vizinhos (Figura 26). Assim, os prótons 20H estão conectados a apenas dois metilos hémicos ( $2^1\text{CH}_3$  e  $18^1\text{CH}_3$ ), os prótons 15H não mostram qualquer conectividade a metilos hémicos ou substituintes das pontes tioéter e os prótons meso 5H e 10H mostram padrões de conectividades muito semelhantes. Estes dois últimos, estão conectados simultaneamente a metilos hémicos e metinos/metilos das pontes tioéter. Dado apresentarem o mesmo padrão, apenas podem ser discriminados por análise das conectividades estabelecidas entre os substituintes hémicos  $2^1\text{CH}_3/3^2\text{CH}_3$  e  $7^1\text{CH}_3/8^2\text{CH}_3$ . Na Figura 27 encontra-se, como exemplo da atribuição realizada, uma expansão do espectro de RMN de 2D  $^1\text{H}$ -NOESY adquirido para o domínio C com tempo de mistura de 60 ms.



**Figura 26** – Conectividades no grupo hemo *c*. As setas a cheio e a tracejado ilustram, respectivamente, os prótons hémicos envolvidos nas conectividades observadas nos espectros de 2D  $^1\text{H}$ -NOESY a curta e a longa distância.

Espectros adquiridos com tempo de mistura superior permitem observar sinais correspondentes a conectividades a longa distância (até cerca de 4 Å, Figura 26). Assim, a atribuição de sinais foi confirmada pela análise das conectividades intra-hémicas a longa distância, através de experiências de RMN de 2D  $^1\text{H}$ -NOESY realizadas com tempo de mistura elevado (entre 300 – 400 ms). Como exemplo, apresenta-se na Figura 28 uma expansão do espectro do domínio C, adquirido com tempo de mistura de 400 ms.

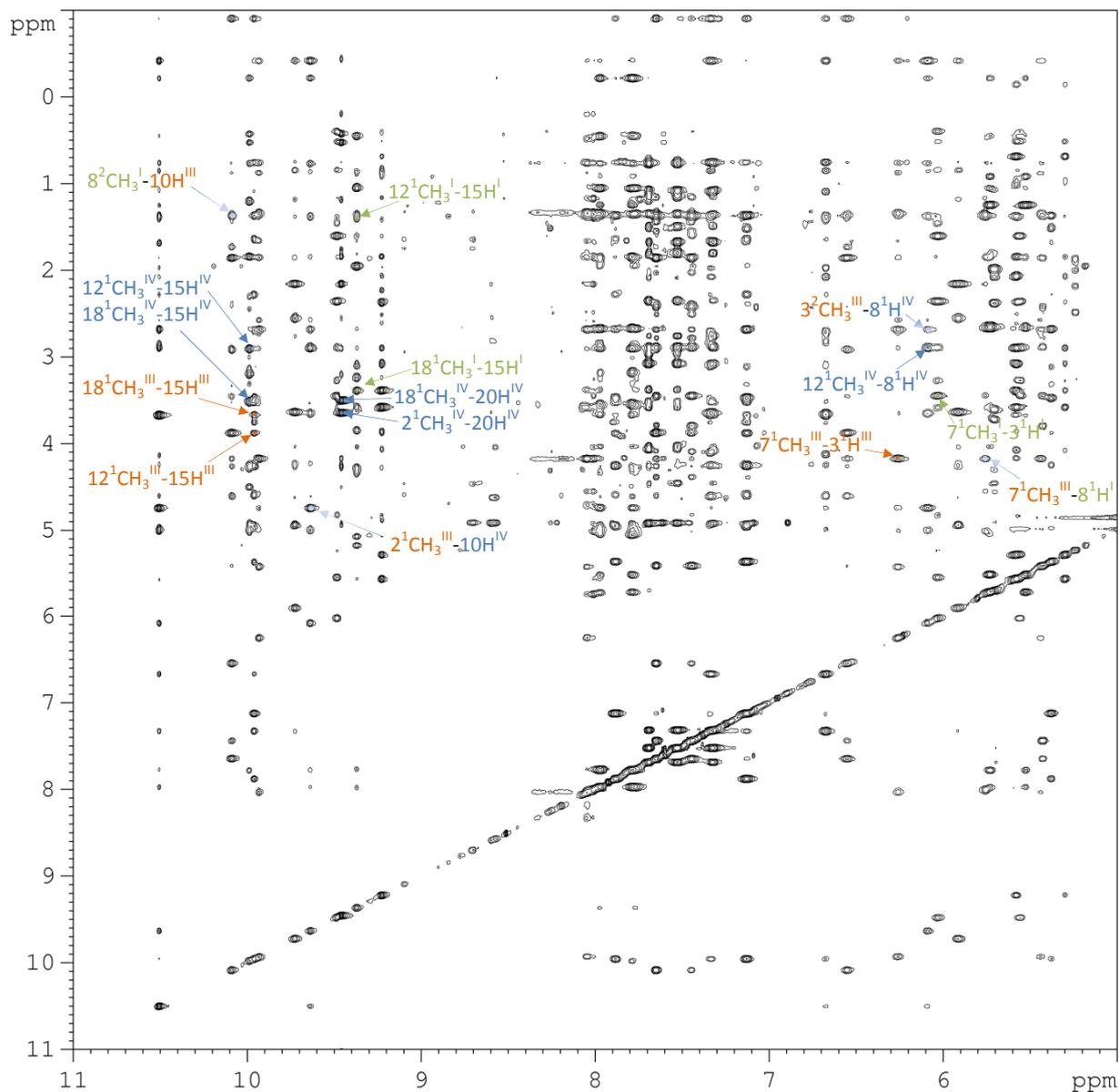
A atribuição de sinais está de acordo com o previsto pela Equação 3 (ver secção 2.2.2.1.2), observando-se uma diminuição na intensidade dos NOE com o aumento da distância a que se encontram os substituintes hémicos.



**Figura 27** – Expansão do espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ -NOESY adquirido com valor de tempo de mistura de 60 ms para o domínio C, a pH 8,0 e 16°C. Os NOE dos substituintes intra-hémicos encontram-se assinalados, representando os números I, III e IV os grupos hemo I (verde), III (laranja) e IV (azul), respectivamente.

Após a atribuição dos sinais aos substituintes hémicos, o passo seguinte consistiu na sua atribuição específica a cada grupo hemo nas estruturas das proteínas. Esta atribuição foi efectuada pela análise das conectividades NOE inter-hémicas nos espectros de RMN 2D  $^1\text{H}$ -NOESY (Figura 28), tendo por base as distâncias medidas a partir das estruturas determinadas por cristalografia de raios-X.

Todas as conectividades NOE entre prótons a menos de 3 Å foram observadas nos espectros de 2D  $^1\text{H}$ -NOESY, validando a atribuição e demonstrando que as estruturas são semelhantes tanto nos cristais como em solução.



**Figura 28** – Expansão do espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ -NOESY adquirido para o domínio C, a pH 8,0 e 16°C, com tempo de mistura de 400 ms. Todos os NOE assinalados na Figura 27 estão presentes nesta expansão. Como exemplo, aqui foram assinalados alguns NOE entre substituintes intra-hémicos a longa distância (não observados no espectro anterior) e alguns NOE inter-hémicos. Os números I, III e IV representam os grupos hemo I (verde), III (laranja) e IV (azul), respectivamente.

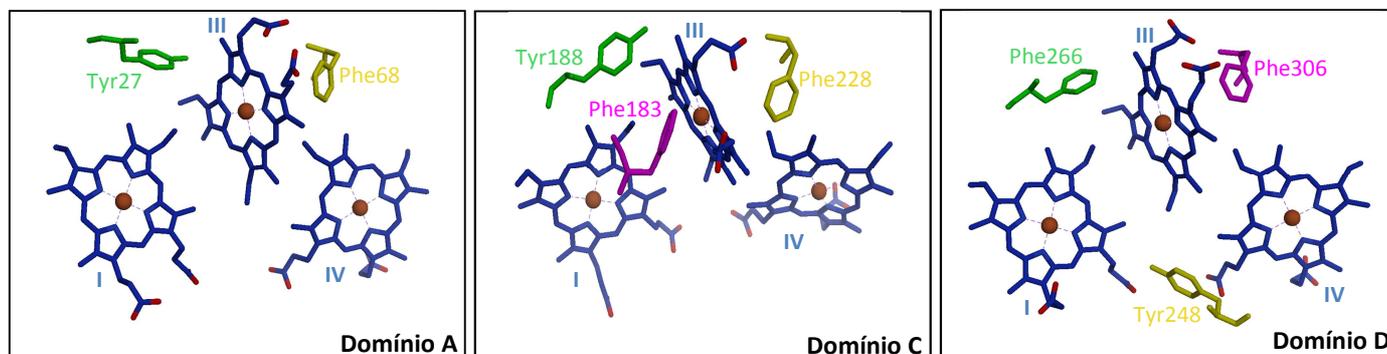
A Tabela 15 resume a atribuição de sinais efectuada para cada um dos três domínios individuais.

**Tabela 15** – Desvios químicos observados nos substituintes hémicos dos domínios A, C e D em estado reduzido, a pH 8,0 e 16°C. Entre parêntesis encontram-se os rcs. Os valores de rcs foram encontrados pela diferença entre os valores de referência para os desvios químicos na ausência de rcs (ver Tabela 14 na secção 2.3.2.5) e os valores dos desvios químicos observados.

	Substituinte hémico	$\delta$ /ppm					
		Grupo hemo					
		I	III	IV			
Domínio A	5H	9,41	(-0,05)	9,96	(-0,60)	9,94	(-0,58)
	10H	8,14	(1,22)	10,10	(-0,74)	9,70	(-0,34)
	15H	9,77	(-0,41)	9,72	(-0,36)	9,88	(-0,52)
	20H	9,31	(0,05)	10,38	(-1,02)	9,43	(-0,07)
	2 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,56	(-0,08)	4,58	(-1,10)	3,65	(-0,17)
	7 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,36	(0,12)	4,25	(-0,77)	3,55	(-0,07)
	12 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	1,43	(2,05)	3,57	(-0,09)	3,14	(0,34)
	18 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,30	(0,18)	3,82	(-0,34)	3,48	(0,00)
	3 <sup>1</sup> H	5,58	(0,55)	6,28	(-0,15)	6,38	(-0,25)
	8 <sup>1</sup> H	5,85	(0,28)	7,09	(-0,96)	6,18	(-0,05)
	3 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	2,24	(-0,12)	2,68	(-0,56)	2,08	(0,04)
	8 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	1,32	(0,80)	2,24	(-0,12)	-0,50	(2,62)
	Domínio C	5H	9,49	(-0,13)	9,94	(-0,58)	9,73
10H		8,01	(1,35)	10,09	(-0,73)	9,64	(-0,28)
15H		9,37	(-0,01)	9,96	(-0,60)	9,99	(-0,63)
20H		9,23	(0,13)	10,51	(-1,15)	9,46	(-0,10)
2 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>		3,59	(-0,11)	4,74	(-1,26)	3,65	(-0,17)
7 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>		3,45	(0,03)	4,18	(-0,70)	3,64	(-0,16)
12 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>		1,42	(2,06)	3,88	(-0,40)	2,91	(0,57)
18 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>		3,39	(0,09)	3,68	(-0,20)	3,51	(-0,03)
3 <sup>1</sup> H		6,03	(0,10)	6,26	(-0,13)	5,91	(0,22)
8 <sup>1</sup> H		5,75	(0,38)	6,55	(-0,42)	6,09	(0,04)
3 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>		2,37	(-0,25)	2,69	(-0,57)	2,16	(-0,04)
8 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>		1,36	(0,76)	1,86	(0,26)	-0,41	(2,53)
Domínio D		5H	9,44	(-0,08)	9,87	(-0,51)	9,64
	10H	7,99	(1,37)	9,59	(-0,23)	9,56	(-0,20)
	15H	9,34	(0,02)	9,80	(-0,44)	9,77	(-0,41)
	20H	9,48	(-0,12)	10,69	(-1,33)	9,31	(0,05)
	2 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,69	(-0,21)	4,83	(-1,35)	3,55	(-0,07)
	7 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,38	(0,10)	4,13	(-0,65)	3,59	(-0,11)
	12 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	1,20	(2,28)	3,84	(-0,36)	3,20	(0,28)
	18 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,37	(0,11)	3,93	(-0,45)	3,49	(-0,01)
	3 <sup>1</sup> H	6,04	(0,09)	6,19	(-0,06)	5,91	(0,22)
	8 <sup>1</sup> H	5,65	(0,48)	6,09	(0,04)	6,40	(-0,27)
	3 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	2,40	(-0,28)	2,51	(-0,39)	2,17	(-0,05)
	8 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	1,10	(1,02)	1,67	(0,45)	-0,15	(2,27)

Os sinais dos prótons aromáticos encontram-se em zonas típicas nos espectros de RMN (entre 6 e 8 ppm), sendo facilmente identificáveis em experiências bidimensionais. Assim, confirmação adicional foi obtida a partir dos NOE observados entre alguns dos substituintes hémicos e cadeias laterais de resíduos de aminoácidos aromáticos da cadeia polipeptídica. A análise dos espectros de RMN de 2D <sup>1</sup>H-TOCSY e NOESY levou à identificação dos resíduos de

fenilalanina (Phe) 68 e de tirosina (Tyr) 27 no domínio A, dos resíduos de Phe183, Phe228 e Tyr188 no domínio C e dos resíduos de Phe266, Phe306 e Tyr248 no domínio D (Figura 29). A atribuição dos resíduos aromáticos é exemplificada na Figura 25, com o espectro de 2D  $^1\text{H}$ -TOCSY adquirido para o domínio A.



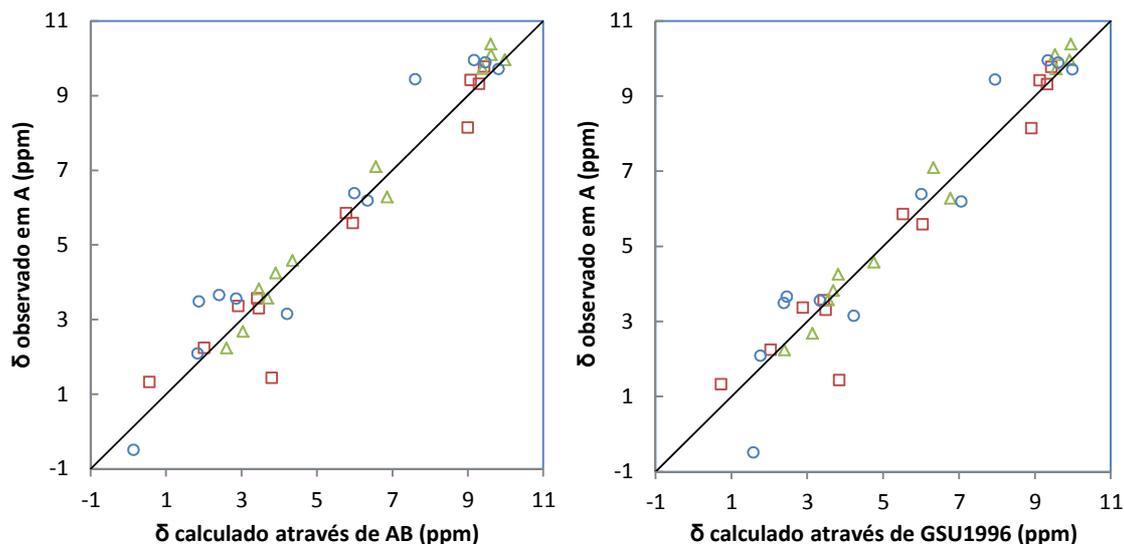
**Figura 29** – Disposição espacial dos resíduos aromáticos identificados nos domínios A, C e D.

Finalmente, validou-se a atribuição dos sinais dos substituintes hémicos por comparação dos desvios químicos e rcs observados com os calculados a partir das estruturas resolvidas por cristalografia de raios-X (Tabelas A1 a A3, no anexo 2).

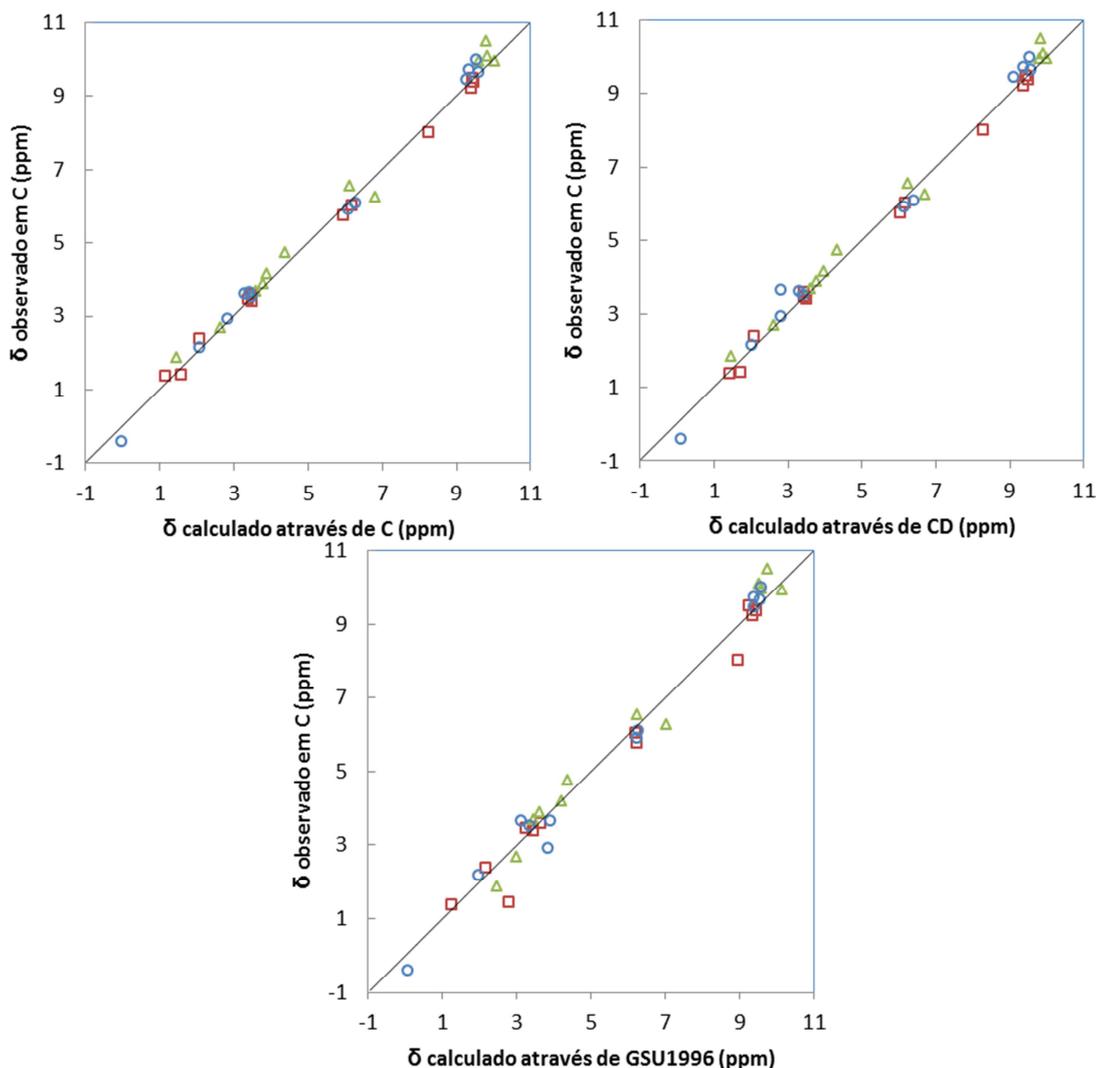
No caso do domínio A, foi feita a comparação com os valores calculados através das estruturas do fragmento AB e do GSU1996. Quer no GSU1996, como no fragmento AB, os domínios A e B comportam-se como uma unidade estrutural. De facto, embora no global haja uma boa correlação entre os valores dos desvios observados e os valores calculados, verifica-se a ocorrência de alguma dispersão, especialmente em substituintes hémicos dos grupos hemo I e IV, que pode ser explicada pela ausência da influência do domínio B (Figura 30).

Das seis permutações possíveis para os três conjuntos de prótons hémicos relativamente às estruturas de cristal, uma foi claramente favorecida em cada caso, visto todos os grupos hemo apresentarem, simultaneamente, a menor raiz quadrada da média dos quadrados das distâncias (rmsd) em relação aos rcs calculados. Em relação à estrutura obtida por cristalografia de raios-X do fragmento AB, a rmsd dos 36 rcs foi 0,85 ppm, com variações de 0,32 (grupo hemo I), 0,09 (grupo hemo III) e 0,44 (grupo hemo IV). Finalmente, em relação ao GSU1996 a rmsd dos 36 rcs foi 0,89 ppm, com variações de 0,32 (grupo hemo I), 0,08 (grupo hemo III) e 0,49 (grupo hemo IV).

O domínio C é o único domínio individual cuja estrutura foi determinada por cristalografia de raios-X [51]. Assim, os desvios químicos dos prótons hémicos observados em solução e os calculados através do cristal apresentam uma correlação muito elevada, mesmo no caso dos prótons sujeitos aos maiores efeitos de corrente de anel (Figura 31).



**Figura 30** – Comparação entre os desvios químicos observados e os calculados para os substituintes hêmicos dos grupos hemo I (□), III (Δ) e IV (○) no domínio A. Os desvios observados foram comparados com os calculados através das estruturas obtidas por cristalografia de raios-X do fragmento AB (à esquerda) e do GSU1996 (à direita). A linha sólida representa a recta de declive unitário.



**Figura 31** – Comparação entre os desvios químicos observados e calculados para os substituintes hêmicos dos grupos hemo I (□), III (Δ) e IV (○) no domínio C. Os desvios observados foram comparados com os calculados através das estruturas obtidas por cristalografia de raios-X do domínio C (em cima, à esquerda); fragmento CD (em cima, à direita) e GSU1996 (em baixo, à esquerda). A linha sólida representa a recta de declive unitário.

A comparação com os valores previstos a partir da estrutura do fragmento CD revela uma ligeira variação no que diz respeito aos desvios químicos calculados para o grupo hemo IV comparativamente à estrutura do domínio individual, que se deverá, possivelmente à influência do domínio D na estrutura do fragmento.

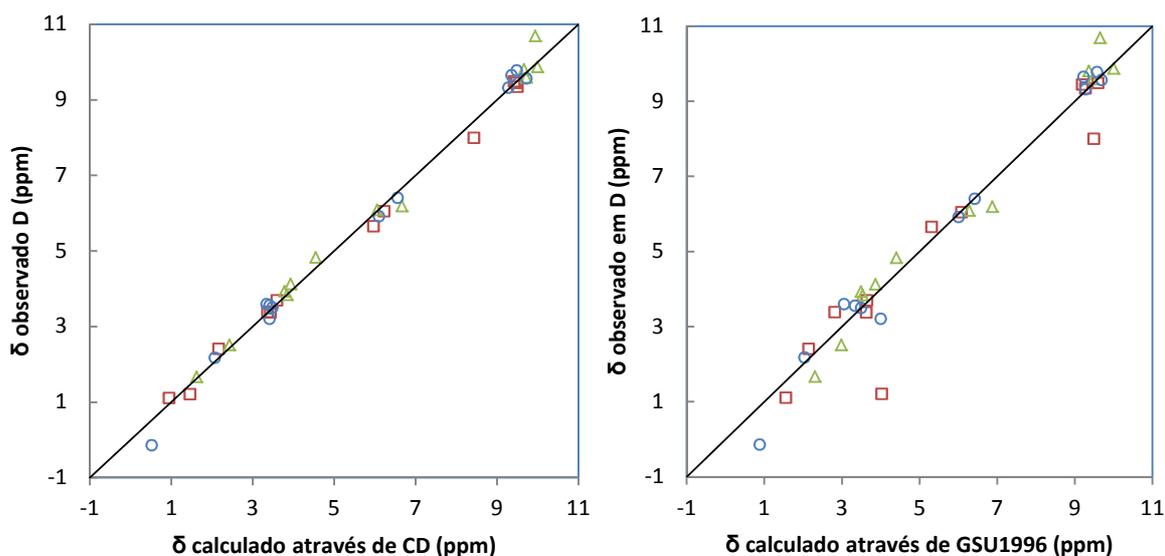
Os desvios previstos a partir do GSU1996 apresentam a pior correlação, particularmente nos casos dos grupos hemo I e IV, que são ambos afectados pela presença dos domínios vizinhos B e D, respectivamente. De facto, embora as distâncias entre iões de ferro dos grupos hemo não sejam afectadas, existem diferenças significativas nos ângulos entre planos dos grupos hemo (Tabela 2 na secção 1.2.1.1.1), o que explica as discordâncias observadas nos desvios químicos e nos desvios de correntes de anel.

Das seis permutações possíveis para os três conjuntos de protões hémicos relativamente às estruturas de cristal, uma foi favorecida em cada caso, visto todos os grupos hemo apresentarem, simultaneamente, a menor raiz quadrada da média dos quadrados das distâncias (rmsd) em relação aos rcs calculados. Em relação à estrutura obtida por cristalografia de raios-X do domínio C, a rmsd dos 36 rcs foi 0,12 ppm, com variações de 0,02 (grupo hemo I), 0,07 (grupo hemo III) e 0,03 (grupo hemo IV). No caso do fragmento CD, a rmsd dos 36 rcs foi 0,14 ppm, com variações de 0,02 (grupo hemo I), 0,05 (grupo hemo III) e 0,07 (grupo hemo IV). Finalmente, em relação ao GSU1996 a rmsd dos 36 rcs foi 0,32 ppm, com variações de 0,14 (grupo hemo I), 0,10 (grupo hemo III) e 0,08 (grupo hemo IV).

As divergências observadas no domínio C, quer em relação ao fragmento CD, quer em relação ao GSU1996 são, contudo, bastante menores comparativamente ao sucedido no domínio A. Isto deve-se ao facto do domínio C ter um comportamento relativamente independente do ponto de vista estrutural, quer no fragmento, quer no GSU1996.

O domínio D evidencia a mesma tendência que o domínio C no que respeita às variações nos desvios dos grupos hemo I e IV, quando comparado com o fragmento CD e o GSU1996 (Figura 32). A curvatura a que está sujeito no GSU1996 leva, no entanto, a que o grupo hemo I seja mais afectado que no caso do domínio C.

Das seis permutações possíveis para os três conjuntos de protões hémicos relativamente às estruturas obtidas por cristalografia de raios-X, uma foi favorecida em cada caso, visto todos os grupos hemo apresentarem, simultaneamente, a menor raiz quadrada da média dos quadrados das distâncias (rmsd) em relação aos rcs calculados. Em relação à estrutura obtida por cristalografia de raios-X do fragmento CD, a rmsd dos 36 rcs foi 0,10 ppm, com variações de 0,02 (grupo hemo I), 0,04 (grupo hemo III) e 0,04 (grupo hemo IV). Finalmente, em relação ao GSU1996 a rmsd dos 36 rcs foi 0,68 ppm, com variações de 0,46 (grupo hemo I), 0,12 (grupo hemo III) e 0,10 (grupo hemo IV).



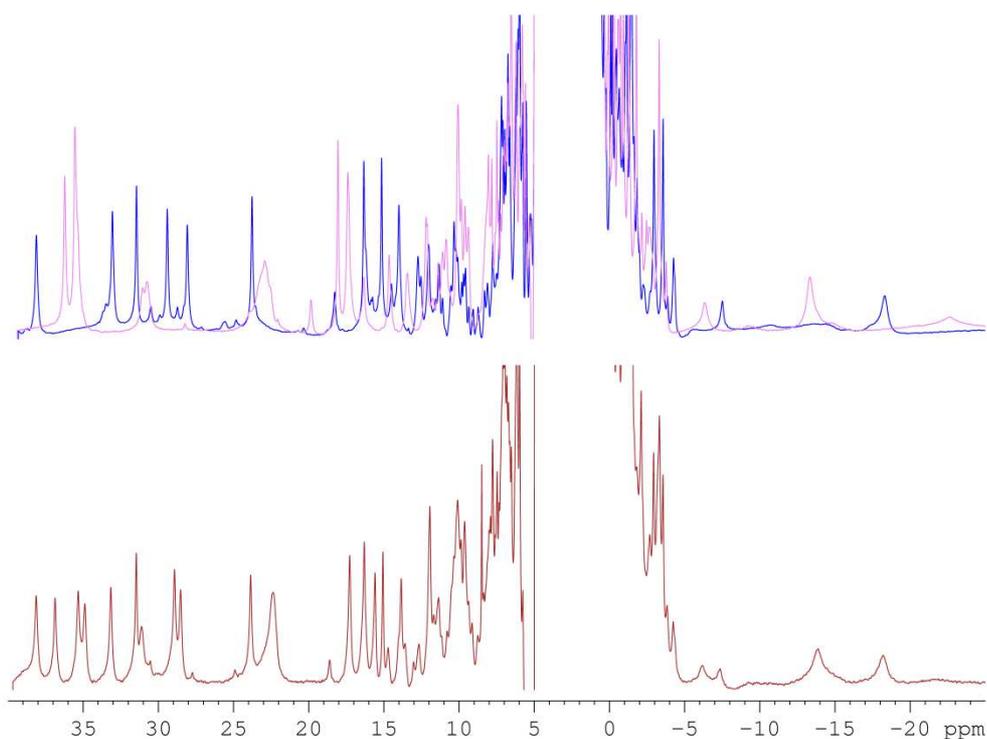
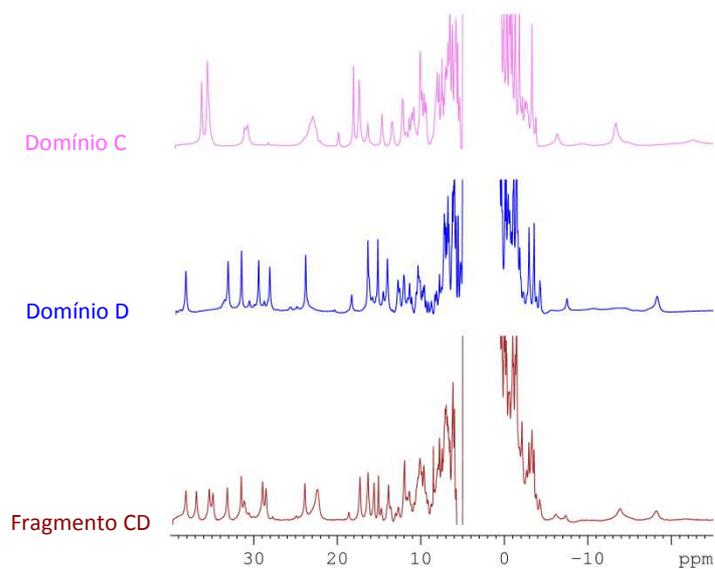
**Figura 32** – Comparação entre os desvios químicos observados e calculados para todos os substituintes hémicos dos grupos hemo I (□), III (Δ) e IV (○) no domínio D. Os desvios observados foram comparados com os calculados através das estruturas obtidas por cristalografia de raios-X do fragmento CD (à esquerda) e do GSU1996 (à direita). A linha sólida representa a recta de declive unitário.

### 3.2.1.2 Atribuição dos sinais aos substituintes hémicos do fragmento CD no estado reduzido

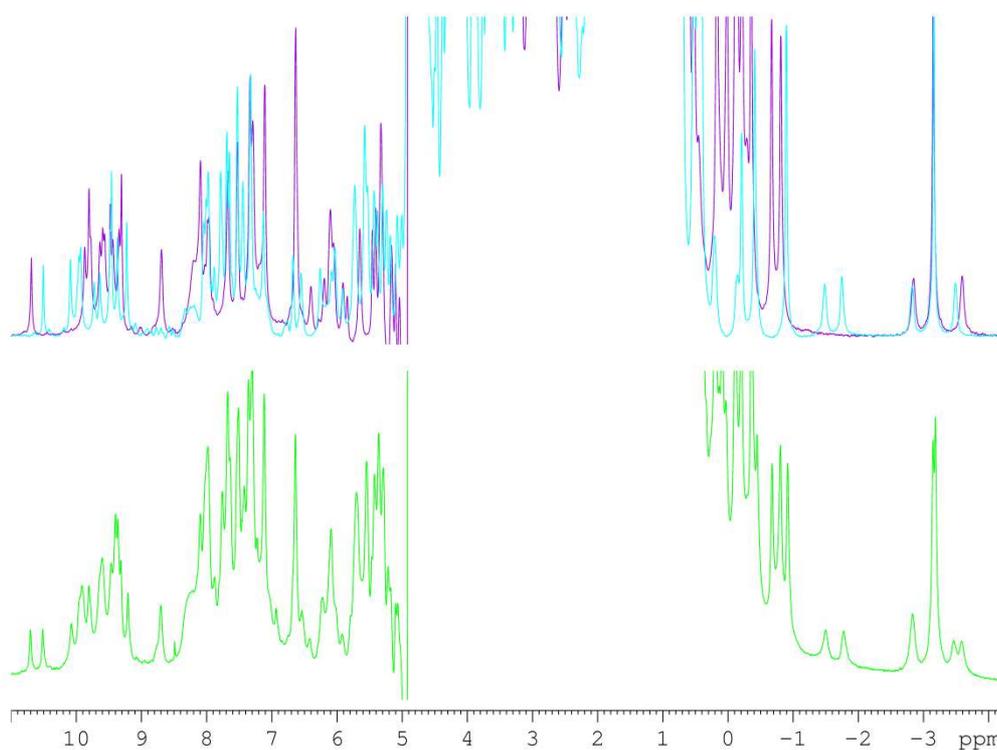
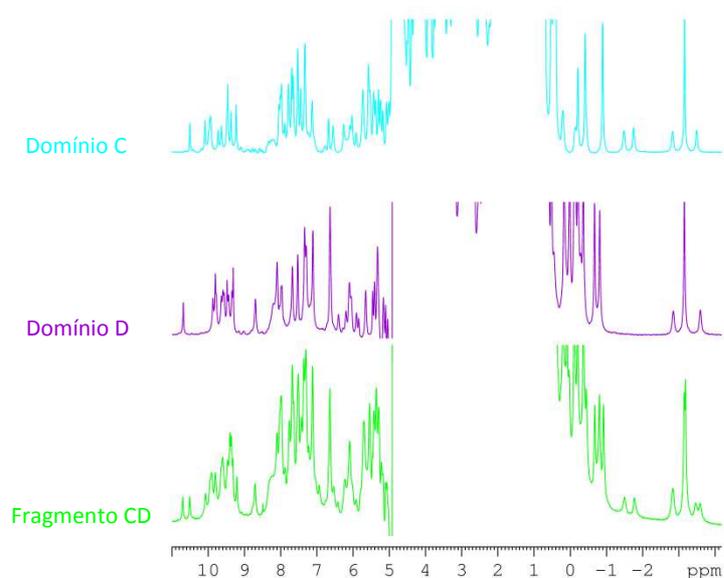
Os sinais nos espectros de RMN do fragmento CD são mais alargados devido ao maior tempo de correlação da molécula, quer no estado oxidado, quer no estado reduzido (Figuras 33 e 34). Consequentemente, as conectividades NOE entre os diferentes substituintes hémicos são menos intensas e definidas quando comparadas com as dos domínios individuais.

Tanto o elevado número de grupos hemo, como a largura dos sinais, inviabilizam a aplicação directa da metodologia para a atribuição de sinais. Contudo, a partir da comparação entre os espectros de 1D  $^1\text{H}$ -RMN, pode observar-se que os sinais do fragmento CD apresentam um padrão que corresponde globalmente ao somatório dos sinais dos substituintes hémicos de cada um dos domínios individuais que o constitui (Figuras 33 e 34).

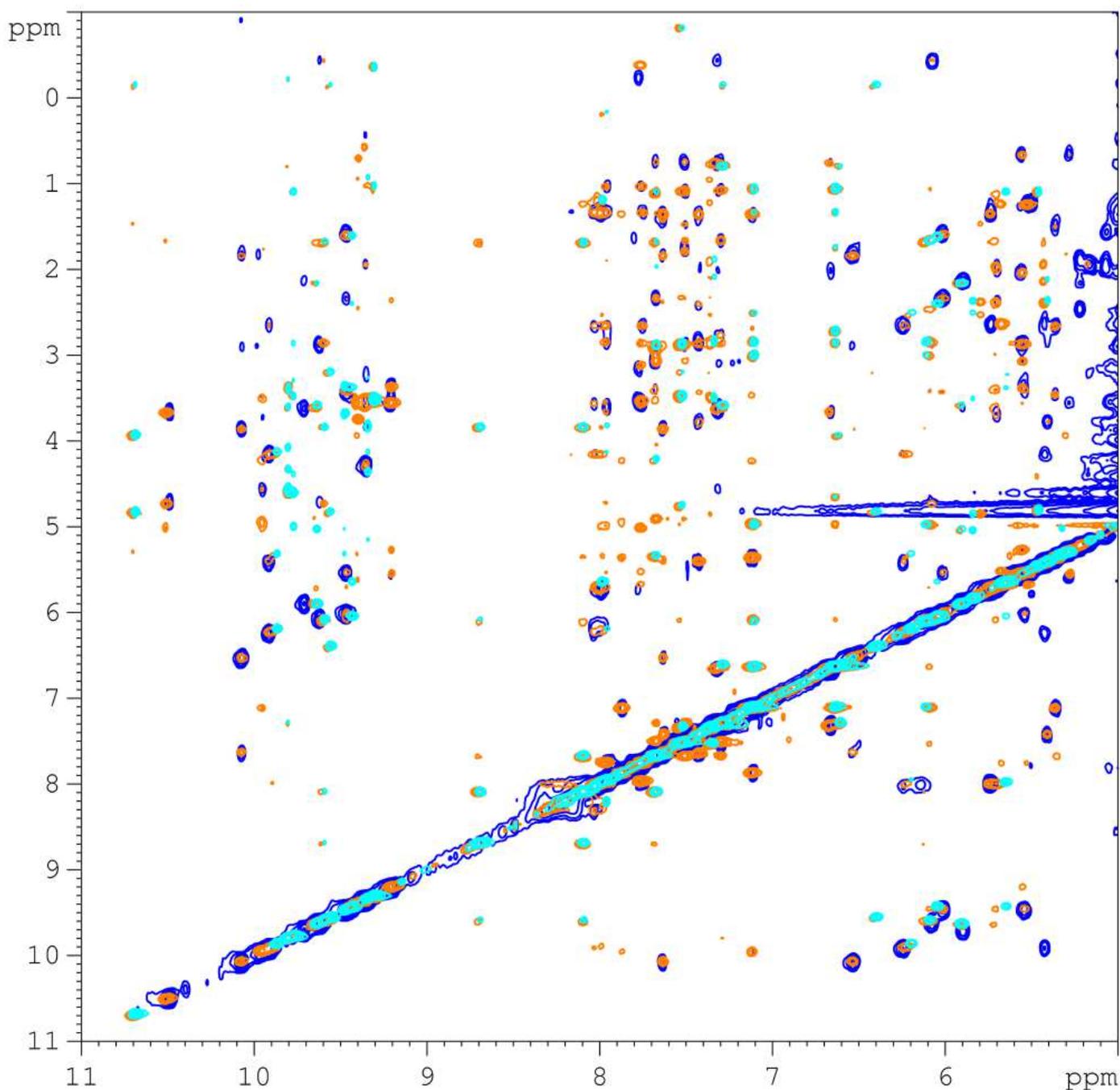
Neste trabalho, utilizou-se uma estratégia modular para a atribuição dos substituintes hémicos no fragmento CD. Deste modo, os sinais previamente identificados nos domínios C e D foram utilizados como guia da atribuição no fragmento CD (Figura 35). A atribuição de sinais hémicos no fragmento CD está indicada na Tabela 16, tendo sido confirmada como descrito para os domínios individuais.



**Figura 33** – Espectros de 1D  $^1\text{H}$ -RMN obtidos para os domínios C, D e fragmento CD no estado oxidado, a pH 8,0 e 16°C. Em cima, apresentam-se os espectros de cada proteína e em baixo, a sobreposição de ambos os domínios, cujo somatório é globalmente semelhante ao fragmento CD.



**Figura 34** – Espectros de 1D  $^1\text{H}$ -RMN obtidos para os domínios C, D e fragmento CD no estado reduzido, a pH 8,0 e 16°C. Em cima, apresentam-se os espectros de cada proteína e em baixo, a sobreposição de ambos os domínios, cujo somatório é globalmente semelhante ao fragmento CD.



**Figura 35** – Expansão da sobreposição dos espectros de RMN de 2D  $^1\text{H}$ -NOESY adquiridos para o domínio C (azul escuro), D (cyan) e fragmento CD (laranja) a pH 8,0 e 16°C.

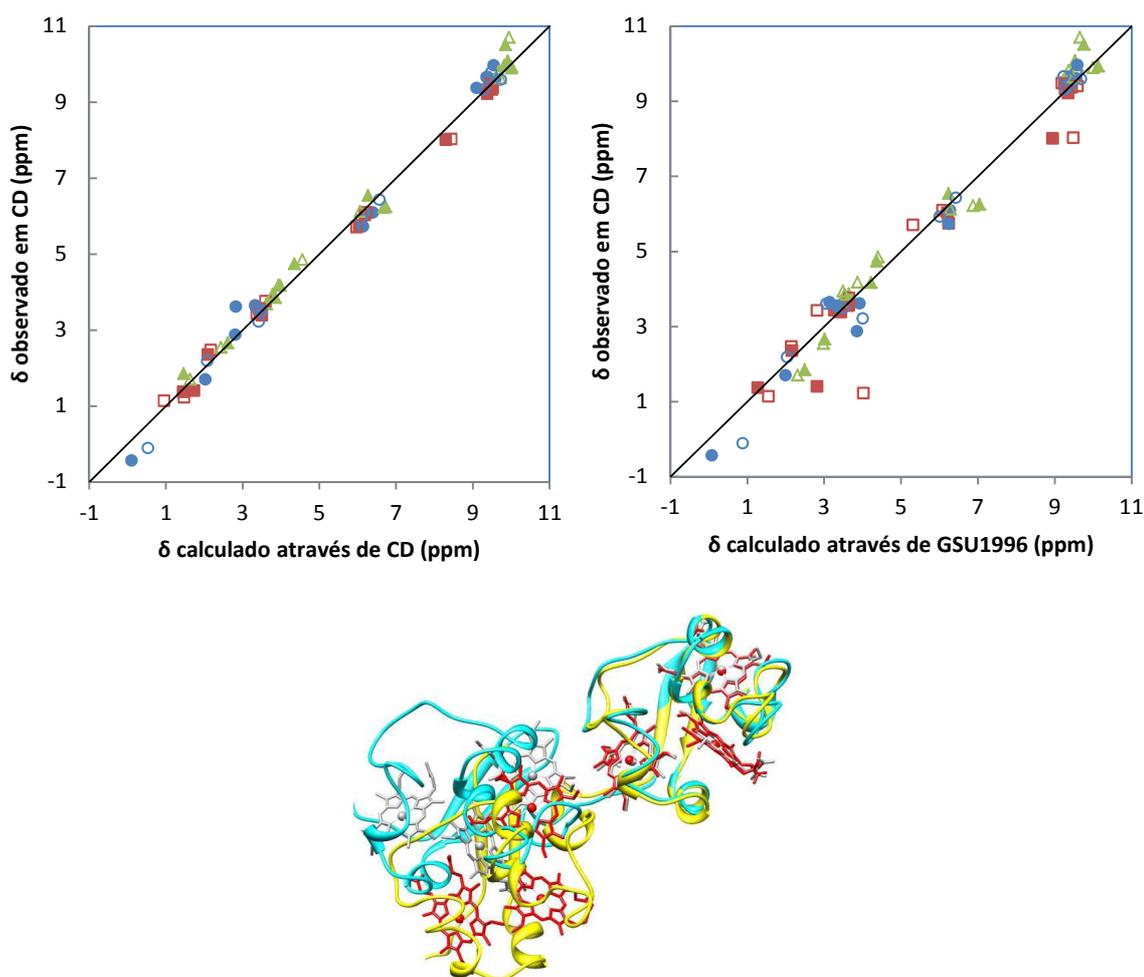
Tal como nos domínios individuais, todas as conectividades foram observadas nos espectros de 2D  $^1\text{H}$ -NOESY, confirmando a semelhança entre as estruturas obtidas por cristalografia de raios-X e em solução.

A atribuição foi também testada por comparação dos desvios químicos e rcs observados com os calculados a partir das estruturas obtidas por cristalografia de raios-X do fragmento CD e do GSU1996 (Tabela A4, no Anexo 2). Os desvios correlacionam bastante bem, mesmo para os prótons sujeitos aos efeitos de corrente de anel mais elevados (Figura 36).

**Tabela 16** – Desvios químicos observados dos substituintes hêmicos do fragmento CD no estado reduzido a pH 8,0 e 16°C. Entre parêntesis encontram-se os rcs.

	Domínio	Substituinte hémico	$\delta/\text{ppm}$					
			Grupo hemo					
			I		III		IV	
Fragmento CD	C	5H	9,47	(-0,11)	9,93	(-0,57)	9,65	(-0,29)
	D		9,47	(-0,11)	9,89	(-0,53)	9,65	(-0,29)
	C	10H	8,00	(1,36)	10,08	(-0,72)	9,60	(-0,24)
	D		8,02	(1,34)	9,63	(-0,27)	9,58	(-0,22)
	C	15H	9,36	(0,00)	9,96	(-0,60)	9,96	(-0,60)
	D		9,32	(0,04)	9,81	(-0,45)	9,78	(-0,42)
	C	20H	9,21	(0,15)	10,51	(-1,15)	9,36	(0,00)
	D		9,40	(-0,04)	10,70	(-1,34)	9,32	(0,04)
	C	2 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,56	(-0,08)	4,74	(-1,26)	3,61	(-0,13)
	D		3,75	(-0,27)	4,85	(-1,37)	3,55	(-0,07)
	C	7 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,43	(0,05)	4,17	(-0,69)	3,64	(-0,16)
	D		3,42	(0,06)	4,18	(-0,70)	3,60	(-0,12)
	C	12 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	1,40	(2,08)	3,87	(-0,39)	2,87	(0,61)
	D		1,22	(2,26)	3,85	(-0,37)	3,21	(0,27)
	C	18 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,38	(0,10)	3,68	(-0,20)	3,51	(-0,03)
	D		3,55	(-0,07)	3,94	(-0,46)	3,49	(-0,01)
	C	3 <sup>1</sup> H	6,02	(0,11)	6,25	(-0,12)	5,72	(0,41)
	D		6,09	(0,04)	6,22	(-0,09)	5,92	(0,21)
	C	8 <sup>1</sup> H	5,74	(0,39)	6,54	(-0,41)	6,09	(0,04)
	D		5,70	(0,43)	6,12	(0,01)	6,42	(-0,29)
	C	3 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	2,35	(-0,23)	2,66	(-0,54)	1,69	(0,43)
	D		2,46	(-0,34)	2,54	(-0,42)	2,18	(-0,06)
	C	8 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	1,36	(0,76)	1,85	(0,27)	-0,44	(2,56)
	D		1,13	(0,99)	1,70	(0,42)	-0,12	(2,24)

Como já foi referido, a cristalografia de raios-X mostrou que, tanto no fragmento CD como no GSU1996, os domínios C e D parecem ser relativamente independentes do ponto de vista estrutural. No entanto, a disposição espacial destes domínios no fragmento hexa-hémico e no GSU1996 demonstrou ser bastante diferente, como também mencionado. Assim, no GSU1996 estes domínios seguem uma curvatura, enquanto no fragmento CD estão dispostos de forma linear (Figura 36). Isto resulta em alterações nas distâncias inter-hêmicas e em ângulos entre planos (Tabela 3 na secção 1.2.1.1.1), as quais explicam as diferenças encontradas entre os desvios observados e os calculados a partir do GSU1996, especialmente no grupo hemo I.



**Figura 36** – Comparação entre os desvios químicos observados e calculados para todos os substituintes hémicos dos grupos hemo I ( $\square$ ), III ( $\Delta$ ) e IV ( $\circ$ ) no fragmento CD (domínios C e D representados, respectivamente, por símbolos a cheio e vazios). Os desvios observados foram comparados com os calculados através das estruturas obtidas por cristalografia de raios-X do fragmento CD (em cima, à esquerda) e do citocromo GSU1996 (em cima, à direita). A linha sólida representa a recta de declive unitário. Em baixo, apresenta-se a sobreposição do fragmento CD (amarelo) com o citocromo GSU1996 (cyan).

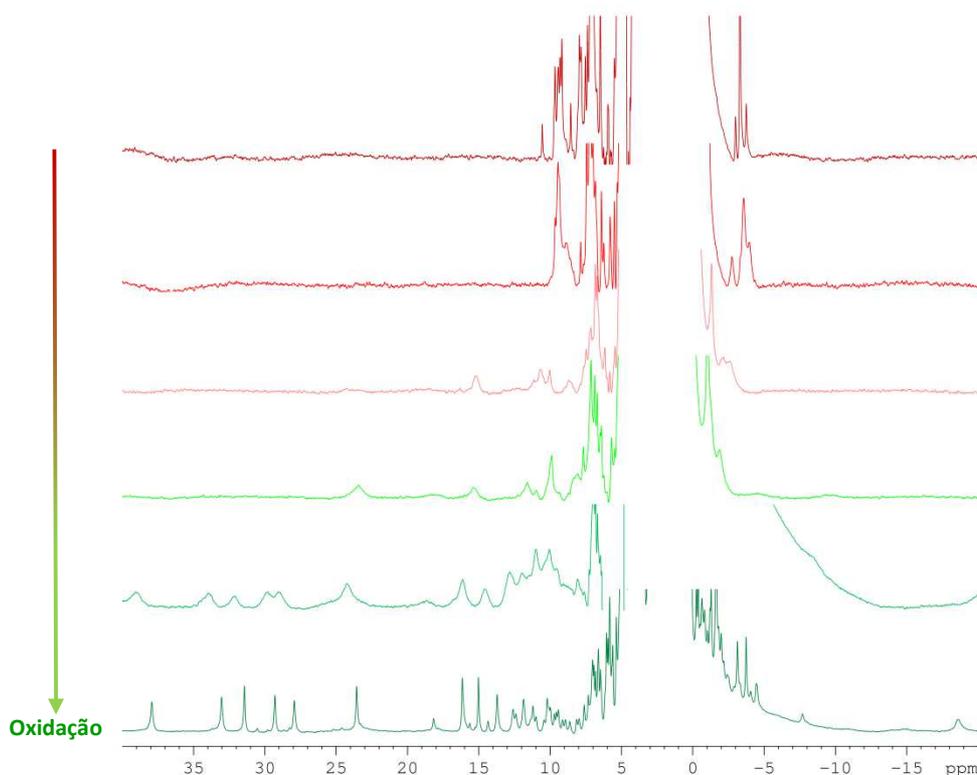
### 3.2.2 2D $^1\text{H}$ -EXSY – Ordem de oxidação dos grupos hemo

A atribuição dos sinais aos substituintes hémicos abre caminho para se prosseguir na caracterização microscópica das proteínas em estudo. Tendo em conta a complexidade do fragmento CD e a eficácia da abordagem modular, a caracterização de cada um dos domínios individuais C e D é essencial para se obter informação acerca deste citocromo. Assim, o domínio C foi anteriormente caracterizado por Morgado *et al.* [1], sendo o passo seguinte a caracterização microscópica do domínio D.

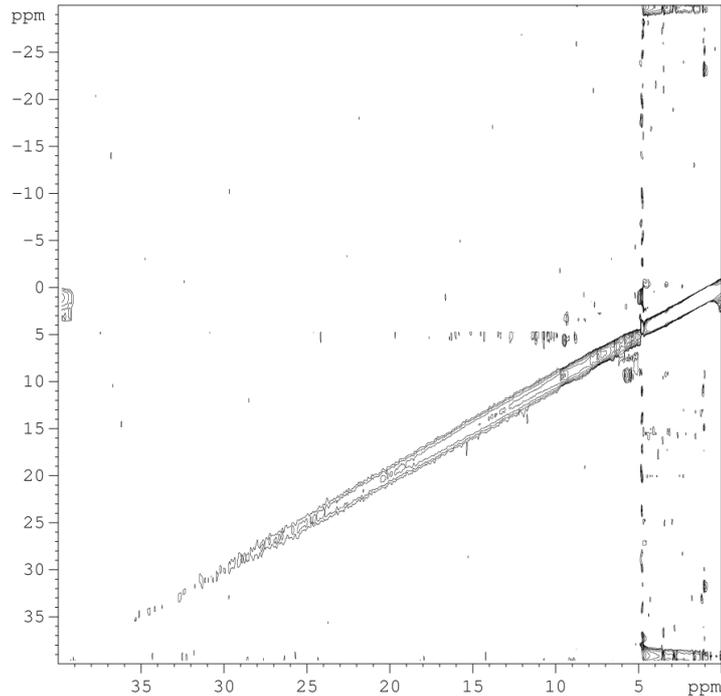
Como já foi referido, os grupos hemo nos domínios são tipicamente de baixo-*spin*, quer no estado reduzido, quer no estado oxidado. Esta característica é vantajosa em estudos de RMN,

uma vez que permite a aquisição de espectros bem resolvidos em ambos os estados de oxidação (ver Figura 24 na secção 3.2.1.1), facilitando a atribuição dos sinais dos substituintes hémicos e a determinação da ordem de oxidação dos grupos hemo nas proteínas.

As titulações de oxidação-redução do domínio D, a pH 8,0 e 16°C, seguidas por experiências de 1D  $^1\text{H}$ -RMN, apresentam-se na Figura 37. Contudo, a atribuição dos sinais a cada grupo hemo nos diferentes estados de oxidação através dos espectros 1D  $^1\text{H}$ -RMN é complexo, pelo que os perfis de reoxidação foram seguidos por experiências 2D  $^1\text{H}$ -RMN, nomeadamente através de experiências de 2D  $^1\text{H}$ -EXSY. Como é possível observar no exemplo da Figura 38, os espectros obtidos não apresentaram quaisquer NOE entre os substituintes hémicos nos diferentes estados de oxidação. Assim, o regime de permuta electrónica intermolecular (entre diferentes estados de oxidação) no domínio D é rápida na escala de tempo de RMN, não permitindo seguir os sinais provenientes dos metilos hémicos através dos quatro estados de oxidação e inviabilizando a sua caracterização microscópica nestas condições experimentais. Assim, futuramente, será necessário testar condições como pH, temperatura, força iónica ou tampão da solução de forma a conseguir efectuar a sua caracterização e permitir avanços na caracterização microscópica do fragmento CD.

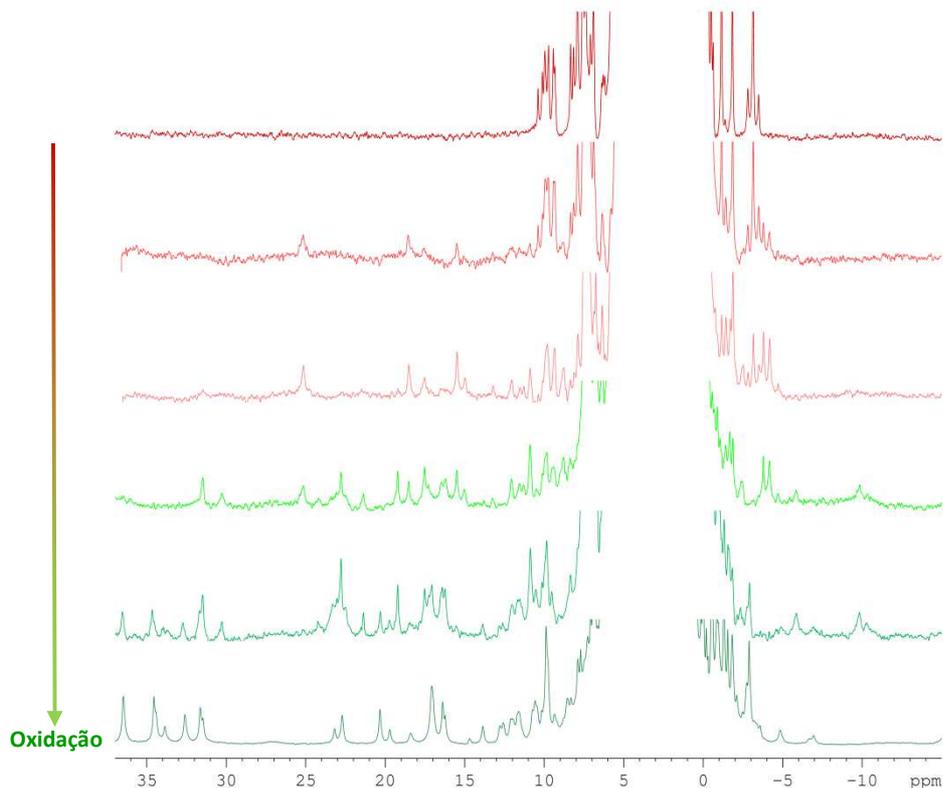


**Figura 37** – Perfil de reoxidação do domínio D a 16°C e pH 8,0, seguido por 1D  $^1\text{H}$ -RMN, desde a forma completamente reduzida (espectro superior) até à forma completamente oxidada (espectro inferior).



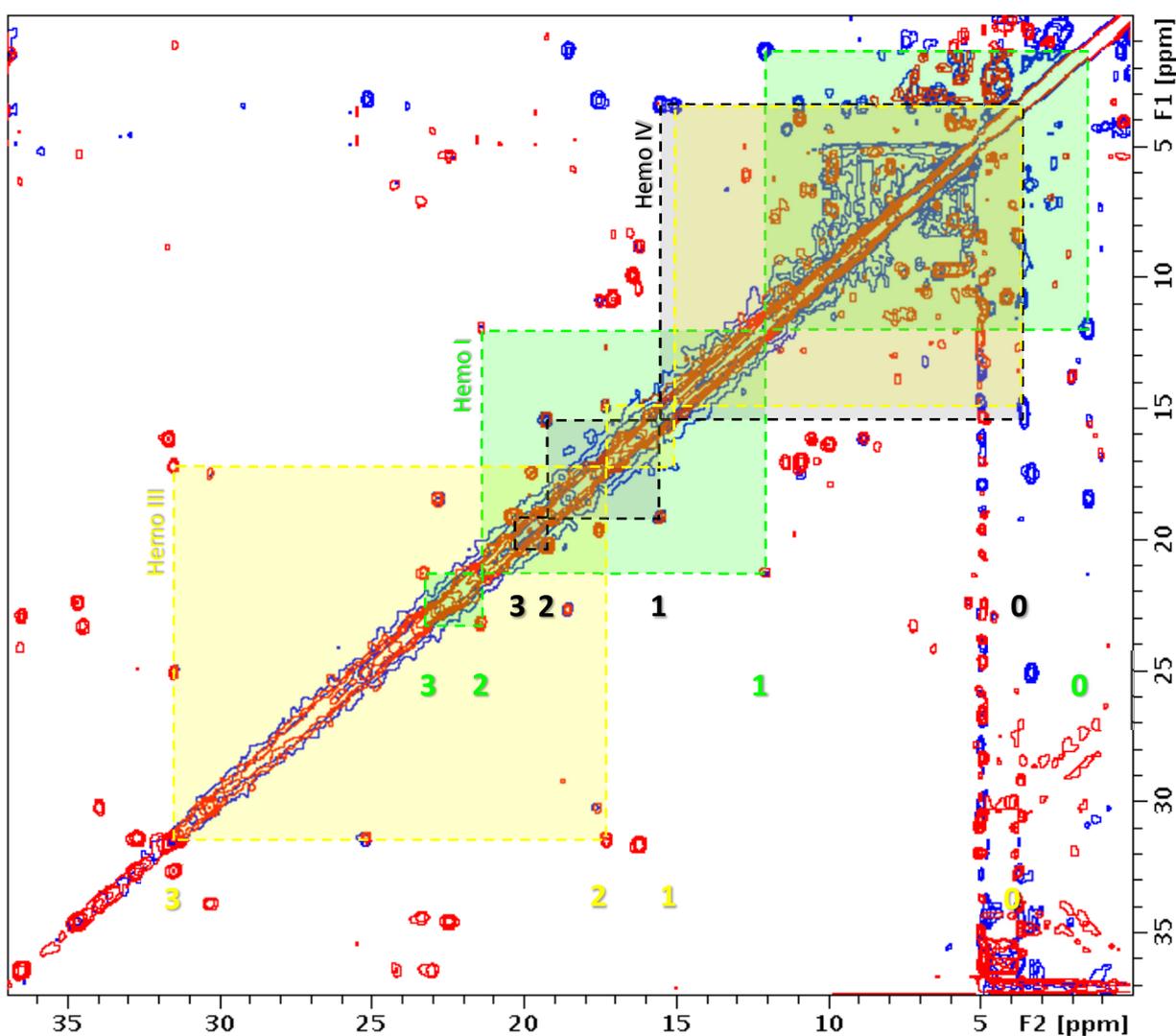
**Figura 38** – Expansão de um dos espectros de 2D  $^1\text{H}$ -EXSY adquirido para o domínio D parcialmente oxidado, a pH 8,0 e 16°C.

Uma vez que não foi possível concluir a caracterização microscópica do fragmento C-terminal do GSU1996, iniciou-se o estudo do fragmento N-terminal, com o domínio A purificado anteriormente. As titulações de oxidação-redução do domínio A, a pH 8,0 e 16°C, seguidas por experiências de 1D  $^1\text{H}$ -RMN, encontram-se na Figura 39.



**Figura 39** – Perfil de reoxidação do domínio A a 16°C e pH 8,0, seguido por 1D  $^1\text{H}$ -RMN, desde a forma completamente reduzida (espectro superior) até à forma completamente oxidada (espectro inferior).

Neste caso, os espectros adquiridos com experiências de 2D  $^1\text{H}$ -EXSY mostram que, nas condições experimentais deste trabalho, o domínio A apresenta permuta intramolecular rápida e intermolecular lenta na escala de tempo de RMN, uma vez que os sinais provenientes dos metilos hémicos podem ser seguidos ao longo dos quatro estados de oxidação (Figura 40). As frações de oxidação em cada um dos diferentes estados foram determinadas a partir dos desvios químicos dos metilos hémicos nos diferentes estados de oxidação (Tabela 17). A análise da Tabela 17 mostra que o grupo hemo IV é o que sofre maior grau de oxidação no primeiro passo de oxidação-redução (71,3%; estado 1), seguindo-se o grupo hemo I (42,7%; estado 2) e, por último, o grupo hemo III (50,9%; estado 3).



**Figura 40** – Expansão e sobreposição de dois espectros de 2D  $^1\text{H}$ -EXSY de amostras parcialmente oxidadas de domínio A, a 16°C e pH 8,0. A azul apresenta-se o espectro com a amostra mais próxima do estado totalmente reduzido e a vermelho, com a mais próxima do estado totalmente oxidado. Na figura estão indicadas as conectividades resultantes da transferência electrónica intermolecular para os grupos metilo  $^{12}\text{CH}_3^{\text{I}}$  (verde),  $^{12}\text{CH}_3^{\text{III}}$  (amarelo) e  $^{18}\text{CH}_3^{\text{IV}}$  (preto) nos estados de oxidação 0-1-2-3.

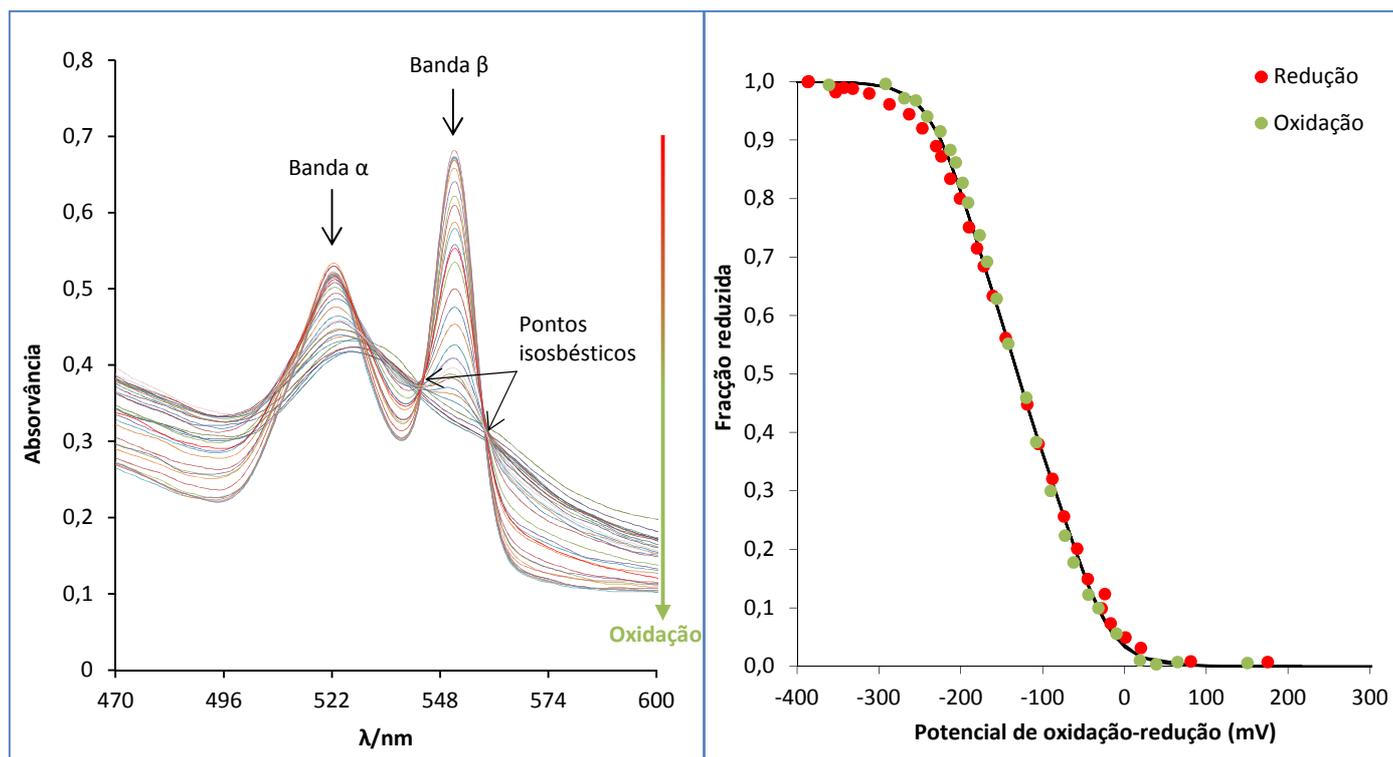
**Tabela 17** – Fracções de oxidação ( $\chi_i$ ) do domínio A. Foram utilizados os metilos hémicos  $12^1\text{CH}_3^{\text{I}}$ ,  $12^1\text{CH}_3^{\text{III}}$  e  $18^1\text{CH}_3^{\text{IV}}$  para monitorizar a oxidação de cada grupo hemo ao longo dos quatro estados de oxidação. As fracções de oxidação dos grupos hemo, em cada estado de oxidação, foram calculadas de acordo com a equação:  $\chi_i = (\delta_i - \delta_0) / (\delta_3 - \delta_0)$ , na qual  $\delta_i$ ,  $\delta_0$  e  $\delta_3$  são os desvios químicos observados nos metilos hémicos dos estados *i*, 0 e 3, respectivamente [78].

pH	Estado de oxidação	$\delta_i$ /ppm			$\chi_i$		
		Hemo I	Hemo III	Hemo IV	Hemo I	Hemo III	Hemo IV
8,0	0	1,43	3,56	3,51	0,00	0,00	0,00
	1	12,02	15,01	15,48	0,48	0,41	0,71
	2	21,34	17,27	19,20	0,91	0,49	0,94
	3	23,25	31,48	20,29	1,00	1,00	1,00

Esta ordem de oxidação diverge da observada no caso do domínio C, em que o grupo hemo III é o que sofre maior grau de oxidação no primeiro passo de oxidação-redução, seguindo-se o grupo hemo IV e, por último, o grupo hemo I [1]. No entanto, tal como no domínio C, o grupo hemo IV apresenta um potencial de redução inferior ao esperado. Tendo em consideração que os grupos hemo I e III apresentam coordenação axial bis-His, seria de esperar que estes apresentassem os menores potenciais de redução, ao contrário do grupo hemo IV que, teoricamente, deveria apresentar o potencial de redução mais elevado. De facto, os resíduos de histidina são caracteristicamente dadores de electrões, estabilizando o estado férrico. Por outro lado, os resíduos de metionina actuam como aceitadores, retirando electrões ao ião ferro do centro hémico e, logo, favorecendo o estado ferroso e potenciais de redução superiores aos observados quando os ligandos axiais são resíduos de histidinas [101].

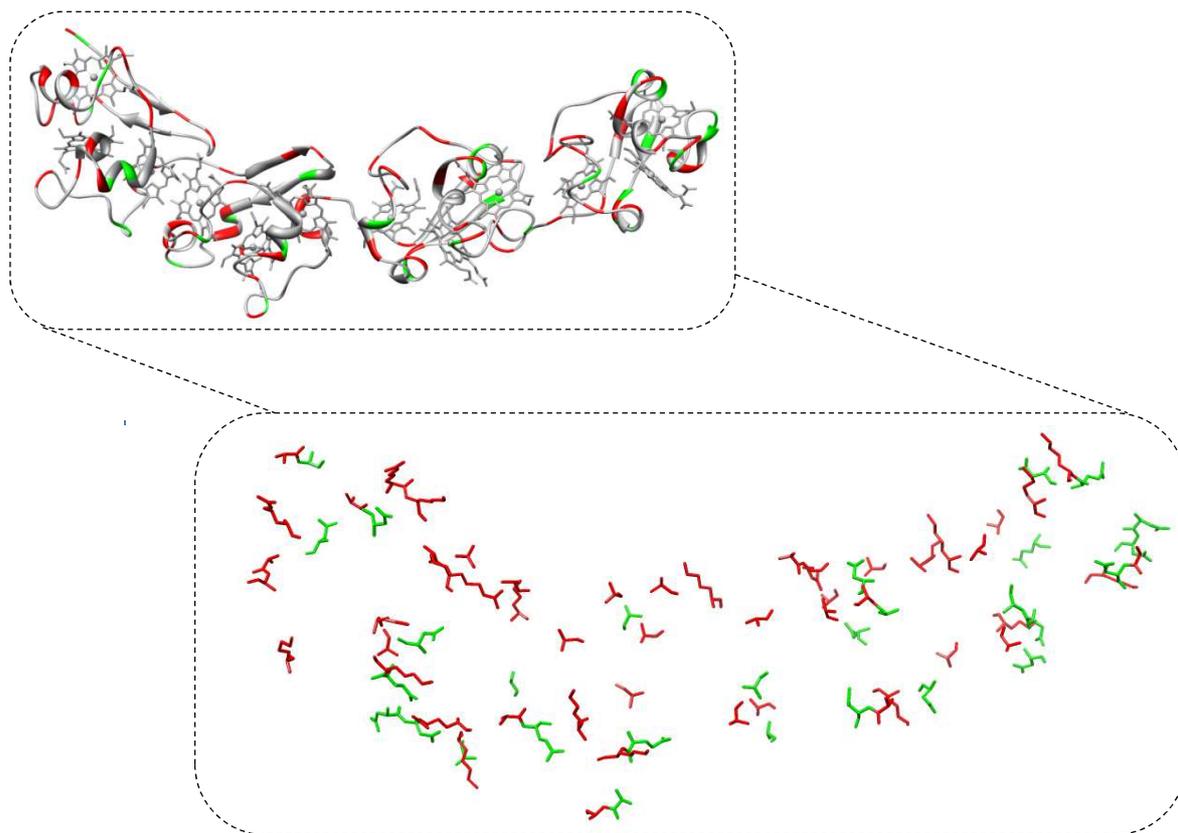
### 3.2.3 Titulações de oxidação-redução seguidas por espectroscopia de visível

As titulações de oxidação-redução seguidas por espectroscopia de UV-visível, conjuntamente com a informação obtida através experiências de 2D  $^1\text{H}$ -EXSY a diferentes valores de pH, são essenciais para permitir a caracterização microscópica de proteínas multi-hémicas. No entanto, no tempo disponível para a elaboração da presente tese não foi possível adquirir todas as experiências necessárias. Assim, apenas foi possível realizar uma titulação de oxidação-redução com o domínio A, seguida por espectroscopia de visível (Figura 41).



**Figura 41** – À esquerda, apresenta-se uma expansão da região das bandas  $\alpha$  e  $\beta$  no espectro de visível do domínio A, com os pontos isobécticos utilizados para os cálculos assinalados. À direita, mostra-se a titulação de oxidação-redução do domínio A a pH 8,0 e 16°C. Os círculos a vermelho representam o sentido da redução e os círculos a verde o da oxidação. A linha a cheio representa o *fitting* que resulta da aplicação da Equação 4, como descrito no procedimento experimental.

As curvas de oxidação e redução são sobreponíveis, indicando que nestas condições experimentais existe reversibilidade entre ambos os processos. O valor de  $E_{app}$  (valor a que as fracções reduzida e oxidada são iguais) é -130 mV, sendo muito semelhante ao do domínio D (-133 mV, Tabela 5 da secção 1.2.1.1.1), localizado na extremidade oposta da proteína GSU1996. A análise da estrutura do GSU1996 mostra que existe maior prevalência de cargas positivas no domínio A (Figura 42). Deste modo, do ponto de vista electrostático seria de esperar que o valor do potencial deste domínio fosse mais elevado que o do domínio D. Contudo, o valor determinado corresponde ao potencial de oxidação-redução macroscópico, não contendo, por conseguinte, informação acerca dos potenciais individuais dos grupos hemo. Esta é a razão pela qual uma discussão detalhada em termos estruturais apenas será possível após a conclusão da caracterização termodinâmica da proteína, a qual inclui a determinação dos potenciais de oxidação-redução de cada grupo hemo, bem como das suas interacções redox e redox-Bohr.



**Figura 42** – Representação esquemática dos resíduos de aminoácidos de carga positiva (vermelho) e negativa (verde) no citocromo GSU1996, estando os domínios A e D localizados, respectivamente, à esquerda e à direita.

## 4 CONCLUSÕES

Devido à abundância e aparente diversidade de processos em que os citocromos multi-hémicos se encontram implicados, a sua caracterização reveste-se de extrema importância. Deste modo, é necessário o desenvolvimento de metodologias que permitam o estudo destas proteínas.

Ao longo deste trabalho realizou-se a expressão heteróloga dos quatro domínios individuais (A a D) do GSU1996 de *Gs*, tendo sido otimizado o processo de expressão do domínio A. No entanto, não foi possível obter domínio B puro para posteriores estudos, uma vez que o processo de purificação utilizado demonstrou não ser o mais adequado.

A comparação entre os estudos uni e bi-dimensionais realizados por espectroscopia de RMN para os domínios C e D e fragmento CD, revelou que o ambiente químico em torno dos grupos hemo não é drasticamente alterado nos domínios individuais que constituem o fragmento. Assim, estes dados suportam a metodologia modular proposta para a caracterização do citocromo dodeca-hémico GSU1996.

Esta metodologia foi testada com sucesso, tendo sido realizada a atribuição de sinais ao fragmento hexa-hémico CD a partir dos domínios C e D. O fragmento CD é também, até à data, a maior proteína multi-hémica para a qual foi realizada a atribuição de sinais dos substituintes hémicos.

Esta foi a primeira vez que uma abordagem sequencial foi utilizada na atribuição de sinais dos grupos hémicos, provando ser uma promissora ferramenta para se obter informação sobre proteínas de grande dimensão e com elevado número de grupos hemo.

Neste trabalho foi ainda determinado o potencial de oxidação-redução macroscópico do domínio A. Embora seja muito semelhante ao do domínio D, este não revela as suas características microscópicas. Deste modo, a determinação dos potenciais de oxidação-redução de cada grupo hemo, bem como das suas interações redox e redox-Bohr serão essenciais para elucidar as características de ambos os domínios A e D aqui estudados e, conseqüentemente, do GSU1996.

## 5 TRABALHO FUTURO

No decurso do presente trabalho foi possível contribuir para a implementação de uma metodologia com vista ao estudo de proteínas multi-hémicas de grandes dimensões com estrutura modular. Assim, os próximos passos deverão incidir na conclusão da caracterização funcional dos domínios individuais do GSU1996, bem como do seu fragmento CD. Uma nova etapa consistirá na optimização do processo de purificação do domínio B, afim de permitir a sua caracterização bem como a dos fragmentos AB e BC.

O conjunto das informações obtidas a partir dos domínios e fragmentos poderá então constituir os alicerces necessários para a caracterização dos centros redox do citocromo dodeca-hémico GSU1996.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Morgado, L., Fernandes, A.P., Londer, Y.Y., Pokkuluri, P.R., Schiffer, M. & C.A. Salgueiro, *Thermodynamic characterization of the redox centres in a representative domain of a novel c-type multiheme cytochrome*. *Biochem J*, 2009. **420**(3): p. 485-92.
2. Morgado, L., Fernandes, A.P., Dantas, J.M., Silva, M.A. & C.A. Salgueiro, *On the road to improve the bioremediation and electricity harvesting skills of G. sulfurreducens: functional and structural characterization of multiheme cytochromes*. Invited review submitted to *Biochem Soc Trans*, 2012.
3. Moss, G.P., *Nomenclature of tetrapyrroles. Recommendations 1986 IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN)*. *Eur J Biochem*, 1988. **178**(2): p. 277-328.
4. Skoog, D.A., F.J. Holler & T.A. Nieman, *Principles of instrumental analysis*. 5th ed. Saunders golden sunburst series. 1998, Philadelphia Orlando, Fla.: Saunders College Pub.; Harcourt Brace College Publishers.
5. Wüthrich, K., *NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel Lecture)*. *Journal of Biomolecular NMR*, 2003. **27**(1): p. 13-39.
6. Bond, D.R. & D.R. Lovley, *Electricity production by Geobacter sulfurreducens attached to electrodes*. *Appl Environ Microbiol*, 2003. **69**(3): p. 1548-55.
7. Morgado, L., J.M. Dantas, M. Bruix, Y.Y. Londer & C.A Salgueiro, *Fine-tuning of redox networks on multiheme cytochromes from Geobacter sulfurreducens drives physiological electron/proton energy transduction*. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2012. **2012**: 9 pages, Article ID 298739.
8. Pokkuluri, P.R., Y.Y. Londer, N.E.C. Duke, M. Pessanha, X. Yang, V. Orshonsky, L. Orshonsky, J. Erickson, Y. Zagyskiy, C.A. Salgueiro & M. Schiffer, *Structure of a novel dodecaheme cytochrome c from Geobacter sulfurreducens reveals an extended 12 nm protein with interacting hemes*. *J Struct Biol*, 2011. **174**(1): p. 223-33.
9. Pettersen, E.F., T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng & T.E. Ferrin, *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis*. *J Comput Chem*, 2004. **25**(13): p. 1605-12.
10. Lovley, D.R., *Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction*. *Microbiol Rev*, 1991. **55**(2): p. 259-87.
11. Thauer, R.K., A.K. Kaster, H. Seedorf, W. Buckel & R. Hedderich, *Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation*. *Nat Rev Microbiol*, 2008. **6**(8): p. 579-91.
12. Kato, S., K. Hashimoto & K. Watanabe, *Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi)conductive iron-oxide minerals*. *Environ Microbiol*, 2011. **14**(7): p. 1646-54.

13. Lettinga, G., *Anaerobic digestion and wastewater treatment systems*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1995. **67**(1): p. 3-28.
14. Coates, J.D., V.K. Bhupathiraju, L.A. Achenbach, M.J. McInerney & D.R. Lovley, *Geobacter hydrogenophilus*, *Geobacter chappellei* and *Geobacter grbiciae*, three new, strictly anaerobic, dissimilatory Fe(III)-reducers. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001. **51**(Pt 2): p. 581-8.
15. Snoeyenbos-West, O.L., K.P. Nevin, R.T. Anderson & D.R. Lovley, *Enrichment of Geobacter species in response to stimulation of Fe(III) reduction in sandy aquifer sediments*. *Microbial Ecology*, 2000. **39**(2): p. 153-67.
16. Lovley, D.R., *Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction*. *J Ind Microbiol*, 1995. **14**(2): p. 85-93.
17. Bond, D.R., D.E. Holmes, L.M. Tender & D.R. Lovley, *Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments*. *Science*, 2002. **295**(5554): p. 483-5.
18. Lovley, D.R., T. Ueki, T. Zhang, N.S. Malvankar, P.M. Shrestha, K.A. Flanagan, M. Aklujkar, J.E. Butler, L. Giloteaux, A.E. Rotaru, D.E. Holmes, A.E. Franks, R. Orellana, C. Risso & K.P. Nevin, *Geobacter: the microbe electric's physiology, ecology, and practical applications*. *Adv Microb Physiol*, 2011. **59**: p. 1-100.
19. Caccavo, F., Jr., D.J. Lonergan, D.R. Lovley, M. Davis, J.F. Stolz & M. McInerney, *Geobacter sulfurreducens sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism*. *Appl Environ Microbiol*, 1994. **60**(10): p. 3752-9.
20. Lloyd, J.R., V.A. Sole, C.V. van Praagh & D.R. Lovley, *Direct and Fe(II)-mediated reduction of technetium by Fe(III)-reducing bacteria*. *Appl Environ Microbiol*, 2000. **66**(9): p. 3743-9.
21. Lloyd, J.R., C. Leang, A.L. Hodges Myerson, M.V. Coppi, S. Cuifo, B. Methé, S.J. Sandler & D.R. Lovley, *Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic c-type cytochrome in Geobacter sulfurreducens*. *Biochem J*, 2003. **369**(Pt 1): p. 153-61.
22. Lin, W.C., M.V. Coppi & D.R. Lovley, *Geobacter sulfurreducens can grow with oxygen as a terminal electron acceptor*. *Appl Environ Microbiol*, 2004. **70**(4): p. 2525-8.
23. Nevin, K.P., H. Richter, S.F. Covalla, J.P. Johnson, T.L. Woodard, A.L. Orloff, H. Jia, M. Zhang & D.R. Lovley, *Power output and columbic efficiencies from biofilms of Geobacter sulfurreducens comparable to mixed community microbial fuel cells*. *Environ Microbiol*, 2008. **10**(10): p. 2505-14.
24. Yi, H., K.P. Nevin, B.C. Kim, A.E. Franks, A. Klimes, L.M. Tender & D.R. Lovley, *Selection of a variant of Geobacter sulfurreducens with enhanced capacity for current production in microbial fuel cells*. *Biosens Bioelectron*, 2009. **24**(12): p. 3498-503.
25. Methé, B.A., K.E. Nelson, J.A. Eisen, I.T. Paulsen, W. Nelson, J.F. Heidelberg, D. Wu, M. Wu, N. Ward, M.J. Beanan, R.J. Dodson, R. Madupu, L.M. Brinkac, S.C. Daugherty, R.T.

- DeBoy, A.S. Durkin, M. Gwinn, J.F. Kolonay, S.A. Sullivan, D.H. Haft, J. Selengut, T.M. Davidsen, N. Zafar, O. White, B. Tran, C. Romero, H.A. Forberger, J. Weidman, H. Khouri, T.V. Feldblyum, T.R. Utterback, S.E. van Aken, D.R. Lovley & C.M. Fraser, *Genome of Geobacter sulfurreducens: metal reduction in subsurface environments*. Science, 2003. **302**(5652): p. 1967-9.
26. Coppi, M.V., C. Leang, S.J. Sandler & D.R. Lovley, *Development of a genetic system for Geobacter sulfurreducens*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(7): p. 3180-7.
27. Moss, G.P., *Nomenclature of Tetrapyrroles*. Pure and Applied Chemistry, 1987. **59**(6): p. 779-832.
28. Moore, G.R. & G.W. Pettigrew, *Cytochromes c: evolutionary, structural, and physicochemical aspects*. Springer series in molecular biology. 1990, Berlin ; New York: Springer-Verlag. xvi, 478 p.
29. Pettigrew, G.W. & G.R. Moore, *Cytochromes c: biological aspects*. Springer series in molecular biology. 1987, Berlin ; New York: Springer-Verlag. 282 p.
30. Ambler, R.P., *Sequence variability in bacterial cytochromes c*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1058**(1): p. 42-7.
31. Dickerson, R.E., R. Timkovich & R.J. Almassy, *The cytochrome fold and the evolution of bacterial energy metabolism*. Journal of Molecular Biology, 1976. **100**(4): p. 473-91.
32. Weber, P.C., R.G. Bartsch, M.A. Cusanovich, R.C. Hamlin, A. Howard, S.R. Jordan, M.D. Kamen, T.E. Meyer, D.W. Weatherford, N. Xuong & F.R. Salemme, *Structure of cytochrome c': a dimeric, high-spin haem protein*. Nature, 1980. **286**(5770): p. 302-4.
33. Ambler, R.P., R.G. Bartsch, M. Daniel, M.D. Kamen, L. McLellan, T.E. Meyer & J. van Beeumen, *Amino acid sequences of bacterial cytochromes c' and c-556*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1981. **78**(11): p. 6854-7.
34. Coutinho, I.B. & A.V. Xavier, *Tetraheme cytochromes*. Methods Enzymol, 1994. **243**: p. 119-40.
35. Aragão, D., C. Frazão, L. Sieker, G.M. Sheldrick, J. LeGall & M.A. Carrondo, *Structure of dimeric cytochrome c<sub>3</sub> from Desulfovibrio gigas at 1.2 Å resolution*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2003. **59**(Pt 4): p. 644-53.
36. Seeliger, S., R. Cord-Ruwisch & B. Schink, *A periplasmic and extracellular c-type cytochrome of Geobacter sulfurreducens acts as a ferric iron reductase and as an electron carrier to other acceptors or to partner bacteria*. J Bacteriol, 1998. **180**(14): p. 3686-91.
37. Afkar, E. & Y. Fukumori, *Purification and characterization of triheme cytochrome c<sub>7</sub> from the metal-reducing bacterium, Geobacter metallireducens*. FEMS Microbiol Lett, 1999. **175**(2): p. 205-10.

38. Assfalg, M., L. Banci, I. Bertini, M. Bruschi & P. Turano, *800 MHz <sup>1</sup>H NMR solution structure refinement of oxidized cytochrome c<sub>7</sub> from Desulfuromonas acetoxidans*. Eur J Biochem, 1998. **256**(2): p. 261-70.
39. Michel, H., *Three-dimensional crystals of a membrane protein complex: The photosynthetic reaction centre from Rhodospseudomonas viridis*. Journal of Molecular Biology, 1982. **158**(3): p. 567-72.
40. Londer, Y.Y., P.R. Pokkuluri & M. Schiffer, *Functional expression of multiheme cytochromes c in E. coli*. PharmaGenomics, 2004. **4**: p. 24-30.
41. Mehta, T., M.V. Coppi, S.E. Childers & D.R. Lovley, *Outer membrane c-type cytochromes required for Fe(III) and Mn(IV) oxide reduction in Geobacter sulfurreducens*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(12): p. 8634-41.
42. Shelobolina, E.S., M.V. Coppi, A.A. Korenevsky, L.N. DiDonato, S.A. Sullivan, H. Konishi, H. Xu, C. Leang, J.E. Butler, B.C. Kim & D.R. Lovley, *Importance of c-Type cytochromes for U(VI) reduction by Geobacter sulfurreducens*. BMC Microbiol, 2007. **7**: p. 16.
43. Kim, B.C., C. Leang, Y.H. Ding, R.H. Glaven, M.V. Coppi & D.R. Lovley, *OmcF, a putative c-Type monoheme outer membrane cytochrome required for the expression of other outer membrane cytochromes in Geobacter sulfurreducens*. J Bacteriol, 2005. **187**(13): p. 4505-13.
44. Kim, B.C., X. Qian, C. Leang, M.V. Coppi & D.R. Lovley, *Two putative c-type multiheme cytochromes required for the expression of OmcB, an outer membrane protein essential for optimal Fe(III) reduction in Geobacter sulfurreducens*. J Bacteriol, 2006. **188**(8): p. 3138-42.
45. Esteve-Núñez, A., J. Sosnik, P. Visconti & D.R. Lovley, *Fluorescent properties of c-type cytochromes reveal their potential role as an extracytoplasmic electron sink in Geobacter sulfurreducens*. Environ Microbiol, 2008. **10**(2): p. 497-505.
46. Anderson, R.T., H.A. Vrionis, I. Ortiz-Bernad, C.T. Resch, P.E. Long, R. Dayvault, K. Karp, S. Marutzky, D.R. Metzler, A. Peacock, D.C. White, M. Lowe & D.R. Lovley, *Stimulating the in situ activity of Geobacter species to remove uranium from the groundwater of a uranium-contaminated aquifer*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(10): p. 5884-91.
47. Kerkhof, L.J., K.H. Williams, P.E. Long, L.R. McGuinness, *Phase Preference by Active, Acetate-Utilizing Bacteria at the Rifle, CO Integrated Field Research Challenge Site*. Environ Sci Technol, 2011. **45**(4): p. 1250-6.
48. Butler, J.E., N.D. Young & D.R. Lovley, *Evolution of electron transfer out of the cell: comparative genomics of six Geobacter genomes*. BMC Genomics, 2010. **11**: p. 40.

49. Ding, Y.H., K.K. Hixson, C.S. Giometti, A. Stanley, A. Esteve-Núñez, T. Khare, S.L. Tollaksen, W. Zhu, J.N. Adkins, M.S. Lipton, R.D. Smith, T. Mester & D.R. Lovley, *The proteome of dissimilatory metal-reducing microorganism Geobacter sulfurreducens under various growth conditions*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1764**(7): p. 1198-206.
50. Malvankar, N.S., T. Mester, M.T. Tuominen & D.R. Lovley, *Supercapacitors Based on c-type cytochromes using conductive nanostructured networks of living bacteria*. *Chemphyschem*, 2012. **13**(2): p. 463-468.
51. Pokkuluri, P.R., Y. Y. Londer, N.E. Duke, W.C. Long & M. Schiffer, *Structure of a novel c<sub>7</sub>-type three-heme cytochrome domain from a multidomain cytochrome c polymer*. *Protein Sci*, 2004. **13**(6): p. 1684-92.
52. Ding, Y.H., K.K. Hixson, M.A. Aklujkar, M.S. Lipton, R.D. Smith, D.R. Lovley & T. Mester, *Proteome of Geobacter sulfurreducens grown with Fe(III) oxide or Fe(III) citrate as the electron acceptor*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1784**(12): p. 1935-41.
53. Pokkuluri, P.R., Y.Y. Londer, X. Yang, N.E. Duke, J. Erickson, V. Orshonsky, G. Johnson, M. Schiffer, *Structural characterization of a family of cytochromes c<sub>7</sub> involved in Fe(III) respiration by Geobacter sulfurreducens*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1797**(2): p. 222-32.
54. Shi, L., T.C. Squier, J.M. Zachara & J.K. Fredrickson, *Respiration of metal (hydr)oxides by Shewanella and Geobacter: a key role for multihaem c-type cytochromes*. *Mol Microbiol*, 2007. **65**(1): p. 12-20.
55. Lovley, D.R., *Bug juice: harvesting electricity with microorganisms*. *Nat Rev Microbiol*, 2006. **4**(7): p. 497-508.
56. Londer, Y.Y., P.R. Pokkuluri, J. Erickson, V. Orshonsky & M. Schiffer, *Heterologous expression of hexaheme fragments of a multidomain cytochrome from Geobacter sulfurreducens representing a novel class of cytochromes c*. *Protein Expr Purif*, 2005. **39**(2): p. 254-60.
57. Londer, Y.Y., P.R. Pokkuluri, V. Orshonsky, L. Orshonsky & M. Schiffer, *Heterologous expression of dodecaheme "nanowire" cytochromes c from Geobacter sulfurreducens*. *Protein Expr Purif*, 2006. **47**(1): p. 241-8.
58. Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel, A. Bairoch, *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. The Proteomics Protocols Handbook*, J.M. Walker, Editor. 2005, Humana Press. p. 571-607.
59. Thöny-Meyer, L., *Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997. **61**(3): p. 337-76.

60. Turner, D.L., C.A. Salgueiro, T. Catarino, J. Legall & A.V. Xavier, *NMR studies of cooperativity in the tetrahaem cytochrome c<sub>3</sub> from Desulfovibrio vulgaris*. European Journal of Biochemistry, 1996. **241**(3): p. 723-731.
61. Turner, D.L., C.A. Salgueiro, J. LeGall & A.V. Xavier, *Structural studies of Desulfovibrio vulgaris ferrocyclochrome c<sub>3</sub> by two-dimensional NMR*. Eur J Biochem, 1992. **210**(3): p. 931-6.
62. Pessanha, M., L. Morgado, R.O. Louro, Y.Y. Londer, P.R. Pokkuluri, M. Schiffer & C.A. Salgueiro, *Thermodynamic characterization of triheme cytochrome PpcA from Geobacter sulfurreducens: evidence for a role played in e<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> energy transduction*. Biochemistry, 2006. **45**(46): p. 13910-7.
63. Feissner, R.E., C.L. Richard-Fogal, E.R. Frawley & R.G. Kranz, *ABC transporter-mediated release of a haem chaperone allows cytochrome c biogenesis*. Mol Microbiol, 2006. **61**(1): p. 219-31.
64. Choe, M. & W.S. Reznikoff, *Anaerobically expressed Escherichia coli genes identified by operon fusion techniques*. J Bacteriol, 1991. **173**(19): p. 6139-46.
65. Rose, R.E., *The nucleotide sequence of pACYC184*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(1): p. 355.
66. Arslan, E., H. Schulz, R. Zufferey, P. Künzler & L. Thöny-Meyer, *Overproduction of the Bradyrhizobium japonicum c-type cytochrome subunits of the cbb<sub>3</sub> oxidase in Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **251**(3): p. 744-7.
67. Londer, Y.Y., P.R. Pokkuluri, D.M. Tiede & M. Schiffer, *Production and preliminary characterization of a recombinant triheme cytochrome c<sub>7</sub> from Geobacter sulfurreducens in Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1554**(3): p. 202-11.
68. Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>a</sup> ed. 1989, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
69. Pessanha, M., Y.Y. Londer, W.C. Long, J. Erickson, P.R. Pokkuluri, M. Schiffer & C.A. Salgueiro, *Redox characterization of Geobacter sulfurreducens cytochrome c<sub>7</sub>: physiological relevance of the conserved residue F15 probed by site-specific mutagenesis*. Biochemistry, 2004. **43**(30): p. 9909-17.
70. Keeler, J., *Understanding NMR spectroscopy*. 2005, Chichester, England; Hoboken, NJ: Wiley. xv, 459 p.
71. Braun, W., C. Bösch, L.R. Brown, N. Go & K. Wüthrich, *Combined use of proton-proton overhauser enhancements and a distance geometry algorithm for determination of polypeptide conformations. Application to micelle-bound glucagon*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure, 1981. **667**(2): p. 377-396.

72. Orgel, L.E., *An introduction to transition-metal chemistry: ligand-field theory*. 1960, London New York, Methuen; Wiley. 180 p.
73. Wüthrich, K., *NMR in biological research: peptides and proteins*. 1976, Amsterdam New York: North-Holland Pub. Co.; American Elsevier Pub. Co. xii, 379 p.
74. Bertini, I. & C. Luchinat, *NMR of paramagnetic molecules in biological systems*. Physical bioinorganic chemistry series. 1986, Menlo Park, Calif.: Benjamin/Cummings Pub. Co. xvi, 319 p.
75. Wüthrich, K., *NMR of proteins and nucleic acids*. The George Fisher Baker non-resident lectureship in chemistry at Cornell University. 1986, New York: Wiley. xv, 292.
76. Elantak, L., O. Bornet, X. Morelli, A. Dolla & F. Guerlesquin, *Sequential NMR assignment of the ferri-cytochrome  $c_3$  from Desulfovibrio vulgaris Hildenborough*. J Biomol NMR, 2002. **23**(1): p. 69-70.
77. Santos, H., J.J. Moura, I. Moura, J. LeGall & A.V. Xavier, *NMR studies of electron transfer mechanisms in a protein with interacting redox centres: Desulfovibrio gigas cytochrome  $c_3$* . Eur J Biochem, 1984. **141**(2): p. 283-96.
78. Salgueiro, C.A., D.L. Turner, H. Santos, J. LeGall & A.V. Xavier, *Assignment of the redox potentials to the four haems in Desulfovibrio vulgaris cytochrome  $c_3$  by 2D-NMR*. FEBS Lett, 1992. **314**(2): p. 155-8.
79. Pessanha, M., L. Brennan, A.V. Xavier, P.M. Cuthbertson, G.A. Reid, S.K. Chapman, D.L. Turner & C.A. Salgueiro, *NMR structure of the haem core of a novel tetrahaem cytochrome isolated from Shewanella frigidimarina: identification of the haem-specific axial ligands and order of oxidation*. Febs Letters, 2001. **489**(1): p. 8-13.
80. Morgado, L., V.B. Paixão, C.A. Salgueiro & M. Bruix, *Backbone, side chain and heme resonance assignments of the triheme cytochrome PpcA from Geobacter sulfurreducens*. Biomol NMR Assign, 2011. **5**(1): p. 113-6.
81. Studier, F.W. & B.A. Moffatt, *Use of bacteriophage-T7 Rna-polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. Journal of Molecular Biology, 1986. **189**(1): p. 113-30.
82. Iobbi-Nivol, C., H. Crooke, L. Griffiths, J. Grove, H. Hussain, J. Pommier, V. Mejean & J.A. Cole, *A reassessment of the range of c-type cytochromes synthesized by Escherichia coli K-12*. FEMS Microbiol Lett, 1994. **119**(1-2): p. 89-94.
83. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Struhl, *Current protocols in molecular biology*, Greene Publishing Associates/Wiley Interscience, 1989, New York.

84. Hanahan, D. & F.R. Bloom, *Mechanisms of DNA transformation*, in *Escherichia coli and Salmonella cellular and molecular biology*, R.C.C.I.F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter & H.E. Umbarger (ed.), Editor. 1996, ASM Press: Washington, DC. p. 2449-59.
85. Bayer, M.E., *Adsorption of bacteriophages to adhesions between wall and membrane of Escherichia coli*. *Journal of Virology*, 1968. **2**(4): p. 346-56.
86. Muhlradt, P.F. & J. Menzel, *Outer membrane of Salmonella - sites of export of newly synthesized lipopolysaccharide on bacterial surface*. *European Journal of Biochemistry*, 1973. **35**(3): p. 471-81.
87. Rupley, J.A., *The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrate for lysozyme*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Mucoproteins and Mucopolysaccharides*, 1964. **83**(3): p. 245-55.
88. Vázquez-Laslop, N., H. Lee, R. Hu & A.A. Neyfakh, *Molecular sieve mechanism of selective release of cytoplasmic proteins by osmotically shocked Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2001. **183**(8): p. 2399-404.
89. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
90. Svasti, J. & B. Panijpan, *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. A simple explanation of why it works*. *Journal of Chemical Education*, 1977. **54**(9): p. 560.
91. Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson & D.C. Klenk, *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Analytical Biochemistry*, 1985. **150**(1): p. 76-85.
92. Glasoe, P.K. & F.A. Long, *Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide*. *Journal of Physical Chemistry*, 1960. **64**(1): p. 188-90.
93. Grande, H.J., A. van Berkel-Arts, J. Breghe, K. van Dijk & C. Veeger, *Kinetic properties of hydrogenase isolated from Desulfovibrio vulgaris (Hildenborough)*. *Eur J Biochem*, 1983. **131**(1): p. 81-8.
94. Fauque, G.D., Y.M. Berlier, M.H. Czechowski, B. Dimon, P.A. Lespinat & J. Legall, *A proton-deuterium exchange study of 3 types of Desulfovibrio hydrogenases*. *Journal of Industrial Microbiology*, 1987. **2**(1): p. 15-23.
95. Van Geet, A.L., *Calibration of methanol nuclear magnetic resonance thermometer at low temperature*. *Analytical Chemistry*, 1970. **42**(6): p. 679-680.

96. Van Geet, A.L., *Calibration of the methanol and glycol nuclear magnetic resonance thermometers with a static thermistor probe*. Analytical Chemistry, 1968. **40**(14): p. 2227-2229.
97. Pierattelli, R., L. Banci & D.L. Turner, *Indirect determination of magnetic susceptibility tensors in peroxidases: a novel approach to structure elucidation by NMR*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 1996. **1**(4): p. 320-329.
98. Messias, A.C., D.H. Kastrau, H.S. Costa, J. LeGall, D.L. Turner, H. Santos, A.V. Xavier, *Solution structure of Desulfovibrio vulgaris (Hildenborough) ferrocyclochrome c<sub>3</sub>: structural basis for functional cooperativity*. J Mol Biol, 1998. **281**(4): p. 719-39.
99. Louro, R.O., T. Catarino, J. LeGall, D.L. Turner & A.V. Xavier, *Cooperativity between electrons and protons in a monomeric cytochrome c<sub>3</sub>: the importance of mechano-chemical coupling for energy transduction*. Chembiochem, 2001. **2**(11): p. 831-837.
100. Paquete, C.M., D.L. Turner, R.O. Louro, A.V. Xavier & T. Catarino, *Thermodynamic and kinetic characterisation of individual haems in multicentre cytochromes c<sub>3</sub>*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1767**(9): p. 1169-79.
101. Ciferri, A. & A. Perico, *Ionic interactions in natural and synthetic macromolecules*. 2012, Hoboken, N.J.: Wiley. xviii, 852 p.

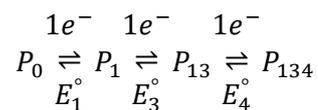
## ANEXOS

## Anexo 1

Como anteriormente referido, os diferentes microestados de um citocromo tri-hémico podem ser agrupados em quatro estados de oxidação macroscópicos ( $S_{0-3}$ ), ligados por três passos de oxidação-redução de um electrão cada e que contêm os microestados com o mesmo número de grupos hemo oxidados. Cada par de microestados (protonados ou desprotonados) está ligado por passos de oxidação-redução de um electrão, podendo ser descritos por um total de 24 equações de Nernst do tipo:

$$E = E^\circ + \frac{RT}{F} \ln \frac{ox}{red}$$

Em cada caso, três equações de Nernst relacionam os microestados no estado de oxidação 1 e os microestados no estado de oxidação 0; seis equações relacionam os microestados no estado de oxidação 2 e os microestados no estado de oxidação 1 e, finalmente, três equações de Nernst relacionam os microestados no estado de oxidação 3 e os microestados no estado de oxidação 2. Por exemplo, tomando por referência o microestado totalmente reduzido e considerando a oxidação sequencial dos grupos hemo I, III e IV (designados pelos números 1, 3 e 4, respectivamente) ao longo dos quatro estados de oxidação:



as três equações de Nernst relevantes, expressas como função de  $P_0$ , são:

$$E = E_1^\circ + \frac{RT}{F} \ln \frac{P_1}{P_0} \Leftrightarrow P_1 = P_0 e^{\frac{(E - E_1^\circ)F}{RT}}$$

$$E = E_3^\circ + \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{13}}{P_1} \Leftrightarrow P_{13} = P_0 e^{\frac{(2E - E_1^\circ - E_3^\circ)F}{RT}}$$

$$E = E_4^\circ + \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{134}}{P_{13}} \Leftrightarrow P_{134} = P_0 e^{\frac{(3E - E_1^\circ - E_3^\circ - E_4^\circ)F}{RT}}$$

em que os termos  $E$ ,  $E_1^\circ$ ,  $E_2^\circ$  e  $E_3^\circ$  representam, respectivamente, o potencial medido experimentalmente e o potencial padrão entre cada estado de oxidação;  $F$  representa a constante de Faraday;  $T$ , a temperatura e  $R$ , a constante dos gases ideais.

A fracção reduzida é obtida pela relação entre as espécies reduzidas e o total de espécies reduzidas e oxidadas. Assim, contabilizando os electrões presentes nos vários microestados, a fracção reduzida pode ser escrita da seguinte forma:

$$f_{reduzida} = \frac{3P_0 + 2P_1 + P_{13} + 0P_{134}}{3P_0 + 2P_1 + P_{13} + 0P_{134} + 0P_0 + P_1 + 2P_{13} + 3P_{134}}$$

$$\Leftrightarrow$$

$$f_{reduzida} = \frac{3P_0 + 2P_1 + P_{13}}{3(P_0 + P_1 + P_{13} + P_{134})}$$

Re-escrevendo como função dos diferentes potenciais, através da substituição de  $P_1$ ,  $P_{13}$  e  $P_{134}$  pelas três equações de Nernst acima descritas, obtém-se:

$$f_{reduzida} = \frac{3 + 2e^{\left[\frac{(E-E_1^\circ)F}{RT}\right]} + e^{\left[\frac{(2E-E_1^\circ-E_3^\circ)F}{RT}\right]}}{3\left(1 + e^{\left[\frac{(E-E_1^\circ)F}{RT}\right]} + e^{\left[\frac{(2E-E_1^\circ-E_3^\circ)F}{RT}\right]} + e^{\left[\frac{(3E-E_1^\circ-E_3^\circ-E_4^\circ)F}{RT}\right]}\right)}$$

## Anexo 2

**Tabela A1** – Desvios químicos dos substituintes hémicos no domínio A calculados a partir das estruturas obtidas por cristalografia de raios-X do fragmento AB e do GSU1996. Entre parêntesis encontram-se os rcs.

Substituinte hémico	Fragmento AB						GSU1996					
	$\delta/\text{ppm}$						$\delta/\text{ppm}$					
	I		III		IV		I		III		IV	
5H	9,07	(0,29)	9,98	(-0,62)	9,17	(0,19)	9,12	(0,24)	9,91	(-0,55)	9,34	(0,02)
10H	9,00	(0,37)	9,61	(-0,25)	9,82	(-0,46)	8,90	(0,46)	9,52	(-0,16)	9,98	(-0,62)
15H	9,43	(-0,07)	9,39	(-0,03)	9,47	(-0,11)	9,43	(-0,07)	9,55	(-0,19)	9,61	(-0,25)
20H	9,30	(0,06)	9,60	(-0,24)	7,61	(1,75)	9,32	(0,04)	9,94	(-0,58)	7,95	(1,41)
2 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,42	(0,07)	4,35	(-0,87)	2,41	(1,07)	3,44	(0,04)	4,75	(-1,27)	2,46	(1,02)
7 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	2,91	(0,57)	3,90	(-0,42)	2,86	(0,62)	2,88	(0,60)	3,81	(-0,33)	3,33	(0,15)
12 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,80	(-0,32)	3,69	(-0,21)	4,21	(-0,73)	3,84	(-0,36)	3,54	(-0,06)	4,22	(-0,74)
18 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,46	(0,02)	3,46	(0,02)	1,87	(1,61)	3,48	(0,00)	3,68	(-0,20)	2,38	(1,10)
3 <sup>1</sup> H	5,95	(0,18)	6,86	(-0,73)	6,00	(0,14)	6,03	(0,10)	6,76	(-0,63)	6,01	(0,12)
8 <sup>1</sup> H	5,77	(0,36)	6,55	(-0,42)	6,34	(-0,21)	5,52	(0,61)	6,32	(-0,19)	7,06	(-0,93)
3 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	2,01	(0,11)	3,04	(-0,92)	1,84	(0,28)	2,03	(0,09)	3,13	(-1,01)	1,77	(0,36)
8 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	0,56	(1,56)	2,60	(-0,48)	0,14	(1,98)	0,73	(1,39)	2,39	(-0,27)	1,57	(0,55)

**Tabela A2** – Desvios químicos dos substituintes hêmicos no domínio C calculados a partir das estruturas obtidas por cristalografia de raios-X do domínio C, do fragmento CD e do GSU1996. Entre parêntesis encontram-se os rcs.

Substituinte hémico	Domínio C					
	$\delta/\text{ppm}$					
	Grupo hemo					
	I		III		IV	
5H	9,43	(-0,07)	10,03	(-0,67)	9,34	(0,03)
10H	8,26	(1,11)	9,82	(-0,46)	9,60	(-0,24)
15H	9,48	(-0,12)	9,60	(-0,24)	9,54	(-0,18)
20H	9,41	(-0,05)	9,79	(-0,43)	9,28	(0,08)
2 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,50	(-0,02)	4,37	(-0,89)	3,42	(0,06)
7 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,40	(0,08)	3,90	(-0,42)	3,28	(0,20)
12 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	1,60	(1,88)	3,79	(-0,31)	2,85	(0,63)
18 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,50	(-0,02)	3,60	(-0,12)	3,50	(-0,02)
3 <sup>1</sup> H	6,18	(-0,05)	6,80	(-0,67)	6,09	(0,04)
8 <sup>1</sup> H	5,97	(0,16)	6,14	(-0,01)	6,28	(-0,15)
3 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	2,09	(0,03)	2,63	(-0,51)	2,07	(0,05)
8 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	1,17	(0,95)	1,47	(0,65)	-0,04	(2,16)

Substituinte hémico	Fragmento CD					
	$\delta/\text{ppm}$					
	Grupo hemo					
	I		III		IV	
5H	9,45	(-0,09)	10,01	(-0,65)	9,39	(-0,03)
10H	8,29	(1,07)	9,90	(-0,54)	9,59	(-0,23)
15H	9,52	(-0,16)	9,81	(-0,45)	9,54	(-0,18)
20H	9,38	(-0,02)	9,85	(-0,49)	9,10	(0,26)
2 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,44	(0,04)	4,34	(-0,86)	2,83	(0,66)
7 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,44	(0,04)	3,97	(-0,49)	3,32	(0,16)
12 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	1,73	(1,75)	3,79	(-0,31)	2,81	(0,67)
18 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,51	(-0,03)	3,61	(-0,13)	3,42	(0,06)
3 <sup>1</sup> H	6,19	(-0,06)	6,72	(-0,59)	6,14	(-0,01)
8 <sup>1</sup> H	6,03	(0,10)	6,26	(-0,13)	6,40	(-0,27)
3 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	2,09	(0,03)	2,61	(-0,49)	2,03	(0,10)
8 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	1,45	(0,67)	1,45	(0,67)	0,10	(2,02)

Substituinte hémico	GSU1996					
	$\delta/\text{ppm}$					
	Grupo hemo					
	I		III		IV	
5H	9,26	(0,10)	10,13	(-0,77)	9,38	(-0,02)
10H	8,95	(0,41)	9,53	(-0,17)	9,56	(-0,20)
15H	9,44	(-0,08)	9,57	(-0,21)	9,60	(-0,24)
20H	9,35	(0,01)	9,76	(-0,40)	9,40	(-0,04)
2 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,64	(-0,16)	4,37	(-0,89)	3,92	(-0,44)
7 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,27	(0,21)	4,22	(-0,74)	3,14	(0,34)
12 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	2,81	(0,67)	3,63	(-0,15)	3,86	(-0,38)
18 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,44	(0,04)	3,45	(0,03)	3,34	(0,14)
3 <sup>1</sup> H	6,21	(-0,08)	7,04	(-0,91)	6,25	(-0,12)
8 <sup>1</sup> H	6,24	(-0,11)	6,24	(-0,11)	6,28	(-0,15)
3 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	2,16	(-0,04)	3,01	(-0,89)	1,99	(0,13)
8 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	1,27	(0,85)	2,49	(-0,37)	0,08	(2,04)

**Tabela A3** – Desvios químicos dos substituintes hémicos no domínio D calculados a partir das estruturas obtidas por cristalografia de raios-X do fragmento CD e do GSU1996. Entre parêntesis encontram-se os rcs.

Substituinte hémico	Fragmento CD						GSU1996					
	$\delta/\text{ppm}$						$\delta/\text{ppm}$					
	I		III		IV		I		III		IV	
5H	9,47	(-0,11)	9,99	(-0,63)	9,36	(0,00)	9,19	(0,17)	10,00	(-0,64)	9,23	(0,13)
10H	8,44	(0,93)	9,71	(-0,35)	9,72	(-0,36)	9,49	(-0,13)	9,47	(-0,11)	9,69	(-0,33)
15H	9,50	(-0,14)	9,67	(-0,31)	9,49	(-0,13)	9,28	(0,09)	9,36	(0,00)	9,57	(-0,21)
20H	9,42	(-0,06)	9,94	(-0,58)	9,28	(0,08)	9,60	(-0,24)	9,65	(-0,29)	9,28	(0,09)
2 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,60	(-0,12)	4,55	(-1,07)	3,42	(0,06)	3,64	(-0,16)	4,40	(-0,92)	3,34	(0,14)
7 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,37	(0,11)	3,93	(-0,45)	3,34	(0,14)	2,81	(0,67)	3,86	(-0,38)	3,06	(0,42)
12 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	1,47	(2,01)	3,84	(-0,36)	3,42	(0,06)	4,03	(-0,55)	3,53	(-0,05)	4,00	(-0,52)
18 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,44	(0,04)	3,78	(-0,30)	3,49	(-0,01)	3,63	(-0,15)	3,49	(-0,01)	3,50	(-0,02)
3 <sup>1</sup> H	6,23	(-0,10)	6,67	(-0,54)	6,10	(0,03)	6,09	(0,05)	6,87	(-0,74)	6,01	(0,12)
8 <sup>1</sup> H	5,97	(0,16)	6,05	(0,08)	6,56	(-0,43)	5,31	(0,82)	6,28	(-0,15)	6,43	(-0,30)
3 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	2,17	(-0,05)	2,43	(-0,31)	2,08	(0,04)	2,14	(-0,02)	2,98	(-0,86)	2,04	(0,08)
8 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	0,95	(1,17)	1,62	(0,50)	0,53	(1,59)	1,56	(0,56)	2,31	(-0,19)	0,88	(1,24)

**Tabela A4** – Desvios químicos dos substituintes hémicos no fragmento CD calculados a partir das estruturas obtidas por cristalografia de raios-X do fragmento CD e do GSU1996. Entre parêntesis encontram-se os rcs.

	Substituinte hémico	Fragmento CD						GSU1996						
		$\delta/ppm$						$\delta/ppm$						
		Grupo hemo		Grupo hemo		Grupo hemo		Grupo hemo		Grupo hemo		Grupo hemo		
		I	III	IV			I	III	IV			I	III	IV
Domínio	C 5H	9,45	(-0,09)	10,01	(-0,65)	9,39	(-0,03)	9,26	(0,10)	10,13	(-0,77)	9,38	(-0,02)	
	D	9,47	(-0,11)	9,99	(-0,63)	9,36	(0,00)	6,19	(0,17)	10,00	(-0,64)	9,23	(0,13)	
	C 10H	8,29	(1,07)	9,90	(-0,54)	9,59	(-0,23)	8,95	(0,41)	9,53	(-0,17)	9,56	(-0,20)	
	D	8,44	(0,93)	9,71	(-0,35)	9,72	(-0,36)	9,49	(-0,13)	9,47	(-0,11)	9,69	(-0,33)	
	C 15H	9,52	(-0,16)	9,81	(-0,45)	9,54	(-0,18)	9,44	(-0,08)	9,57	(-0,21)	9,60	(-0,24)	
	D	9,50	(-0,14)	9,67	(-0,31)	9,49	(-0,13)	9,28	(0,09)	9,36	(0,00)	9,57	(-0,21)	
	C 20H	9,38	(-0,02)	9,85	(-0,49)	9,10	(0,26)	9,35	(0,01)	9,76	(-0,40)	9,40	(-0,04)	
	D	9,42	(-0,06)	9,94	(-0,58)	9,28	(0,08)	9,60	(-0,24)	9,65	(-0,29)	9,28	(0,09)	
	C 2 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,44	(0,04)	4,34	(-0,86)	2,83	(0,66)	3,64	(-0,16)	4,37	(-0,89)	3,92	(-0,44)	
	D	3,60	(-0,12)	4,55	(-1,07)	3,42	(0,06)	3,64	(-0,16)	4,40	(-0,92)	3,34	(0,14)	
	C 7 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,44	(0,04)	3,97	(-0,49)	3,32	(0,16)	3,27	(0,21)	4,22	(-0,74)	3,14	(0,34)	
	D	3,37	(0,11)	3,93	(-0,45)	3,34	(0,14)	2,81	(0,67)	3,86	(-0,38)	3,06	(0,42)	
	C 12 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	1,73	(1,75)	3,79	(-0,31)	2,81	(0,67)	2,81	(0,67)	3,63	(-0,15)	3,86	(-0,38)	
	D	1,47	(2,01)	3,84	(-0,36)	3,42	(0,06)	4,03	(-0,55)	3,53	(-0,05)	4,00	(-0,52)	
	C 18 <sup>1</sup> CH <sub>3</sub>	3,51	(-0,03)	3,61	(-0,13)	3,42	(0,06)	3,44	(0,04)	3,45	(0,03)	3,34	(0,14)	
	D	3,44	(0,04)	3,78	(-0,30)	3,49	(-0,01)	3,63	(-0,15)	3,49	(-0,01)	3,50	(-0,02)	
	C 3 <sup>1</sup> H	6,19	(-0,06)	6,72	(-0,59)	6,14	(-0,01)	6,21	(-0,08)	7,04	(-0,91)	6,25	(-0,12)	
	D	6,23	(-0,10)	6,67	(-0,54)	6,10	(0,03)	6,09	(0,05)	6,87	(-0,74)	6,01	(0,12)	
	C 8 <sup>1</sup> H	6,03	(0,10)	6,26	(-0,13)	6,40	(-0,27)	6,24	(-0,11)	6,24	(-0,11)	6,28	(-0,15)	
	D	5,97	(0,16)	6,05	(0,08)	6,56	(-0,43)	5,31	(0,82)	6,28	(-0,15)	6,43	(-0,30)	
C 3 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	2,09	(0,03)	2,61	(-0,49)	2,03	(0,10)	2,16	(-0,04)	3,01	(-0,89)	1,99	(0,13)		
D	2,17	(-0,05)	2,43	(-0,31)	2,08	(0,04)	2,14	(-0,02)	2,98	(-0,86)	2,04	(0,08)		
C 8 <sup>2</sup> CH <sub>3</sub>	1,45	(0,67)	1,45	(0,67)	0,10	(2,02)	1,27	(0,85)	2,49	(-0,37)	0,08	(2,04)		
D	0,95	(1,17)	1,62	(0,50)	0,53	(1,59)	1,56	(0,56)	2,31	(-0,19)	0,88	(1,24)		