

Etude des hémoprotéines senseurs à oxygène bactériens FixL et Dos.

Latifa Bouzhir

▶ **To cite this version:**

Latifa Bouzhir. Etude des hémoprotéines senseurs à oxygène bactériens FixL et Dos.. Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole Polytechnique X, 2006. Français. NNT : . pastel-00002324

HAL Id: pastel-00002324
https://pastel.hal.science/pastel-00002324

Submitted on 28 Jul 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE L'ECOLE POLYTECHNIQUE

Spécialité :

Biologie

par

Latifa Bouzhir

Pour obtenir le titre de docteur de L'Ecole Polytechnique

Sujet:

Etude des hémoprotéines senseurs à oxygène bactériens FixL et Dos

Soutenue le 20 Novembre 2006 devant le jury composé de:

Professeur Marie-Claude Trombe	Rapporteur
Docteur Wolfgang Nitschke	Rapporteur
Docteur Ursula Liebl	Directeur de thèse
Docteur Laurent Kiger	
Professeur Jean-Louis Martin	

Laboratoire d'Optique et Biosciences,
INSERM U696, CNRS UMR 7645, Ecole Polytechnique, ENSTA

A

Maman

Yasmine et Ylian

Remerciements

Ce travail a été réalisé à l'Ecole Polytechnique dans le Laboratoire d'Optique et Biosciences dirigé par le Professeur Jean-Louis Martin que je remercie infiniment de m'avoir donné l'opportunité d'accomplir ce travail et accepté de faire partie de mon jury de thèse.

J'exprime mes sincères remerciements à Madame Marie-Claude Trombe et Monsieur Wolfgang Nitschke pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que pour l'intérêt manifesté lors de la lecture de mon manuscrit. Je tiens également à remercier Monsieur Laurent Kiger d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Je souhaite exprimer ma gratitude à Ursula Liebl et Marten Vos pour avoir encadré ce travail avec autant de compétence et de patience. Je tiens également à remercier Ursula pour la confiance qu'elle m'a témoignée depuis le début de ce travail.

Merci à Michel Nègrerie dont l'aide sur le plan technique, la correction du manuscrit, ses grandes qualités humaines et son soutien se sont avérés déterminants pour mener ce travail à terme.

Merci à Jean-Christophe Lambry pour ses conseils et sa participation aux modélisations moléculaires.

Merci également à Annie Slama-Schwok et à Martin-Pierre Sauviat pour tous leurs conseils, leur disponibilité et leur sympathie à mon égard. Et pour m'avoir tenu compagnie au labo de nombreux samedis.

Un grand merci à Andreea Sodolescu, Frederic Escartin et Taku Yamashita pour leur aide technique et leurs conseils judicieux dans la préparation et la mise en page du manuscrit.

Merci à toute l'équipe technique : André Campos (pour les soucis informatiques) Marcel Bierry, Jean-Marc Sintes et Xavier Solinas pour les dépannages quotidiens au laboratoire. Laure Lachapelle, Christelle Français pour les tracas administratifs, Isabelle Lamarre, Claude Hamel sans oublier

Françoise Petrequin pour tous les bons moments passés ensembles et leur soutien dans les moments difficiles de fin de thèse.

Je remercie enfin toutes les personnes que j'ai côtoyées et que je côtoie encore au laboratoire pour leur sympathie et leur bonne humeur: Antigoni, Adeline, Marie-Claire, Manuel, Emmanuel, François, Guilhem, Pierre-Louis, Audrius, Véronique, Ana-Maria, Delphine, Jean-Baptiste, Didier, Claire, Liêm, Monica, Thomas, Laurène, Edward, Nicolas, Alexandre, sans oublier la fameuse promotion 2001-2005 : Anne, Gérard, Clément, Sébastien, Thierry, Thibault.

Mais tout ceci n'aurait pas pu être réalisé si Geneviève Nguyen ne m'avait pas donné une chance et cru en moi en Avril 1996, et intégrée dans son équipe avec le Professeur Jean-Daniel Sraer. Mes débuts dans la recherche avec elle ont été de grands moments de plaisir et de découverte. Je ne la remercierai jamais assez, qu'elle trouve ici ma profonde reconnaissance.

Merci également à Sandrine, Jeannig, Sophie, Françoise, Mme Ardaillou et au professeur Ardaillou, anciens collègues de l'Unité INSERM 489 (Hôpital Tenon).

Je remercie enfin tous les membres de ma famille sans qui ce travail n'aurait jamais été réalisé et plus particulièrement à Maman qui a toujours été là quand j'en avais besoin.

Abréviations utilisées

Aa	acide aminé
Ab	anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
Ag	antigène
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
APS	ammonium persulfate
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
BET	bromure d'éthidium
*Bj*FixL	protéine entière FixL de *Bradyrhizobium japonicum*
*Bj*FixLH	hémodomaine de FixL de *Bradyrhizobium japonicum*
Bph	bactériophytochrome
BSA	sérum albumine bovine
Cc	cytochrome *c*
CcO	cytochrome *c* oxydase
CN	cyanure
CO	monoxyde de carbone
DNase	désoxyribonucléase
DTT	dithiothréitol
*Ec*Dos	protéine entière de Dos (Direct oxygen sensor) *d'Escherichia coli*
*Ec*DosH	hémodomaine de Dos *d'Escherichia coli*
EDTA	éthylène-diamine-tétra-acétate
FeS	centre fer-soufre
FMN	flavine mononucléotide
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
diGMPc	di-guanosine monophosphate cyclique
NO	monoxyde d'azote
Ns, ps, fs	nanoseconde, picoseconde, femtoseconde
O_2	dioxygène
PA5442	protéine de fonction inconnue de *Pseudomonas aeruginosa*
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Base
Pi	phosphate inorganique
PMSF	phénylméthylsulfonyl fluoride
pO_2	pression partielle en oxygène
Qsp	quantité suffisante pour
*Rm*FixL	protéine entière de FixL de *Rhizobium meliloti*
RNase	ribonucléase
ARNm	acide ribonucléique messager
SDS	sodium dodécyl sulfate
TAE	Tris –Acetate- EDTA
TE	Tris - EDTA
Tm	'melting temperature'
Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane hydrochloride
UV/vis	ultraviolet /visible

TABLES DES MATIERES

I-Introduction **1**

1.1. Les systèmes de régulation à deux composants *2*
1.1.1. Définition et distribution 2
1.1.2. Mécanisme de transduction du signal 2

1.2. Les domaines PAS *5*
1.2.1. Les domaines PAS senseurs 8

1.3. Les senseurs à hème *8*
1.3.1. Rôle physiologique 8
1.3.2. De la molécule diatomique aux messagers physiologiques 10
a) Le fer et l'hème 10
b) Le monoxyde de carbone 11
c) Le monoxyde d'azote (NO) 11
d) Le dioxygène 12
1.3.3. La guanylate cyclase - hémosenseur à NO 12
1.3.4. Les hémosenseurs à CO 13

1.4. Les hémosenseurs à oxygène *14*
1.4.1. La protéine *Ax*PDEA1 14
1.4.2. Le senseur à oxygène rhizobien FixL 16
1.4.2.1. Les gènes *nif* et *fix* 17
1.4.2.2. Le système à deux composants FixL/FixJ 19
1.4.2.3. Organisation en domaine de FixL 20
1.4.2.4. Structure de *Bj*FixLH 21
1.4.2.5. Signalisation dans l'hémodomaine FixLH 22
1.4.3. Le senseur Dos d'*Escherichia coli* (*Ec*Dos) 25
1.4.3.1. Organisation en domaine 25
1.4.3.2. Le domaine senseur DosH 27
1.4.3.3. Structure de l'hémodomaine *Ec*DosH 27
1.4.3.4. Le site actif senseur 28
1.4.3.5. Rôle de Dos et partenaires d'interaction possibles 29

1.5. PA5442 de Pseudomonas aeruginosa, une nouvelle protéine senseur ? *30*
1.5.1. Description de *Pseudomonas aeruginosa* 30
1.5.2. Implications cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* 31
1.5.3. Biofilms et oxygène 31
1.5.4. Un senseur à hème dans *P. aeruginosa* 32

1.6. Problématique de la thèse *32*

II-Résultats et Discussion **34**

2.1. Etudes structure fonction de BjFixLH *34*
2.1.1. Clonage de *fixL*H 34
2.1.2. Expression et purification de FixLH 35
2.1.3. Caractérisation de FixLH purifiée 37
2.1.4. Analyses de FixLH par spectroscopie d'absorption à l'équilibre 38
2.1.5. Dynamique des ligands 40
2.1.6. Le domaine FixLH et l'interaction avec O_2 42
2.1.7. Etudes des mutants R220 de FixLH 46
2.1.7. Position de l'acide aminé R220 46
2.1.7.2. Construction des mutants R220 de FixLH 48
2.1.7.3. Analyse biochimique des produits mutés exprimés et purifiés. 48
2.1.7.4 Spectroscopie d'absorption à l'équilibre des mutants R220 49
2.1.7.5 Dynamique des ligands 51

2.2. Dos : une nouvelle protéine senseur d'Escherichia coli *55*
2.2.1. Clonage de l'hémodomaine DosH 56
2.2.2. Mutagenèse dirigée de M95 56
2.2.3. Expression et purification de DosH 57
2.2.4. Analyses par spectroscopie d'absorption à l'équilibre 59

2.3. Caractérisation des mutants M95A, M95I et M95H *60*
2.3.1. Analyse biochimique des produits exprimés et purifiés 60
2.3.2. Analyse par spectroscopie d'absorption 62
2.3.3. Dynamique des ligands dans DosHwt et les mutants M 95 63

2.4. Clonage et expression de la protéine entière EcDos *66*
2.4.1. Partenaires possibles de Dos 68

2.5. Un nouveau senseur à hème chez Pseudomonas aeruginosa ? *71*
2.5.1. Analyses *in silico* 71
2.5.2 Clonage du gène *pa5442* 73
2.5.3. Purification de la protéine PA5442 de *Pseudomonas aeruginosa* 73
2.5.4. Caractérisation spectroscopique 74

III-Conclusions et Perspectives 78

IV-Matériels et Méthodes 82

4.1. Matériels *82*
4.1.1. Origine des réactifs 82
4.1.2. Souches de bactéries utilisées 83
4.1.3. Milieux de culture 83
4.1.4. Les plasmides utilisés 84

4.2. Methodes *87*
4.2.1. Manipulation de l'ADN 87
4.2.1.1. Extraction de l'ADN génomique 87
4.2.1.2. Conditions d'amplification des gènes par PCR 88
4.2.1.3. Clonage des gènes amplifiés 89
4.2.1.4. Analyse des produits amplifiés 90
4.2.1.5. La transformation des produits clonés 91
4.2.1.6. Extraction et purification de l'ADN plasmidique 92
4.2.1.7. Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction 93
4.2.1.8. Vérification des constructions plasmidiques 94
4.2.1.9. Mutagenèse dirigée 94

4.2.2. Manipulation sur la protéine *95*
4.2.2.1. Système d'expression dans *Escherichia coli* 95
4.2.2.2. Expression des protéines et extraction 96
4.2.2.3. Purification des protéines 97
4.2.2.4. Détermination de la concentration protéique 97
4.2.2.5. Analyse qualitative des protéines purifiées 99
4.2.2.6. Immunoblot 100
4.2.2.7. Immunoprécipitation 102
4.2.2.8. Spectroscopie d'absorption 104

V-Références bibliographiques 106

VI-Annexes 118

1.Article I *118*

2.Article II *119*

3.Article III *120*

4. Article IV *121*
5. Article V *122*

Avant-propos

L'adaptation à différentes conditions d'oxygénation est vitale pour la plupart des organismes. Chez de nombreuses bactéries anaérobies facultatives, une baisse du niveau d'oxygène déclenche l'expression de gènes spécifiques, alors que chez les mammifères l'essentiel des processus cellulaires est sous contrôle de l'oxygène. Bien qu'il existe un fort intérêt pour les processus d'adaptation aux différentes conditions d'oxygénation, la compréhension des mécanismes biochimiques de la régulation de l'oxygène est récente. Un groupe de protéines 'senseurs à hème' a été récemment identifié dans lesquelles la liaison de l'oxygène induit des changements structuraux qui conduisent aux processus adaptatifs de l'activité d'autres protéines et aux modifications spécifiques de l'expression de gènes en conditions d'hypoxie. La connaissance des processus biochimiques par l'intermédiaire desquels ces adaptations sont réalisées est essentielle. En effet, au niveau moléculaire, la régulation de l'activité catalytique dépend de façon directe de la structure protéique et de la dynamique des ligands imposée par cette structure. Les mécanismes impliqués sont étroitement associés aux propriétés de la protéine. La compréhension de cette régulation et des mécanismes réactionnels intraprotéiques est donc indispensable pour évaluer l'action d'un effecteur ou ligand et la perturbation engendrée par une mutation et constitue une étape nécessaire pour comprendre le fonctionnement d'une protéine. C'est dans cette perspective que j'ai étudié la fixation de l'oxygène sur le domaine senseur et les mécanismes dynamiques qui correspondent au "fonctionnement" de deux senseurs à oxygène bactériens, FixL et Dos.

Ces deux protéines étudiées dans la thématique « Réponse adaptative à l'hypoxie » sont impliquées dans la régulation /transduction du signal et font partie des études développées dans le Laboratoire d'Optique et Biosciences, dirigé par J.-L. Martin. J'ai développé ce projet sous la responsabilité de Ursula Liebl. Dans un premier temps j'ai mis en place et optimisé toutes les techniques (PCR, clonage, surexpression, purification, caractérisation biochimique) nécessaires à l'obtention des domaines senseurs isolés FixLH et DosH. L'objectif de ma thèse a été de poursuivre par une approche multidisciplinaire (microbiologie, biologie moléculaire et biochimie associées aux spectroscopies d'absorption résolue en temps et Raman) les analyses structure-fonctions de ces deux protéines senseurs (collaboration avec M. Vos, M. Nègrerie, V. Balland CEA/Saclay).

Une telle approche a permis la mise en évidence de mécanismes inattendus et propres à ces deux hémoprotéines, qui seront décrites et discutés dans cette thèse. Après avoir décrit

les protéines étudiées et les processus dans lesquels elles interviennent, je décrirai tout d'abord leur caractérisation biochimique ainsi que leur purification qui m'a ensuite permis leur étude spectroscopique dont je détaillerai les résultats.

I-Introduction

L'adaptation à l'environnement est essentielle pour la survie de tout organisme, des bactéries à l'Homme. Pour s'adapter rapidement aux milieux extrêmement variés et aux fluctuations environnementales, les procaryotes ont adopté des systèmes élaborés, capables de détecter et de réagir aux molécules vitales ou toxiques à leur développement. Outre les facteurs de stress tels que température, pH, la cellule doit s'adapter aux variations de concentration de nutriments et de gaz diatomiques.

En effet, la modification d'un ou plusieurs paramètres de l'environnement déclenche une altération de l'expression des gènes, permettant des changements dans la composition protéique et ainsi une adaptation du métabolisme aux nouvelles conditions. Un paramètre environnemental particulièrement essentiel est le taux d'oxygène. Le passage à la vie limitée en oxygène, ou inversement, a été particulièrement étudié chez les bactéries. Celles-ci disposent de plusieurs chaînes de transporteurs d'électrons et utilisent à tout moment celle qui leur est la plus favorable sur le plan énergétique. En présence d'oxygène, accepteur d'électrons le plus favorable, les bactéries utilisent la respiration oxygènée, qui se caractérise par la synthèse d'enzymes du type cytochrome oxydase, alors qu'en absence d'oxygène ou en condition de basse pression d'oxygène (ou hypoxie), elles mettent en place la respiration par le nitrate, caractérisée par la synthèse de quinones respiratoires comme intermédiaires (Pelmont J., 1993). Le transporteur final de la voie « nitrate » est la nitrate réductase, enzyme clé inhibée par l'oxygène. La présence d'oxygène diatomique impose donc aux bactéries de profonds changements de leur métabolisme, soit parce qu'elles doivent réajuster leur système de production d'énergie, soit parce qu'elles doivent lutter contre la toxicité de l'oxygène ; pour cela elles disposent de tout un arsenal enzymatique. La connaissance des processus biochimiques par l'intermédiaire desquels ces adaptations sont réalisées est essentielle à la compréhension du fonctionnement cellulaire.

Très souvent, différents facteurs de stress agissent sur une bactérie simultanément et affectent des processus cellulaires, nécessitant l'interaction de systèmes variés de réponse et de régulation. Ces composants de régulation incluent, par exemple, des protéines se liant à l'ADN ou l'ARN, des petites molécules, et souvent des systèmes de régulation à deux composants

(‘two-component regulatory systems’ ou ‘TCS ‘), responsables de la régulation de l’expression de nombreux gènes.

1.1. Les systèmes de régulation à deux composants

1.1.1. Définition et distribution

Historiquement, le terme « système à deux composants » a été utilisé la première fois pour décrire une nouvelle classe de systèmes régulateurs chez les procaryotes (Nixon *et coll.*, 1986, Stock *et coll.*, 1989 ; Parkinson *et coll.*, 1992; Hoch *et coll.*, 1995). A ce jour, plusieurs centaines de systèmes à deux composants ont été décrits chez la plupart des organismes vivants : chez les Archaea et les eubactéries (Alex & Simon, 1994 ; Loomis *et coll.,* 1997 ; Bourret *et coll*., 1989) et chez des organismes eucaryotes où ils constituent 1% des protéines codées (West *et coll.,* 2001), comme dans la plante *Arabidopsis thaliana* où ils jouent un rôle dans la régulation de l’utilisation de l’éthylène (Chang *et coll.,* 1999) et la levure *Saccharomyces cerevisiae* où ils interviennent dans l’osmorégulation (Ota & Varshavsky, 1993). Ces exemples laissent à penser qu’un mode de transmission de certains signaux similaires à celui des bactéries pourrait être aussi présent chez les organismes eucaryotes. Les systèmes à deux composants représentent la forme majoritaire des voies de signalisation cellulaire chez les bactéries et plus de 30 de ces systèmes ont été répertoriés uniquement chez *Escherichia coli* (West *et coll.,* 2001; Mizuno *et coll.,* 1997). Ils sont présents chez des bactéries Gram-négatives et Gram-positives dans des fonctions aussi différentes que le chimiotactisme (Bischoff & Ordal, 1991), la compétence (Weinrauch *et coll.,* 1990), l’osmorégulation (EnvZ/OmpR) (Stock *et coll.,* 1989 ; Parkinson *et coll.,* 1992; Hoche *et coll.,* 1995) et la sporulation (Burbulys *et coll.,* 1991), et contrôlent en plus la régulation de l’expression de toxines et de protéines impliquées dans la pathogénicité (virulence, résistance aux antibiotiques).

1.1.2. Mécanisme de transduction du signal

Un système de transduction du signal fonctionne comme une voie d’information intracellulaire qui relie un stimulus extérieur à une réponse adaptative. En dépit de la grande diversité du nombre des stimuli et des réponses, un petit nombre de stratégies moléculaires est mis en œuvre pour la signalisation. La phosphorylation transitoire est une des stratégies

fondamentales. Beaucoup de processus de transduction de signal eucaryotes impliquent des protéines kinases qui s'autophosphorylent et phosphorylent des résidus spécifiques d'autres protéines : sérine, thréonine, tyrosine, et de ce fait régulent leur activité. Dans la signalisation procaryote, les systèmes à deux composants dominent. Ils sont structurés autour de deux protéines conservées: une histidine kinase (HK) et un régulateur de réponse (RR). Les stimuli de l'environnement sont détectés par le domaine senseur de l'histidine kinase et provoquent l'activité enzymatique, par autophosphorylation ATP-dépendante d'un résidu spécifique histidine (H) dans l'histidine kinase. Le régulateur de réponse catalyse ensuite le transfert d'un groupe phosphate à partir de l'histidine phosphorylé vers son propre résidu aspartate. La phosphorylation du domaine de RR active alors un domaine effecteur qui induit une réponse spécifique.

La Figure 1.1 est une représentation schématisée d'un système à deux composants procaryote typique.

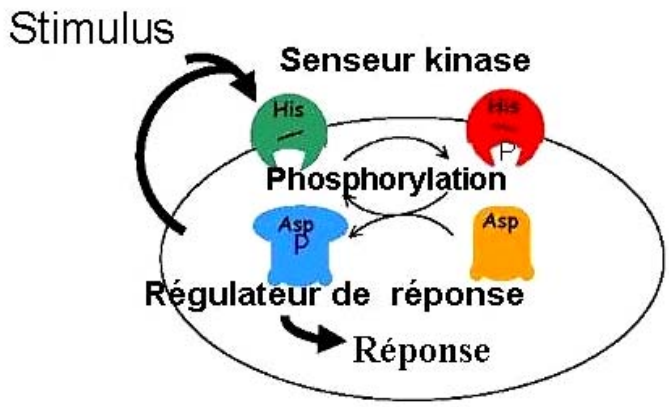


Figure 1.1: Représentation schématisée d'un système à deux composants bactérien. La présence d'un stimulus induit l'autophosphorylation ATP-dépendante d'un résidu histidine (His) dans la « protéine senseur ». Le groupe phosphate est ensuite transféré de façon spécifique sur un résidu aspartate (Asp) dans la protéine régulatrice de réponse. Le régulateur de réponse, ainsi phosphorylé, va pouvoir jouer son rôle d'effecteur et déclencher la réponse spécifique au stimulus détecté.

La plupart des régulateurs de réponse sont des facteurs de transcription, qui modifient la fonction des protéines ou l'expression de gènes cibles, favorisant ainsi l'adaptation de la bactérie aux conditions environnementales (Stock *et coll.,* 1989). Dans quelques cas, il a été montré que l'activité histidine-kinase de la protéine senseur et l'activité de la protéine effectrice

sont portées par la même molécule. Dans d'autres cas, au contraire, trois protéines distinctes catalysent les activités sensorielles, protéine-kinase et effectrice (West *et coll.*, 2001).

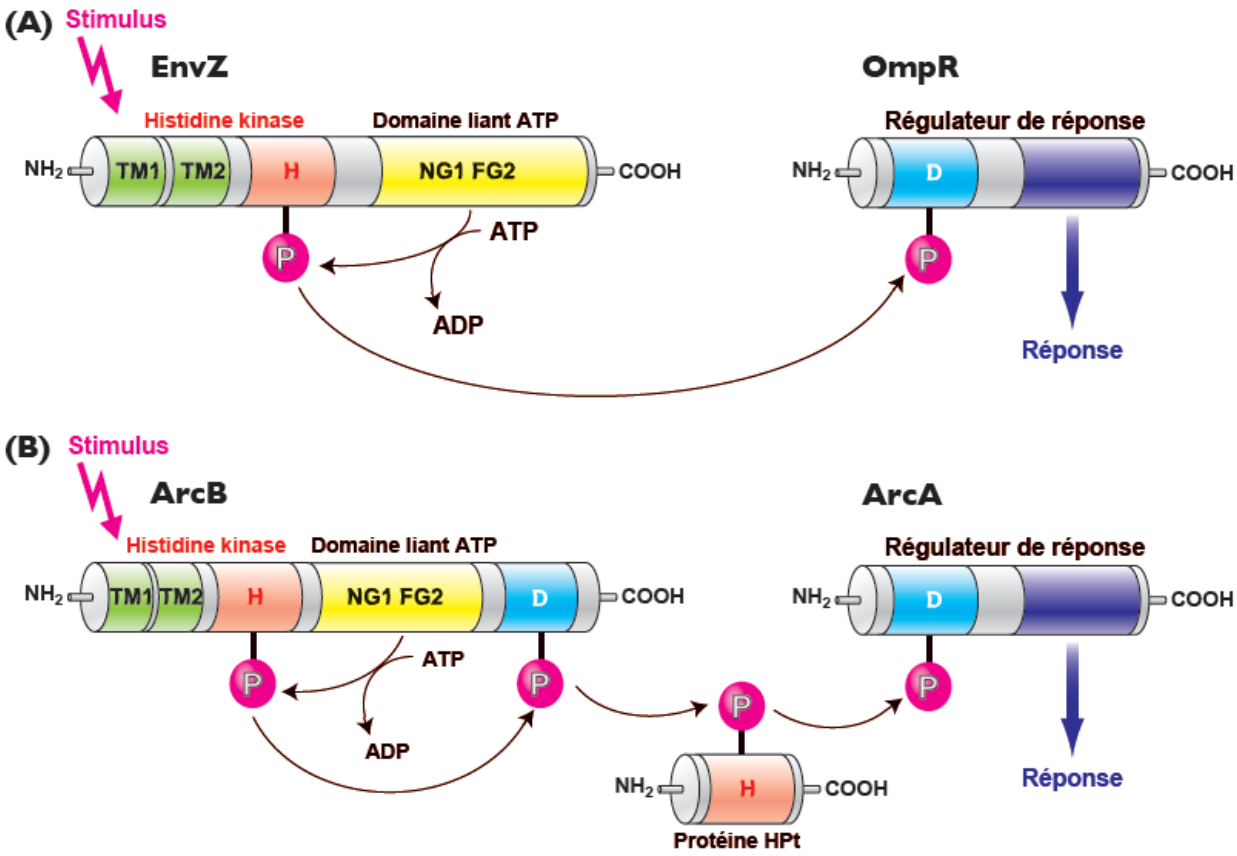


Figure 1.2 : Représentation détaillée du mécanisme de phosphorelai dans deux types de systèmes à deux composants bactériens bien caractérisés. **(A)** Système typique de transfert de phosphates à deux composants (EnvZ/OmpR d'*E. coli*), consistant en un senseur à histidine kinase transmembranaire dimérique (HK) et un régulateur de réponse cytoplasmique (RR). Le monomère représentatif de HK est désigné par des segments transmembranaires TM1 et TM2. Une séquence conservée N, G1, F, G2 est localisée dans le domaine liant l'ATP. HK catalyse l'autophosphorylation ATP-dépendante d'un résidu spécifique histidine (H). Le groupe phosphate (P) est alors transféré vers un résidu spécifique aspartate (D), localisé dans le domaine régulateur conservé du RR (d'après West *et coll.*, 2001). **(B)** Système de phosphorylation à composants multiples (ArcB/ArcA d'*E. coli*), qui commence souvent avec une HK hybride, un domaine RR additionnel en C-terminal. Il y a dans ce cas plus d'une réaction de transfert de phosphate histidine vers l'aspartate et le schéma implique une protéine HPt (histidine phosphotransférase) intermédiaire (Perraud *et coll.*, 1999).

Le système EnvZ/OmpR d' *E. coli* (Figure 1.2A), impliqué dans la réponse à un changement de l'osmolarité, est représentatif du schéma basique retrouvé dans la plupart des systèmes à deux composants. Après deux segments transmembranaires TM1 et TM2, la partie C-terminale de la protéine senseur histidine kinase (HK), EnvZ (correspondant à la région catalytique de la protéine) comporte deux domaines. Le premier contient le résidu histidine, site de l'autophosphorylation. Le deuxième domaine renferme une région conservée N G1 F G2 liant l'ATP qui est utilisée pour la phosphorylation du résidu histidine. Le groupe phosphate est ensuite transféré sur un résidu aspartate conservé du domaine régulateur (région N-terminale) de la protéine régulatrice de réponse (RR) OmpR. La région C-terminale de OmpR (domaine effecteur) est un domaine de liaison à l'ADN et permet à la protéine de modifier l'expression de gènes cibles (ex : porines).

Un exemple plus complexe d'un système à deux composants, le système ArcB/ArcA d'*E. coli,* qui permet à cette bactérie d'assurer une réponse aux variations de la teneur en oxygène, est représenté dans la Figure 1.2B. Avant d'être transféré sur le résidu aspartate du RR ArcA, le groupe phosphate subit un transfert en cascade au sein de la protéine HK ArcB entre un premier résidu histidine, site de l'autophosphorylation, un résidu aspartate, et un deuxième résidu situé dans un domaine appelé HPt (« Histidine-containing Phosphotransferase »).

1.2. Les domaines PAS

Un grand nombre de protéines senseurs et facteurs de transcription à structures multidomaines, impliquées dans la transduction du signal, possèdent un domaine PAS. L'acronyme PAS a été utilisé à l'origine (Nambu *et coll.*, 1991) pour décrire une région de 270 acides aminés entourant deux régions répétées (PAS A et PAS B) de 50 résidus chacun, laquelle a été identifiée dans trois protéines pour la première fois : PER « **P**eriod circadian protein » chez la drosophile (Crews *et coll.*, 1988), ARNT « **A**ryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein » chez les vertébrés (Hoffman *et coll.,* 1991) et **S**IM « Single minded protein » chez la drosophile (Crews *et coll.,* 1988). Ces trois protéines (Figure 1.3) sont respectivement impliquées dans la régulation du rythme circadien, l'activation de la réponse xénobiotique et la détermination du devenir des cellules.

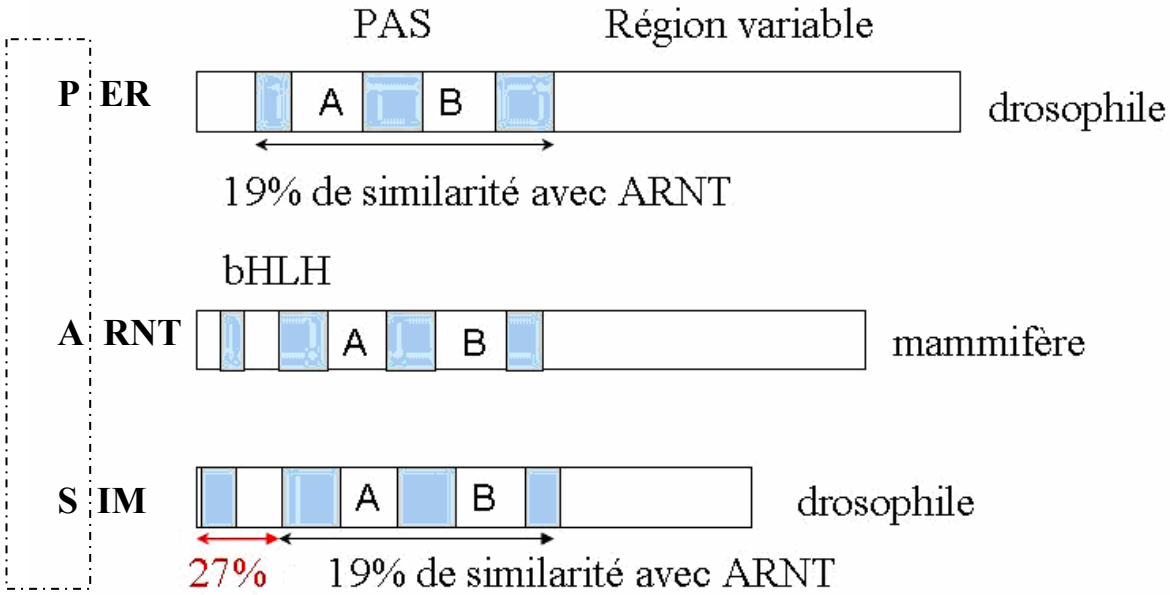


Figure 1.3: Structure des membres originaux de la famille PAS. Les structures en domaines des protéines PER, ARNT et SIM sont montrées. Le nom PAS vient des protéines PER, ARNT et SIM (*encadrées*). Les régions b ('basic region'), helix-loop-helix (HLH), PAS et les domaines C-terminal variables sont notés au-dessus. Les régions répétées A et B sont montrées dans le domaine PAS comme des boites blanches. Le pourcentage en acides aminés similaires entre les protéines SIM et PER comparé à ARNT est indiqué par une flèche sous chaque domaine (d'après Gu *et coll.,* 2000).

Les domaines PAS sont présents dans beaucoup de protéines où ils détectent des changements dans la lumière, le potentiel redox, de ligands, l'oxygène, et le niveau énergétique d'une cellule. Ces protéines à domaines PAS se trouvent dans des Bactéries, Archaea et Eucarya (Zhulin *et coll.,* 1997, Taylor & Zhulin, 1999) ; dans les bactéries et Archaea des domaines PAS sont trouvés exclusivement dans les senseurs des systèmes régulateurs à deux composants. Les protéines à domaines PAS comprennent des kinases à histidine et à sérine/thréonine, des récepteurs de lumière, des protéines du rythme circadien, les protéines senseurs (à oxygène et à potentiel redox) et des canaux ioniques (Zhulin *et coll.,* 1997). Les domaines PAS ont le rôle de domaine senseur dans beaucoup de protéines de signalisation où ils sont connus pour détecter leur signal grace à un cofacteur associé : un hème, une flavine ou un chromophore hydroxycinnamyl. Ainsi, le type de réponse de la cellule aux changements des

conditions environnementales et intracellulaires est contrôlé par un domaine récepteur, transducteur ou régulateur contenant le domaine PAS.

Des similitudes entre les séquences répétées PAS et la protéine PYP « photoactive yellow protein », photorécepteur bactérien, ont été identifiées par Lagarias *et coll.*, (1995). Des études récentes suggèrent que les domaines PAS comprennent une région de 100 à 120 acides aminés et possèdent un repliement tridimensionnel commun très conservé ainsi qu'une région C-terminale variable. La protéine entière PYP (125 acides aminés), l'hémodomaine de la protéine senseur à oxygène FixL et le domaine N-terminal de la protéine HERG du canal potassique eucaryote (Morais Cabral *et coll.,* 1998) ont été proposés comme prototypes d'un domaine PAS.

La figure 1.4 montre le site actif photorécepteur du module PAS/PYP, structure typique d'un repliement PAS (Pellequer *et coll.*, 1998).

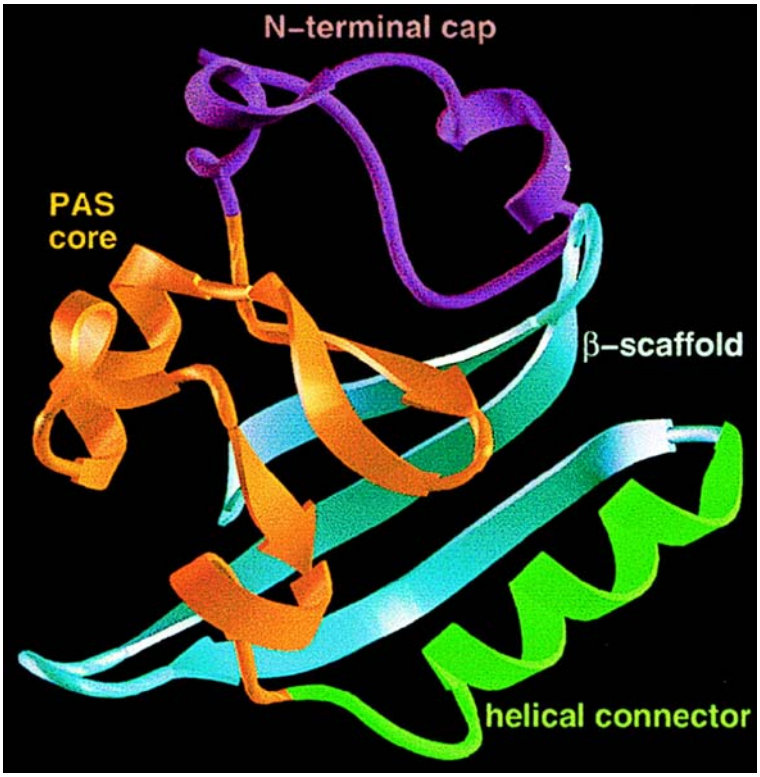


Figure 1.4: Structure de PYP proposé pour illustrer le repliement tridimensionnel du domaine PAS. L'extrémité N-terminal (violet) inclut les résidus 1 à 28; le domaine PAS (orange) les résidus 29 à 69, l'hélice de connexion (vert) les résidus 70 à 87 et la structure bêta (bleue) les résidus 88 à 125 (d'après Pellequer *et coll.,* 1999).

1.2.1. Les domaines PAS senseurs

Seul un petit nombre de domaines PAS est associé à des cofacteurs, mais ce groupe inclut les membres les mieux caractérisés de la famille PAS. La détection de stimuli divers comme la lumière, les gaz diatomiques ou le potentiel redox requiert des cofacteurs différents. Dans les protéines PAS qui détectent la lumière, PYP est un récepteur bactérien qui capte la lumière bleue par le chromophore 4-hydroxycinnamyl (Baca *et coll.,* 1994). FixL, qui sera détaillée plus loin, est un récepteur d'oxygène (Gilles-Gonzalez *et coll.,* 1994), dans lequel l'oxygène se lie directement à un cofacteur hème, coordonné par un résidu histidine dans le domaine PAS (Monson *et coll.,* 1995). Des autres protéines PAS, comme la protéine Aer, sont des protéines transductrices qui détectent l'oxygène indirectement à travers des changements du potentiel redox (Taylor & Zhulin, 1999).

1.3. Les senseurs à hème

1.3.1. Rôle physiologique

Dans un grand nombre d'organismes cellulaires, une famille de protéines, dénommées « senseurs à hème » par Gilles-Gonzalez *et coll*. en 1994 agit comme des régulateurs clé de différentes réponses adaptatives physiologiques, souvent aux changements de concentration des gaz diatomiques : oxygène (O_2), monoxyde de carbone (CO) et monoxyde d'azote (NO). Par exemple, le senseur à O_2 dans la bactérie *Sinorhizobium meliloti*, *Sm*FixL déclenche l'expression des gènes de *nif* et *fix* si les *Rhizobia* rencontrent une zone d'hypoxie dans les nodules des racines lors de la symbiose (Gilles-Gonzalez *et coll.,* 1994 ; Soupene *et coll.,* 1995).

La fixation de ces ligands physiologiques déclenche une réaction qui conduit éventuellement à la réponse des organismes aux changements de disponibilité de ligand. Dans un senseur à hème, un domaine régulateur liant l'hème et agissant comme senseur contrôle un domaine enzymatique permettant de transmettre un signal grâce à une activité catalytique. Ces domaines catalytiques peuvent être des histidines kinases ou des phosphodiésterases de dinucléotides cycliques (Gilles-Gonzalez *et coll.,* 1994). Le domaine senseur à hème peut posséder plusieurs architectures, mais de loin ce sont les domaines PAS qui sont les plus communément rencontrés.

Ces dernières années, un nombre croissant de ces hémoprotéines senseurs a été découvert (voir Tableau 1.1), et on commence progressivement à mieux comprendre leurs mécanismes de détection directe des ligands, leur régulation et leur rôle dans la transduction du signal. Les senseurs à hème sont rencontrés dans toutes les espèces vivantes et avec des fonctions physiologiques multiples: pour exemples il y a le senseur neuronal à CO NPAS2 qui possède un domaine bHLH-PAS et est impliqué dans le rythme circadien chez les mammifères; le senseur à oxygène acétobactérien AxPDEA1, responsable de la synthèse de la cellulose, le senseur à oxygène rhizobien FixL, qui contrôle la fixation de l'azote et le senseur direct à oxygène Dos d'*E.coli* de fonction encore inconnue.

Les protéines FixL, PDEA1, NPAS2, CooA et la guanylate cyclase soluble commencent à être relativement bien caractérisées ; quelques-unes sont devenues des modèles d'étude.

Le Tableau.1.1 est une représentation non exhaustive de l'ensemble des fonctions et rôles des protéines senseurs à hème les plus connues.

Famille PAS	**Famille des globines (sCG)**
Protéine à histidine kinase	**Protéine porteuse de méthyles**
-FixL rhizobien	-HemATs
Fixation d'azote et oxydases alternatives	Aerotaxis
Second messager	**Seconds messagers bactériens**
-PDEA1 d'*A. xylinum*	**Famille « heme nitric oxide binding »**
Production de cellulose	**Second messager, mononucléotide**
-Dos d'*E. coli*	-Guanylate cyclase soluble de mammifères
Fonction inconnue,	Vasodilatation
senseur à oxygène ou rédox ?	
Liaison à l'ADN	
-NPAS2 de mammifères	
Rythme circadien	
-CooA de *R. rubrum*	
Métabolisme du CO	

Tableau 1.1 : Senseurs à hème. Le type d'hémodomaine liant l'hème est défini pour chaque famille de senseurs. Les sous-groupes (rouges) sont définis par le domaine enzymatique. Les fonctions physiologiques connues sont indiquées en vert (d'après Gilles-Gonzalez *et coll.*, 2005).

Ces hémoprotéines senseurs régissent les réponses adaptatives aux fluctuations de l'O_2, du CO ou du NO, et il est crucial à leur fonction de discriminer les différents ligands physiologiques. Souvent, différents ligands (CO, NO, O_2) peuvent accéder à l'hème et former une liaison, cependant un seul ligand a un effet spécifique sur le domaine effecteur. En effet, la nature et la position des résidus de la poche distale peuvent affecter les cinétiques d'association et dissociation entre le fer et le ligand et définissent l'affinité d'une hémoprotéine pour un ligand particulier. L'environnement de l'hème joue par conséquent un rôle important dans cette discrimination.

1.3.2. De la molécule diatomique aux messagers physiologiques

a) Le fer et l'hème

Le fer est utilisé dans beaucoup de centres catalytiques d'enzymes importantes et est un cofacteur indispensable dans nombre de processus biologiques redox ou dans le transport d'oxygène. Sa présence ubiquitaire dans les enzymes redox est liée à ses propriétés d'état de valence et de spin. Le fer est présent dans des cofacteurs sous plusieurs formes (centre Fe-S, fer 'libre', hème).

Dans le cas des protéines étudiées, c'est le fer hémique qui est impliqué. Outre le rôle senseur, les fonctions les plus connues des hémoprotéines incluent le stockage de l'oxygène par la myoglobine, son transport par l'hémoglobine, le transfert d'électrons par les cytochromes et l'activation catalytique des ligands de l'hème par le cytochrome P450 et les peroxydases.

L'hème est un groupement prosthétique contenant un atome de fer au centre d'un anneau hétérocyclique, appelé porphyrine. Dans le cas de l'hémoglobine, la porphyrine coordinant l'atome de fer est la protoporphyrine IX, molécule hautement conjuguée, plane et donneuse d'électrons. Le type d'hème le plus commun est appelé hème *b*, présent dans l'hémoglobine et la myoglobine (figure 1. 5).

Dans les hémoprotéines, l'hème est enchâssé dans le squelette polypeptidique de la protéine à laquelle il est lié.

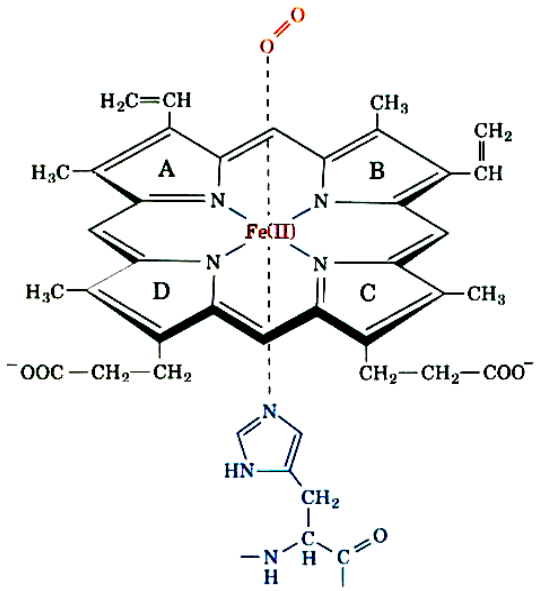


Figure 1.5 : L'hème *b*: Au centre de la porphyrine, l'atome de fer est lié par six valences (hexacoordonné) ; quatre de ces directions fixent le fer sur les quatre atomes d'azote de la porphyrine. Une valence du fer est liée à un des azotes d'une histidine (His *proximale* colorée en bleue) et la dernière libre permettant de recevoir une molécule d'oxygène (O_2 coloré en rouge) ou tout autre ligand. Lors de la fixation de l'oxygène, l'atome de fer se rapproche de l'histidine proximale. L'oxygène fixé s'interpose entre l'atome de fer et les acides aminés en position distale (non montrés).

L'atome de fer est à la base des réactions variées rencontrées parmi les hémoprotéines. C'est en se liant à différent ligands diatomiques comme le CO, NO, O_2 ou en changeant son état d'oxydation et/ou de spin, que l'atome de fer de l'hème va permettre à la protéine à laquelle il est lié d'accomplir sa fonction.

b) Le monoxyde de carbone

Le monoxyde de carbone (CO) se forme de façon endogène dans l'organisme humain lors du catabolisme de l'hème. Les effets toxiques du monoxyde de carbone sont dus pour une grande partie à la formation de carboxyhémoglobine (COHb), qui empêche le transport de l'oxygène par le sang. L'affinité de l'hémoglobine pour le monoxyde de carbone est d'environ 240 à 250 fois supérieure à celle de l'oxygène.

c) Le monoxyde d'azote (NO)

L'oxyde nitrique, molécule extrêmement réactive et de courte durée de vie en milieu biologique, est produite de façon endogène par l'enzyme oxyde nitrique synthase (NOS). Dans

le cas de la guanylate cyclase soluble, l'oxyde nitrique vient se lier à la protéine (voir partie 1.3.3) et activer la production du second messager guanosine monophosphate cyclique (cGMP). La structure électronique du NO est remarquable par la présence d'un électron non apparié qui lui confère une nature de radical libre. Cette propriété domine sa réactivité chimique et biochimique. Le NO réagit avec une autre molécule paramagnétique (exemple; O_2, O_2^-) ou par liaison avec un atome métallique tel que le fer. Dans ce cas, l'électron non apparié est partagé entre le métal et le NO ce qui explique la forte affinité du NO pour les protéines à hème. Toutefois l'environnement de l'hème influe sur le degré d'affinité de l'hème pour ces différentes molécules.

d) Le dioxygène

Le dioxygène est un gaz nécessaire à la respiration cellulaire qui participe à des réactions d'oxydoréduction. Il est l'accepteur terminal pour la phosphorylation oxydative mais également source de réactions d'oxydation néfastes ou du stress oxydatif lié à la production d'espèces réactives : les radicaux libres et les substances chimiques oxydantes non radicalaires dérivés de l'oxygène. Ces radicaux libres sont des espèces chimiques instables qui possèdent au moins un électron non apparié et donc une haute affinité pour l'hème. Beaucoup de bactéries se sont adaptées pour vivre dans une zone de concentration définie en oxygène tout comme les cellules des organismes multicellulaires eucaryotes se sont adaptées à l'atmosphère. La détection directe de l'oxygène constitue alors une nécessité pour ces cellules.

Pour être efficace, les protéines senseurs à hème doivent contrôler nombre de paramètres. Le domaine senseur doit changer après la liaison de son ligand signal, c'est-à-dire déclencher un changement de la forme active à la forme inactive et discriminer les différents messagers physiologiques.

Parmi les senseurs à hème, FixL, PDEA1, NPAS2, CooA et la guanylate cyclase soluble sont à ce jour sans doute les mieux caractérisés. Ils seront décrits brièvement ci-dessous.

1.3.3. La guanylate cyclase - hémosenseur à NO

La guanylate cyclase soluble (GCs) est intimement impliquée dans nombre de voies de signalisation, en particulier dans les systèmes cardiovasculaires et nerveux (Denninger &

Marletta, 1999). La GCs est une hémoprotéine qui répond au NO en synthétisant le second messager 3'-5'GMPc à partir du GTP (Hardman *et coll.,* 1969). Elle contient un hémo-domaine N-terminal 'senseur à NO' et une région C-terminale catalytique, qui convertissent le GTP en GMPc et pyrophosphate. La GCs de mammifères est une enzyme hétérodimérique composée de deux sous-unités homologues, α et β, nécessaires à l'activité enzymatique. La GCs permet la liaison sélective du NO au Fe^{2+} de l'hème dans un environnement aérobie; sélectivité essentielle pour le piégeage du NO en concentration nanomolaire, en présence d'une haute concentration compétitive de O_2 (Karow *et coll*., 2005).

Alors que la sGC est étudiée depuis 30 ans et identifiée dans les eucaryotes s'étendant de la drosophile aux humains (Hardman & Sutherland, 1969 ; Craven *et coll.,* 1978, Ignaro *et coll.,* 1982, 1990; Stone & Marletta, 1994), sa découverte chez les bactéries est toute récente (Watmough *et coll*, 1999 ; Iyer *et coll*., 2003; Karow et coll., 2004 ; Pellicena *et coll.,* 2004 Krumenacker *et coll.,* 2004).

1.3.4. Les hémosenseurs à CO

a) Le facteur de transcription bactérien CooA

La bactérie photosynthétique *Rhodospirillum rubrum* est capable de croître en présence de CO comme seule source énergétique en condition anaérobie (Kerby *et coll.,* 1995). La CO deshydrogénase et hydrogénase qui sont codées par l'opéron *coo* sont exprimées dans ces conditions et sont les enzymes clés qui facilitent la croissance dans ce type d'environnement *(*Kerby *et coll.,* 1992*).* La protéine CooA est responsable de la régulation transcriptionnelle de l'expression de l'opéron *coo* en réponse au CO. Ce système permet une protection pour certaines activités métaboliques sensibles au CO, telle que la fixation de l'azote. CooA est un activateur de transcription qui possède un protohème six-fois coordonné (Shelver *et coll.,* 1995).

Le CO est l'effecteur physiologique de CooA et remplace un des ligands axiaux de l'hème ferreux pour former la forme active CO-ligandée. L'activité de CooA est également contrôlée si CooA se lie ou pas à sa cible ADN (Aono *et coll.,* 1997).

Seule CooA liée à CO peut se fixer sur sa cible ADN, indiquant que le CO liant l'hème active CooA comme de facteur de transcription. CooA est un membre de la famille des

protéines réceptrices (CRP) de l'AMPc (identité de séquence de 30%) et des fumarate nitrate réductases (FNR) (Shelver *et coll.,* 1997).

b) La protéine neuronale NPAS2

La protéine neuronale à hémodomaine PAS est synthétisée principalement dans le cerveau antérieur des mammifères et appartient à la classe des facteurs de transcription bHLH-PAS (basic Helix-Loop-Helix ; voir Tableau 1.1). Dans ces facteurs de transcription, l'extrémité N-terminale bHLH liant l'ADN est suivie de deux domaines PAS, PAS-A et PAS-B (130 acides aminés chacun) et 400 autres acides aminés à l'extrémité C-terminale. Les deux domaines PAS de NPAS2 lient l'hème. Boehning et Snyder (2002) ont rapporté que le CO pourrait avoir un rôle de neurotransmetteur dans le cerveau et que NPAS2 en serait le récepteur.

1.4. Les hémosenseurs à oxygène

L'adaptation aux différentes conditions d'oxygénation est vitale pour la plupart des organismes cellulaires et un groupe de protéines senseurs a été identifié récemment dans lesquelles la liaison de l'O_2 induit des changements structuraux qui déclenchent l'activité d'autres protéines régulatrices et des modifications de l'expression de gènes spécifiques. Les domaines actifs, détecteurs de l'oxygène, possèdent un hème comme cofacteur actif, qui contrôle l'activité d'un domaine enzymatique qui lui est associé. Ces protéines senseurs sont membres de la famille « PAS » possédant des motifs de repliements structuraux très conservés, et sont impliqués dans un grand nombre de processus biologiques.

1.4.1. La protéine *Ax*PDEA1

Un représentant de cette famille des senseurs à oxygène est la phosphodiestérase 1 d'*Acétobacter xylinum* (*Ax*PDEA1) qui règle l'excrétion de la cellulose : un processus aérobie, irréversible et métaboliquement coûteux (Ross *et coll.,* 1991). Bien qu'*Ax*PDEA1 ait été étudié pendant plus d'une décennie, son rôle de senseur à oxygène a été découvert tout récemment (Chang *et coll*., 2001).

La production de cellulose par une culture de *Acétobacter xylinum* est connue depuis logtemps pour être dépendante de la pression en oxygène (Ross *et coll.*, 1991). En conditions hypoxie, *Ax*PDEA1 dégrade rapidement les dinucléotides cycliques (Chang *et coll.,* 2001), activité indispensable à la synthèse de la cellulose (Ross *et coll*., 1991 ; Saito *et coll.,* 2003). La phosphodiéstérase possède une forte spécificité pour le substrat di-guanosine monophosphate cyclique (diGMPc) et une faible activité pour les mononucléotides cycliques comme AMPc ou GMPc (Egli *et coll.,* 1990). Benziman *et coll*. (1991) ont montré que la synthèse de cellulose par *A. xylinum* est activée de façon allostérique par du diGMPc et identifié la protéine *Ax*PDEA1 comme la phosphodiestérase spécifique qui dégrade ce nouveau second messager. En effet, dans le système *Ax*PDEA, l'oxygène inhibe la linéarisation du diGMPc et seule la forme cyclique active la synthèse de la cellulose par les bactéries.

La pellicule de cellulose se forme exclusivement à l'interface air-eau d'une culture de *A. xylinum* après 1 à 2 semaines (Chang *et coll.,* 2001). Ce film fin élaboré sous une forte régulation de l'O_2 (Gilles-Gonzalez & Gonzalez, 2004) protège la communauté bactérienne d'un environnement hostile.

Des homologies de séquence du domaine enzymatique de *Ax*PDEA1 se retrouvent dans beaucoup de protéines de bactéries n'étant pas connues pour synthétiser de la cellulose, incluant *E.coli*. Plus particulièrement la protéine *Ax*PDEA1 possède une forte homologie de séquence globale avec la protéine Dos de *E. coli* (voir partie 1.4.3) ([Tal *et coll.,* 1998 ; Delgado-Nixon *et coll.,* 2000) et avec le domaine PAS des protéines FixL. La figure 1.6 montre un alignement de séquences d'acides aminés avec la protéine FixL de *Bradyrhizobium japonicum* comme référence. Les principaux acides aminés des domaines PAS impliqués dans la liaison avec l'hème y sont indiqués : une histidine conservé sur l'hélice α, agissant comme ligand proximal de l'hème, une arginine conservée sur le feuillet β (G1β) (sauf pour *Mt*Dos) et la méthionine de la boucle FG pour la protéine *Ec*Dos. Ces deux derniers résidus sont potentiellement impliqués dans la sixième liaison de l'hème.

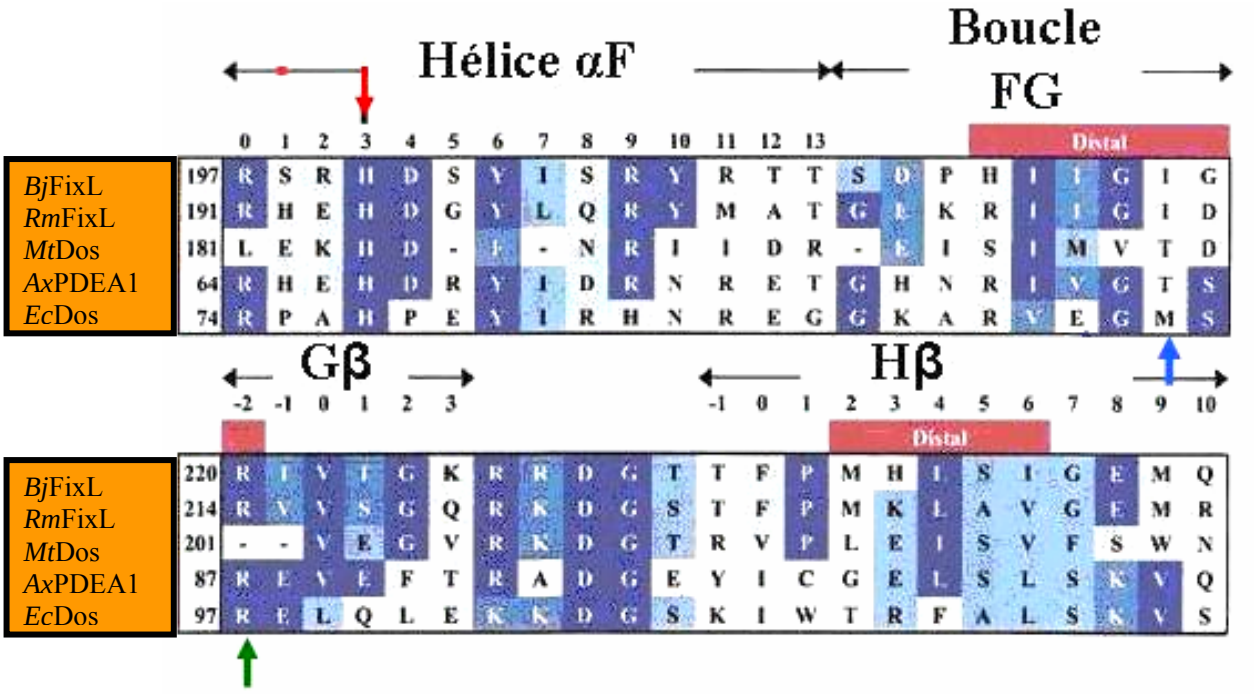


Figure : 1.6 : Alignement des séquences de la région de la poche de l'hème des protéines (*Ec*Dos, *Ax*PDEA1, *Bj*FixL, *Rm*FixL, *Mt*Dos*). Ax : Acetobacter xylinum*, *Bj* : *Bradyrhizobium japonicum*, *Rm* : *Rhizobium meliloti*, *Mt* ; *Méthanobacterium thermoautotrophicum.* Les flèches indiquent les principaux acides aminés clés dans la poche de l'hème : histidine (rouge), méthionine (bleue) et arginine (verte). (D'après Tomita *et coll.*, 2002)

Dans *Bj*FixL et *Ax*PDEA1 la conservation de ce domaine représente une identité de séquence de 36%. Entre les protéines *Ec*Dos et BjFixL, l'homologie est de 60% (Figure : 1.6). Un domaine PAS contenant une histidine conservée se retrouve également chez la bactérie pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa,* pour laquelle nos études comparatives *in silico* ont révélé la séquence d'une protéine de fonction inconnue PA5442 (voir paragraphe 1.5).

1.4.2. Le senseur à oxygène rhizobien FixL

La réduction biologique de l'azote atmosphérique en ammonium et son incorporation dans les biomolécules est essentielle à la vie sur Terre. Seul quelques bactéries ou algues bleu-vertes sont capables de réaliser la fixation de l'azote. Quelques uns de ces microorganismes, les bactéries du genre Rhizobium, sont capables d'induire sur les plantes de la famille des légumineuses la formation d'organes particuliers, des nodules (figure 1.7), dans lesquels elles fixent l'azote atmosphérique en symbiose avec la plante. Sa capacité à former des nodules avec

des plantes, dont le soja, en fait l'une des bactéries les plus exploitées expérimentalement. Ainsi les Rhizobia créent un environnement microaérobique protégé où elles peuvent croître en utilisant les substances nutritives de la plante, qui reçoit en échange de l'azote sous forme minérale NH_4^+ (Fischer H., 1994). Ces symbioses jouent un rôle clé dans le cycle biologique de l'azote, l'agriculture et la restauration des sols dégradés. Leur étude présente donc un intérêt au niveau écologique, biologique et économique.



Figure 1.7 : Des nodules formés par *Bradyrhizobium* sur une tige d'*Aeschynomene sensitiva* (légumineuse tropicale aquatique) (Photo INRA).

L'induction des gènes de fixation de l'azote dans ces bactéries est restreinte à des conditions de microaérobie, car le complexe de nitrogénase qui régule ces réactions est extrêmement sensible à l'oxygène (Pellequer *et coll*., 1999). Dans les Rhizobia, la détection de l'oxygène et la transduction du faible signal d'oxygène sont effectuées par FixL et FixJ, deux protéines qui appartiennent à la grande famille des régulateurs à deux composants (voir chapitre 1.1). FixL joue un rôle essentiel dans ce mécanisme adaptatif : en condition de diminution partielle en oxygène aux valeurs microaérobiques, elle induit une cascade de réactions cellulaires qui induisent l'expression des gènes *nif* et *fix,* impliqués dans le métabolisme de fixation de l'azote moléculaire (Stock *et coll.,* 1989 ; Gilles-Gonzalez *et coll*., 1991 ; Fisher *et coll.,* 1992).

1.4.2.1. Les gènes *nif* et *fix*

Les gènes *nif* et *fix* des Rhizobia sont impliqués dans la synthèse et le fonctionnement de différentes protéines de la fixation de l'azote sous des conditions de basse oxygénation (Fischer

et coll., 1987, 1994 ; Ditta *et coll.,* 1987). L'expression de ces gènes, organisés en cluster, est l'objet de régulations complexes impliquant à la fois des contrôles positifs et négatifs. Les gènes *nif* codent essentiellement pour une nitrogénase à fer et sont impliqués dans la biosynthèse de son cofacteur molybdène/Fe, avec la protéine NifA agissant comme régulateur positif. Chez *Bradyrhizobium japonicum*, la protéine NifA est le produit du gène régulateur de la réponse à l'oxygène. Sous des conditions de microaérobie ou anaérobie, NifA est active et régule positivement l'expression des gènes de nitrogénases et d'autres gènes *nif* et *fix*. Durant la phase d'aérobie, NifA est inactive et les gènes NifA-dépendants sont réprimés.

Les fonctions des protéines Fix les mieux caractérisées sont indiquées dans le Tableau 1.2 ci-dessous.

FixNOQP	Opéron codant pour la cytochrome oxydase *cbb3*, induite sous des conditions microaérobiques
FixGHIS	Processus redox, métabolisme du cuivre, assemblage de l'oxydase *cbb3*
FixLJ	Système de régulation à deux composants de réponse à l'oxygène, impliqué dans le contrôle de *fix*K et *nif*A
FixK	Régulateur positif de *fix*NOQP, respiration sur nitrate

Tableau 1.2 : Fonctions des protéines Fix chez *Bradyrhizobium japonicum*.

Les deux protéines FixL and FixJ appartiennent à la grande famille des systèmes à deux composants (Stock *et coll.,* 1989). Le senseur FixL détecte la présence/absence d'oxygène (Kofoid *et coll.,* 1988 ; Rodgers *et coll.,* 1996), tandis que son régulateur de réponse FixJ est activé lorsqu'il est phosphorylé et induit la transcription de deux autres gènes régulateurs, *nifA* et *fixK*. La protéine FixK contrôle l'expression des régions *fix*NOQP et *fix*GHIS, et en même temps réprime sa propre synthèse et celle de NifA (*Batut et coll.,* 1989).

Une version schématisée de ces processus se trouve dans la figure 1.8 ci-dessous.

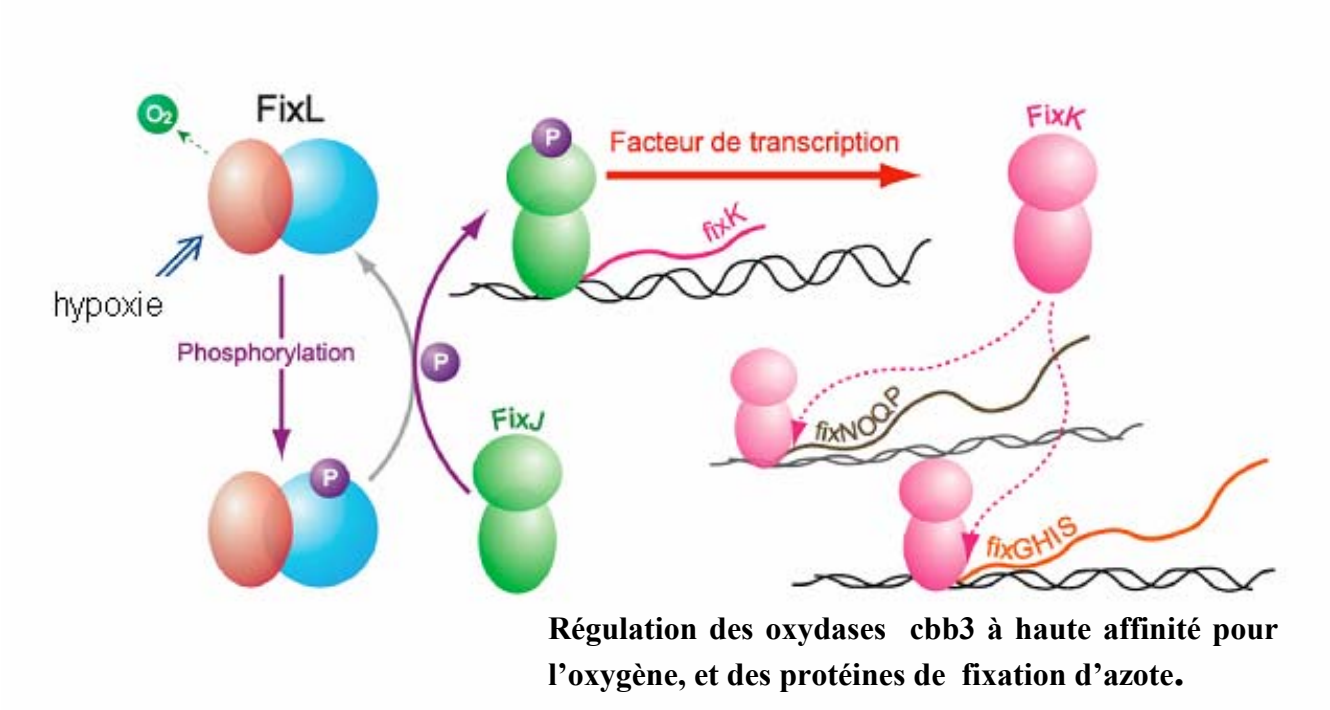


Figure 1.8 : Schéma simplifié de signalisation dans les Rhizobia en réponse à l'hypoxie impliquant le système à deux composants FixL/FixJ.

1.4.2.2. Le système à deux composants FixL/FixJ

Comme décrit précédemment, toutes les protéines FixL possèdent un domaine enzymatique histidine kinase régulé par l'hémodomaine (Gilles-Gonzalez *et coll.*, 1991 et 1993 ; Lois *et coll.*, 1993 ; Tuckerman *et coll.*, 2001, 2002 ; Dunham *et coll.*, 2003).

La saturation de l'hémo-domaine par l'O_2 inactive la kinase. En revanche, en absence d'oxygène, ces deux protéines sont capables de catalyser le transfert du phosphate γ de l'ATP vers un résidu conservé aspartate du régulateur FixJ. FixJ amplifie l'autophosphorylation de FixL et agit au final comme 'substrat' dans le transfert du phosphate de FixL-P (phospho-FixL) vers FixJ-P (phospho-FixJ) (Tuckerman *et coll.*, 2001, 2002).

La formation du complexe FixLJ précède toutes les étapes de phosphorylation et souvent la détection d'oxygène. Il existe de petites différences chimiques entres les protéines FixL, mais la plus surprenante est l'effet de l'état d'oxydation du fer de l'hème sur l'activité kinasique (Tuckerman *et coll.*, 2001, 2002 ; Dunham *et coll.*, 2003). En effet, pour FixL de

Bradyrhizobium japonicum l'oxydation de la forme ferreuse (Fe^{2+}) en ferrique (Fe^{3+}) n'affecte pas le taux de renouvellement de FixL en FixJ-P. En revanche, pour FixL de *Rhizobium meliloti*, l'oxydation vers la forme ferrique inhibe ce 'turn-over' d'un facteur 100 (Tuckerman *et coll.,* 2002 ; Dunham *et coll.,* 2003).

1.4.2.3. Organisation en domaine de FixL

La protéine FixL est organisée en trois régions distinctes (figure 1.9) :

- une région hydrophobe comprenant les acides aminés 1-86 qui est ancrée dans la membrane cellulaire. Cette région n'est pas indispensable pour la liaison de l'hème, ni pour la phosphorylation. Elle semble stabiliser la protéine *in vivo* ou protéger l'hème de l'oxydation. Cette fixation membranaire pourrait amplifier ou modifier la fonction de FixL ou la faire communiquer avec d'autres protéines membranaires (Gilles-Gonzalez *et coll.,* 1991).

- une région comprenant les acides aminés 87-219 correspond au site d'attachement de l'hème, est donc le domaine senseur de la molécule. Cette région est probablement du côté cytoplasmique de la membrane, car il n'y a pas de zone hydrophobe qui la sépare du domaine enzymatique.

- une région comprenant les acides aminés 220-505 qui correspond au domaine enzymatique histidine kinase de ce senseur (Gonzalez *et coll.,* 1991).

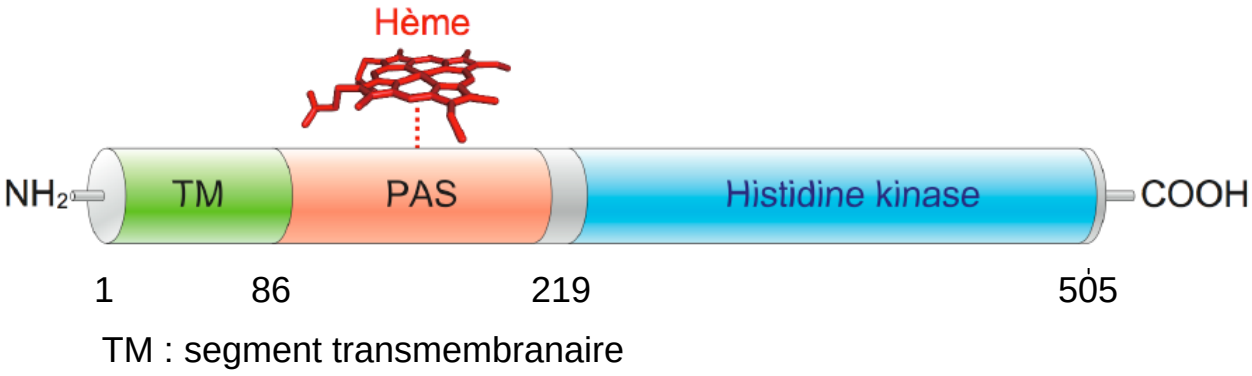


Figure 1.9 : Organisation schématique en domaines de la protéine *Bj*FixL. L'extrémité N-terminale contient le segment membranaire hydrophobe, suivi du domaine PAS liant l'hème ; l'extrémité C-terminale correspond au domaine à activité histidine kinase.

1.4.2.4. Structure de *Bj*FixLH

La détermination de la première structure tridimensionnelle de l'hémodomaine de *Bradyrhizobium japonicum* FixL (*Bj*FixLH) dans sa forme ferrique (Fe^{3+}) sans ligand (forme "off") et avec le ligand cyanure (forme "on") a été réalisée par l'équipe de Gong en 1998 (Gong *et coll.,* 1998) à une résolution de 2.4 Å. Miyatake *et coll*. en 1999 ont également examiné la structure de la coordination du fer dans l'hémodomaine de *Rhizobium meliloti* FixL (*Rm*FixLH) par EXAFS (**e**xtended **x**-ray **a**bsorption **f**ine **s**tructure) et spectroscopie de résonance Raman pour les formes Fe^{2+}, $Fe^{2+}O_2$, $Fe^{2+}CO$, Fe^{3+}, $Fe^{3+}F^-$ et $Fe^{3+}CN^-$ et en 2005, Key et Moffat publient les structures des différentes formes Fe^{2+} de *Bj*FixL déoxy et liée au CO.

Contrairement aux classes des hémoprotéines les plus largement étudiées (myoglobine, cytochrome *c*, cytochrome P450), qui possèdent principalement des hélices α (C, D, F), la structure de *Bj*FixLH est majoritairement composée de cinq brins β antiparallèles (A, B, G, H, I), forme typique d'une structure en « tonneau » (Perutz *et coll.,* 1999) (Figure 1.10)

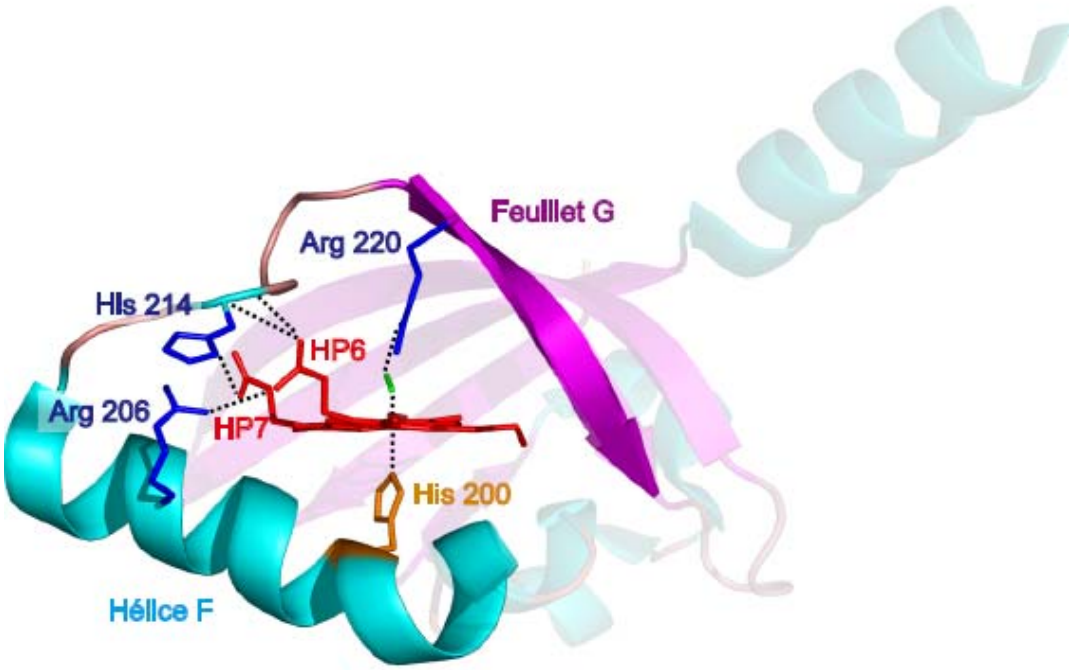


Figure 1.10 : Structure tridimensionnelle de l'hémodomaine senseur FixLH de *Bradyrhizobium japonicum*. Les éléments de structure secondaire sont représentés en couleur et chaque lettre est associée à un motif structural: les hélices α (en bleue) et les feuillets β (en rose). L'hélice F (faisant partie de la boucle FG) est impliquée dans beaucoup de protéines pour l'accommodation de différents cofacteurs et mécanismes de signalisation.

La structure de FixLH pourrait être décrite comme une main qui renferme le cofacteur hème, où les doigts sont formés en premier par les brins β du « tonneau » (résidus 155-168 et 235-255), la paume par l'hélice α de la boucle (résidus 170-215), et le pouce par le feuillet β (résidus 220-234). Cette hélice α, riche en glutamine (Q), est appelée « Q linker ». Ce repliement PAS est ubiquitaire parmi une grande variété d'espèces et de senseurs.

1.4.2.5. Signalisation dans l'hémodomaine FixLH

Comme précédemment décrit, le domaine enzymatique de FixL est homologue aux histidines kinases des systèmes à deux composants (Parkinson & Kofoid, 1992), et le domaine PAS senseur à oxygène ne montre pas d'homologie avec une grande partie des hémoprotéines étudiées, comme la myoglobine, l'hémoglobine ou le cytochrome P_{450}. La poche qui entoure l'hème doit donc jouer un rôle fondamental dans la spécificité pour le ligand physiologique oxygène et dans la signalisation au sein de ce domaine senseur.

Néanmoins, c'est le mécanisme moléculaire par lequel la fixation de l'O_2 se traduit en signal qui confère un si grand intérêt aux protéines FixL. La comparaison de structures tridimensionnelles de FixLH (Gong *et coll.,* 1998, 2000; Hao *et coll.*, 2002 ; Key & Moffat 2005) a permis d'élucider quelques aspects de la régulation de la fixation du ligand qui se distingue des autres hémoprotéines connues.

Dans FixL, l'hème du type *b* est pentacoordonné et situé dans une poche de caractère hydrophobe, en partie dû à la présence de trois acides aminés Leu 236, Ile 238 et Ile 215 (Gong et coll., 1998). Les deux premiers acides aminés font partie des feuillets β et $H_{\beta,}$ le dernier de la boucle FG (Figure 1.10 et 1.11).

Des études structurales montrent des similitudes de l'état de l'hème à l'équilibre entre l'oxy-complexe de FixL et la myoglobine (Gong *et coll.,* 2000) dans les liaisons entre l'hème et l'oxygène (Tamura *et coll.,* 1996). Cependant de petites différences sont observées dans l'organisation de la chaîne peptidique. En effet, après liaison des ligands O_2 et CN^-, la structure de la poche de l'hème de FixL est très significativement modifiée.

Cette modification structurale concerne particulièrement la position de la boucle FG (résidus Thr 209 à Arg 220) et la position spatiale d'un résidu arginine en position 220 (Arg 220), qui se déplace du groupe propionate 7 de l'hème vers l'oxygène (Figure 1.11 B).

Le site de fixation du ligand est également accessible aux molécules d'eau, susceptibles d'interagir avec l'arginine 220, un résidu conservé dans toutes les protéines FixL. Un autre résidu crucial, impliqué dans le changement de conformation, est l'arginine 206 (Fα9). S'appuyant sur ces informations structurales, le mécanisme primaire de transduction du signal dans cette protéine semblerait impliquer les groupes propionates de l'hème et ces deux résidus arginine (Arg 220 et Arg 206). L'isoleucine (Ile215), un autre résidu de la poche de l'hème est déplacée quand l'oxygène se lie et pourrait également jouer un rôle important dans le mécanisme de régulation (figure 1.10 et 1.11). Ainsi, les principaux changements structuraux ont lieu dans cette région de la boucle FG (Ser211-Ile215) à la surface de la protéine.

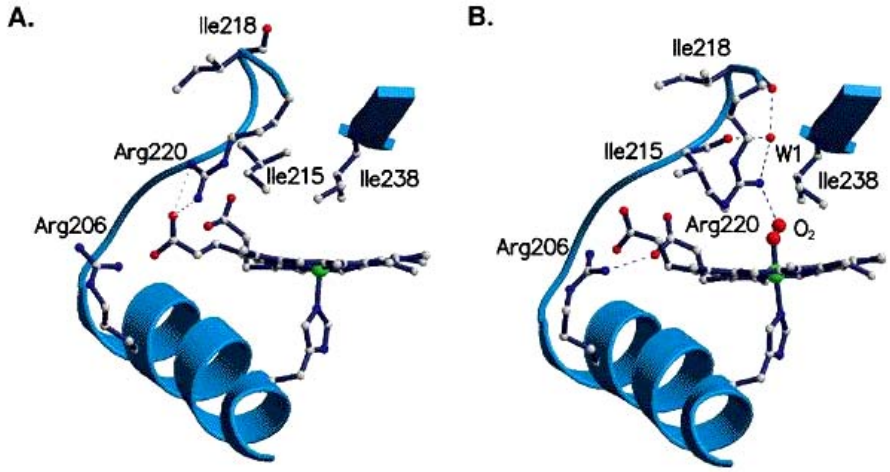


Figure 1.11: Structure de la poche de l'hème de *Bj*FixLH montrant les acides aminés clés (Ile 215, 218, 238 et les arginines 206, 220) impliqués dans la transduction du signal. La figure (A) montre la forme met-*Bj*FixLH et la figure (B) la forme oxy-*Bj*FixL (d'après Gong *et coll.*, 2000).

Cette hypothèse est corrélée par les alignements de séquences des domaines PAS (Figure 1.6), qui montrent que la boucle FG est l'une des régions les plus conservées dans ce domaine. Contrairement à l'hémoglobine où la liaison de l'histidine axiale au ligand induit un changement allostérique, dans FixL le ligand axial est fortement maintenu et c'est le mouvement de la poche de l'hème qui induit ce changement de conformation de la protéine.

Les spectres d'absorption à l'équilibre ont montré des similitudes du complexe oxy-FixLH et de l'oxy-myoglobine. Alors que l'affinité pour l'oxygène est faible pour FixLH (Gilles-Gonzalez *et coll*., 1994) en accord avec son rôle de senseur (K_d = 130 µM) celle de la myoglobine de cachalot est beaucoup plus élevée (0.8 µM, Springer *et coll*., 1989).

Sous fixation de l'oxygène, l'hème devient hexacoordonné. Cette perturbation locale se transmet sur une longue distance et régule l'activité kinase qui diminue. S'appuyant sur l'identification des changements de conformation entre l'état actif et inactif de *Bj*FixLH, un des modèles proposés pour le mécanisme de transduction de signal est que le domaine kinase interagit avec le domaine senseur par la boucle FG.

Ce model nous amène à deux principales questions, qui ont été abordées dans ce travail de thèse.

- ✓ *Comment la liaison de l'oxygène à l'hème se traduit – elle en signal de transduction au sein du domaine senseur?*
- ✓ *Quel est le rôle précis de l'acide aminé Arg220 dans la poche de l'hème ?*

1.4.3. Le senseur Dos d'*Escherichia coli* (*Ec*Dos)

En adaptant son métabolisme à la disponibilité en oxygène, la bactérie *Escherichia coli* peut vivre dans des milieux aérobiques et microaérobiques. Chez *E. coli*, le régulateur de transcription global FNR ('fumarate-nitrate regulator') régule l'expression de gènes nécessaires à l'adaptation aux variations de concentration en oxygène dans l'environnement via l'assemblage-desassemblage des clusters [4Fe-S] (Spiro & Guest, 1991). Cependant, chez *Escherichia coli* un autre mode est proposé pour la réponse aux variations de concentration en oxygène de l'environnement qui implique la protéine senseur Dos, mais dont le rôle exact à ce jour n'est pas connu (Delgado-Nixon *et coll.,* 2000).

1.4.3.1. Organisation en domaine

Dos a été décrite initialement par Delgado-Nixon *et coll*. (2000) comme hémosenseur direct à l'oxygène (dos = 'direct oxygen sensor'). Il possède un domaine PAS senseur et une région catalytique phosphodiésterase.

La forte homologie de séquence entre son extrémité N-terminale et le domaine senseur de FixL (25% d'identité et 60% d'homologie) semblait suggérer que le motif senseur qui leur est commun ne serait pas limité au contrôle d'une histidine kinase où à la régulation des gènes de fixation de l'azote (figure 1.12).

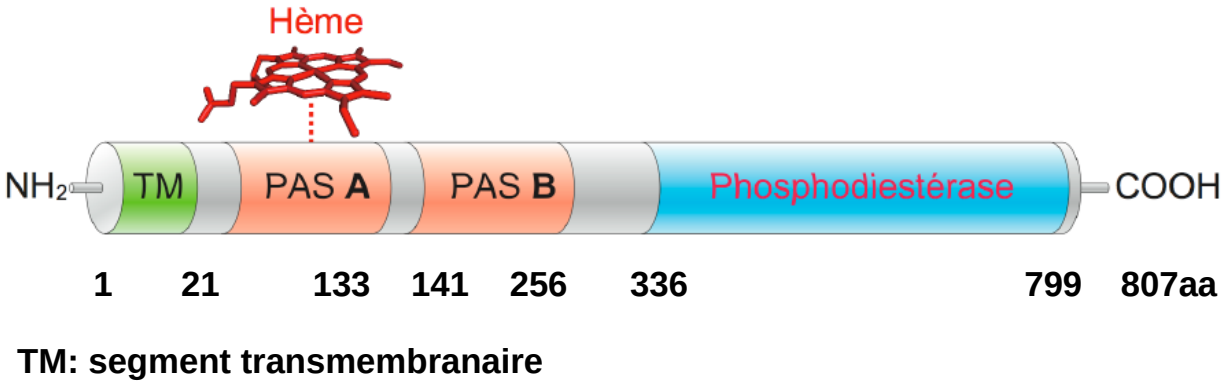


Figure 1.12 : Schéma de l'organisation en domaine de la protéine *Ec*Dos. L'extrémité N-terminale contient un tandem de domaines PAS, un identique à celui de FixL (PAS-A) fixant l'hème et un domaine PAS-B sans hème. L'extrémité C-terminale possède une activité phosphodiéstérase**.**

Bien avant la découverte de *Ec*Dos, les seuls hémosenseurs connus qui répondent à l'oxygène par la fixation directe et réversible de ce ligand étaient les protéines FixL. Cependant, Une forte homologie existe entre *Ec*Dos et la protéine *Ax*PDEA1 (régulateur de la synthèse de la cellulose chez *Acetobacter xylinum ;* voir partie 1.4.1.) qui s'étend pratiquement à la protéine entière, incluant l'hémo-domaine PAS et l'extrémité C-terminale contenant le domaine enzymatique de 500 résidus (30% identique et 50% homologue).

La région enzymatique de Dos possède deux domaines conservés GGDEF (Gly-Gly-Asp-Glu-Phe) et EAL (Glu-Ala-Leu), très abondants dans les bactéries et présents dans toutes les branches de leur arbre phylogénétique (Galperin *et coll*., 2001, 2004 ; Ryjenkov *et coll.*, 2005 voir figure 1.13 ; Simm *et coll*., 2004 ; 2005) et qui sont impliqués dans le turnover du di-GMP cyclique (di-GMPc) (Schmidt *et coll*., 2005 ; Mendez-Ortiz *et coll*., 2006)

Le domaine GGDEF stimule la production du di-GMPc, telle une cyclase à di-GMPc et EAL sa dégradation, telle une phosphodiestérase (Schmidt *et coll.*, 2005). Ces données suggèrent que le di-GMPc est un nouveau second messager chez les bactéries dont le métabolisme est contrôlé par les protéines à domaine GGDEF et EAL (Simm *et coll.,* 2004).

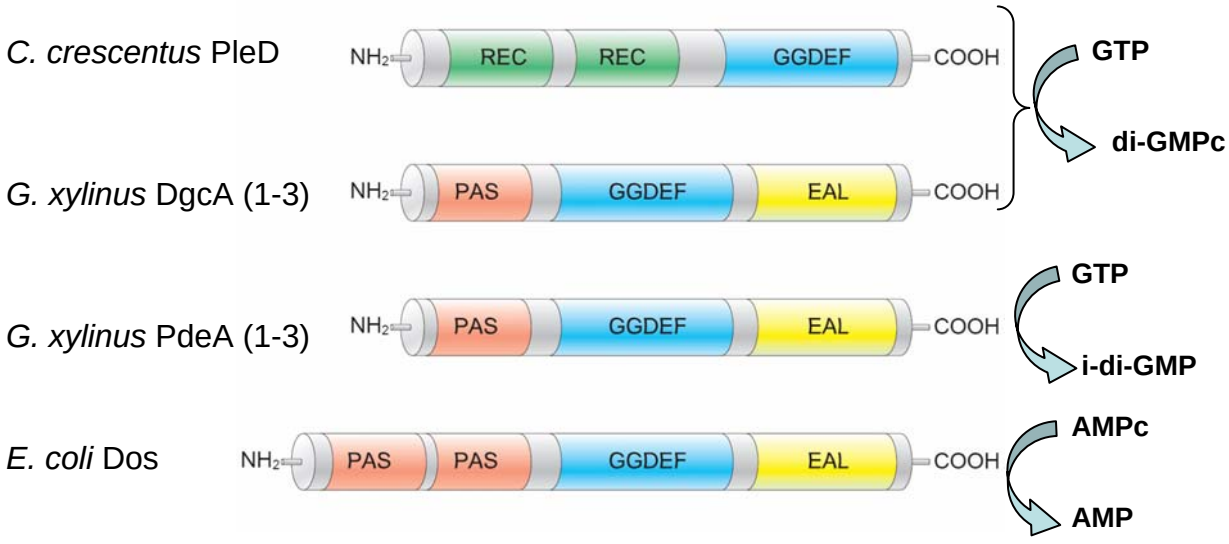


Figure 1.13 : Organisation des protéines à domaine GGDEF dont l'activité biochimique a été testée. Ces protéines incluent la protéine PleD de *Caulobacter crescentus*, Dos *d'Escherichia coli* et les protéines DgcA et PdeA de *Gluconacetobacter xylinus.* PleD et PdeA fonctionnent comme des diguanylate cyclases (Paul *et coll.*, 2004) alors que pour Dos une activité AMPc phosphodiestérase dépendante a été suggérée (Ryjenkov *et coll.*, 2005).

Pei et Grishin (2001) ont également observé une faible similitude significative entre la séquence des domaines GGDEF et l'activité catalytique des adénylate cyclase de mammifères. Pour la protéine *Ec*Dos, un rôle important dans la régulation du niveau cellulaire de l'AMP a été proposé via l'hydrolyse de l'AMPc ainsi qu'un rôle régulateur du di-GMPc (Sasakura *et coll.*, 2002).

1.4.3.2. Le domaine senseur DosH

L'hémodomaine de *Ec*Dos implique les acides aminés 1 à 142 correspondant à une masse moléculaire de 16 kDa et semble former un dimère fonctionnel (Delgado-Nixon *et coll*., 2000).

Malgré une fonction senseur similaire et une homologie de séquence (25% d'identité et 60% d'homologie), l'environnement de la poche de l'hème et le mécanisme de fonctionnement des domaines senseurs FixLH et DosH sont diffèrents. Alors qu'en absence de ligand diatomique FixL possède un hème cinq fois coordonné quel que soit son état rédox, les états correspondants de l'hème de DosH sont six fois coordonnés.

Les propriétés de Dos sont plus proches de celles de la protéine CooA (voir partie 1.3.5), supposant un mécanisme similaire, où le déplacement d'un ligand endogène serait à l'origine d'un changement de conformation de la protéine (Chan MK, 2001). L'identité entre les hémodomaines senseurs de FixL et de Dos inclut le site d'attachement de l'hème, une histidine (H200 pour *Bj*FixLH et H77 pour *Ec*DosH). Les domaines PAS n'ayant pas de fonction senseur similaire, ce motif PAS présente une homologie de séquence inférieure ou égale à 15%.

1.4.3.3. Structure de l'hémodomaine *Ec*DosH

A ce jour, il n'existe pas de structure tridimensionnelle de la protéine entière *Ec*Dos. Cependant, Park *et coll*. (2004) ont réalisé celle de l'hémodomaine (*Ec*DosH) réduit en présence et absence d'oxygène.

La protéine cristallise en un dimère et les hémodomaines individuels qui la constituent possèdent un sixième ligand différent. Chaque monomère contient une histidine (His77) en ligand proximal et soit une molécule d'oxygène soit un résidu méthionine (Met95) comme sixième ligand (Figure 1.14**).**

La forme deoxy et l'oxycomplexe du dimère sont connues ; néanmoins, seule la structure de l'oxycomplexe du monomère correspond à celle de *Bj*FixLH-O2.

Par ailleurs, la structure de la forme oxydée montre que c'est une molécule d'eau qui occupe le sixième site de coordination du fer de l'hème (Kurokawa *et coll*., 2004).

1.4.3.4. Le site actif senseur

Tel que dans *Bj*FixLH, l'environnement général de l'hème d'*Ec*DosH est très hydrophobe, en raison de la présence des résidus Phe113, Leu115 et Leu 99. Quelques uns des acides aminés impliqués dans le réarrangement de la poche de l'hème sont montrés dans la figure 1.14.

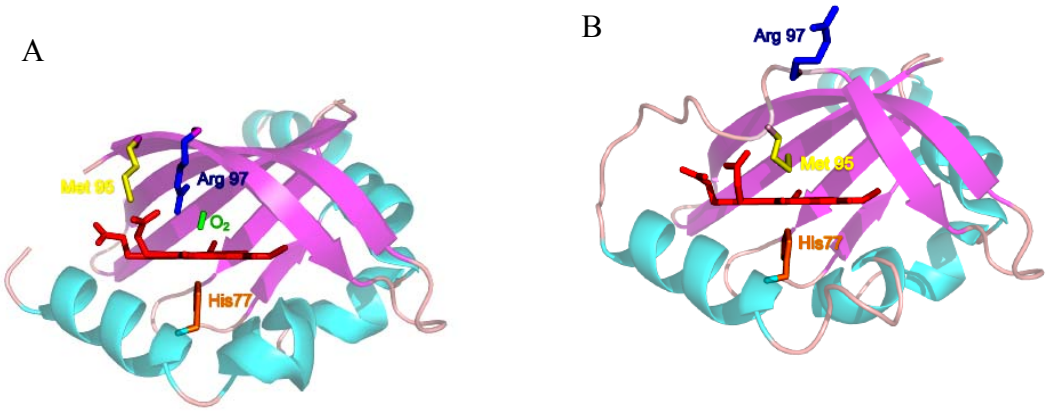


Figure 1.14 : Structure de la poche de l'hème de DosH. L'oxycomplexe est représenté sur la figure (**A**) avec la présence d'O_2 (en vert) et l'état déoxy est réprésenté sur la figure (**B**). Les résidus importants sont identifiés sur la structure, en particulier H77, M95 et R97). On constate la grande différence de la position de Met95 et Arg97 dans les deux structures (d'après Park *et coll,* 2004).

Les changements les plus significatifs s'effectuent du côté distal de l'hème, où le ligand est différent (méthionine ou oxygène, figure 1.14). En particulier, en absence d'oxygène, la chaîne latérale d'un résidu arginine (Arg97) est orientée vers la surface de la protéine (Figure 1.14 B) et un résidu méthionine (Met95) est lié à l'hème. Alors qu'en présence d'oxygène, l'Arg97 est orientée vers la poche de l'hème et forme une liaison hydrogène avec l'oxygène ; alors que la Met95 pointe vers l'extérieur de la protéine.

Les similitudes entre *Bj*FixLH et *Ec*DosH au niveau du site de liaison incluent la présence d'un résidu arginine conservé, stabilisant la coordination hème-O_2 (Arg97 dans *Ec*DosH *vs*

Arg220 chez *Bj*FixLH). Dans deoxy-Dos, R97 n'interagit pas directement avec les propionates de l'hème contrairement à FixLH, où le résidu homologue R220 forme un pont salin avec les propionates 7. De même que le réarrangement induit par le résidu Ile218 dans FixLH est plus faible que celui du résidu correspondant Met95 dans *Ec*DosH.

Toutes ces observations nous ont amenés à des études structures-fonction sur la protéine Dos, dans le but de mieux comprendre comment la liaison de l'oxygène à l'hème se traduit en transduction du signal.

Une autre approche de la compréhension du mécanisme de fonctionnement de Dos passe par la réalisation de mutants de la méthionine 95 (M95) afin d'en connaître le rôle précis dans la fixation de l'oxygène et la signalisation au sein du domaine senseur de la protéine.

1.4.3.5. Rôle de Dos et partenaires d'interaction possibles

Au cours de ce projet, en plus de l'étude structure-fonction de l'hémodomaine DosH isolé, je me suis intéressée au rôle physiologique de la protéine entière Dos.

De fonction encore inconnue, le premier rôle qui lui a été attribué est celui de senseur à oxygène (Delgado-Nixon *et coll.,* 2000), cependant elle a été également impliquée dans la régulation de l'état redox cellulaire (Sasakura *et coll.,* 2002, 2006).

Quant à son activité enzymatique, deux modèles contradictoires ont été avancés : l'un propose l'AMPc comme substrat de la phosphodiestérase et l'autre du diGMPc. A toutes ces inconnues viennent s'ajouter l'absence d'identification d'un partenaire d'interaction dans la voie de signalisation. Finalement, toutes ces questions m'ont amenée dans un premier temps à cloner et exprimer la protéine Dos entière, dans le but de tester l'activité enzymatique pour mieux comprendre sa fonction et son rôle dans la signalisation intra-protéique.

A cela s'ajoutent des analyses *in silico* et d'immunoprécipitation, afin de mettre en évidence des partenaires d'intéraction possibles.

1.5. PA5442 de *Pseudomonas aeruginosa*, une nouvelle protéine senseur ?

Mon intérêt pour les mécanismes d'adaptation microbiens et plus particulièrement pour les senseurs à hème bactériens est à l'origine d'un projet très récent, portant sur l'étude d'une protéine de fonction inconnue dans la bactérie pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*.

1.5.1. Description de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie Gram-négatif, mobile, à métabolisme oxydatif, capable de proliférer dans l'eau et le sol. Grâce à son métabolisme versatile, *P. aeruginosa* peut utiliser plusieurs sources de carbone et croît en état d'anaérobiose en utilisant le nitrate comme accepteur final d'électrons. La bactérie est capable de s'adapter facilement aux environnements hostiles ; capacité adaptative démontrée par la présence d'un nombre très élevé de systèmes de régulation à deux composants.

La résistance intrinsèque de ce microorganisme à nombre d'antibiotiques, ses nombreux facteurs de virulence, ainsi que sa capacité à produire des biofilms le rendent difficile à éradiquer des milieux hospitaliers. Dans le but de connaître d'avantage ce pathogène opportuniste, Stover *et coll.* (2000) ont séquencé le génome entier de *P. aeruginosa* PA01 (www.pseudomonas.com).

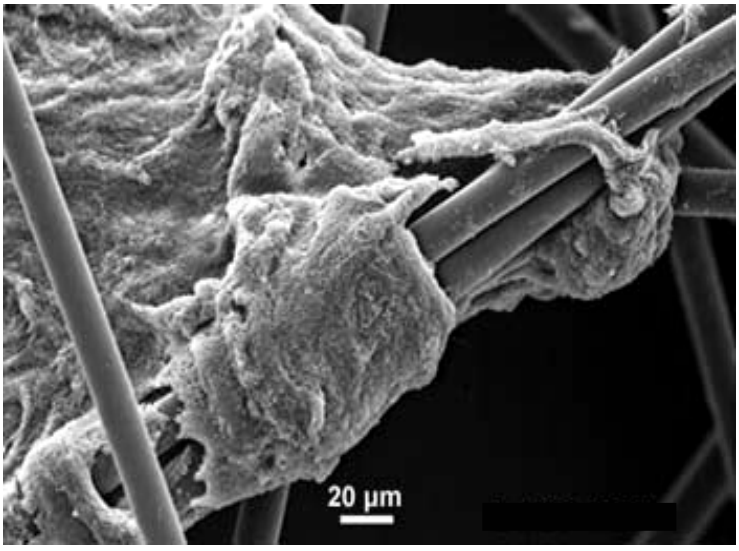


Figure 1.15 : *Pseudomonas aeruginosa***.** La microscopie électronique à balayage a été utilisée pour observer l'organisation sur des fibres de laine de verre dans le cadre d'étude sur les biofilms.

1.5.2. Implications cliniques de *Pseudomonas aeruginosa*

Chez l'Homme, *P. aeruginosa* cause principalement des infections opportunistes telles que des infections pulmonaires aiguës chez les patients immunodéprimés. Cette bactérie est aussi la cause majeure d'infections pulmonaires chroniques et de décès chez les patients atteints de fibrose kystique (mucoviscidose), une maladie héréditaire due à une mutation autosomale récessive dans le gène *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (*cftr)*. Les manifestations cliniques de cette maladie se situent principalement aux niveaux gastro-intestinal (mauvaise absorption intestinale), endocrinien, métabolique et pulmonaire (sécrétions visqueuses). La déficience en protéine CFTR active dans le poumon est donc la cause de l'hypertonicité des sécrétions. L'activité antimicrobienne du liquide de surface des voies respiratoires s'en trouve alors grandement compromise (Matsui *et coll*., 1998). De plus, ces sécrétions sont déshydratées créant une couche de liquide visqueuse et presque immobile, diminuant la capacité des cils respiratoires à éliminer des particules étrangères emprisonnées, et les pathogènes ont alors le temps de s'implanter.

1.5.3. Biofilms et oxygène

La capacité de *P. aeruginosa* à produire des biofilms protecteur et à sécréter dans son environnement des enzymes toxiques et hydrolytiques telles que des exoprotéases est largement associées à sa virulence (voir Figure 1.15). Ces propriétés sont hautement induites par des facteurs environnementaux, par le système de *quorum sensing* dont le système à deux composants *las/rhl*. Le biofilm consiste en une communauté bactérienne, souvent hétérogène, structuré, associé à une grande variété de surfaces biotiques et abiotiques. Le rôle de cette structure est la protection de la communauté bactérienne dans des environnements hostiles. La matrice extracellulaire du biofilm est généralement composée de polysaccharides, d'acide nucléiques et de protéines. Les biofilms contribuent de façon importante aux infections nosocomiales puisqu'ils se forment sur une grande variété d'implants, dont les cathéters (Costerton *et coll.*, 1987). La majeure partie des biofilms de *P. aeruginosa* est présente dans l'exsudat pulmonaire des patients atteints de fibrose kystique, et il a été démontré à l'aide des microélectrodes à oxygène, qu'ils contiennent de larges régions anoxiques. La limitation en

oxygène contribue à la tolérance aux antibiotiques des biofilms (Borriello *et coll*., 2004) et leur résistance inhérente aux antibiotiques est la cause d'infections persistantes et chroniques chez les patients atteints de fibrose kystique (Costerton *et coll.*, 1999). Ce mode de survie laisse à penser qu'il existe un système spécifique d'adaptation aux conditions d'oxygénation et nous a amenés à l'hypothèse que cette bactérie pourrait posséder un senseur à hème direct à oxygène. Une régulation de la limitation en oxygène dans *P. aeruginosa* implique la protéine Fe-S régulatrice, senseur à oxygène, ANR (Rompf *et coll*., 1998), qui possède une homologie de séquence importante avec le senseur à oxygène FNR d'*E. coli* (Sawers, 1991). Cette protéine est impliquée dans l'induction anaérobique de nombre de systèmes enzymatiques.

1.5.4. Un senseur à hème dans *P. aeruginosa* ?

Au regard de la similitude entre *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, qui possède la protéine FNR et l'hémosenseur Dos, j'ai cherché à mettre en évidence un hémosenseur potentiel dans *P. aeruginosa*.

Dans un premier temps j'ai exploité le génome de *P. aeruginosa* en le comparant aux séquences codant pour les senseurs à oxygène précédemment décrits, Dos et FixL, dans le but de trouver une organisation en domaines similaire à celle de ces deux hémoprotéines senseurs, et identifier des résidus clés susceptibles d'être impliqués dans la liaison avec un hème.

Ces recherches m'ont permis d'identifier une ORF de fonction inconnue, *pa5442* qui est à l'origine des études détaillées dans le chapitre 2.4.

1.6. Problématique de la thèse

Pour mieux comprendre les processus initiaux de la détection d'O_2 et la régulation de leur spécificité pour ce ligand diatomique, j'ai étudié les hémodomaines senseurs de deux protéines senseurs à oxygène bactériens, FixL de *Bradyrhizobium japonicum* (*Bj*FixLH) et Dos d'*Escherichia coli* (*Ec*DosH) et leurs mutants dirigés : R220 dans FixLH et M95 dans DosH.

A cet effet, plusieurs approches expérimentales ont été utilisées, associant des techniques de biologie moléculaire, de biochimie et de spectroscopie d'absorption visible à l'équilibre et

résolue en temps. Après avoir établi un système de surexpression des hèmodomaines FixLH et DosH et effectué une caractérisation biochimique des protéines recombinantes, la propriété de photodissociabilité de la liaison hème-ligand a été exploitée pour suivre la dynamique des ligands O_2, CO et NO dans la poche de l'hème. Ces résultats sont présentés dans les parties 2.1 à 2.3.

Pour la protéine Dos dont le rôle est peu connu à ce jour, j'ai cherché à mettre en évidence des partenaires d'interaction possibles succeptibles d'intervenir dans la signalisation intraprotéique, dans ce but j'ai cloné et exprimé la protéine entière (2.4).

Par ailleurs, je me suis intéressée à une protéine de fonction inconnue, PA5442 de *Pseudomonas aeruginosa*, possèdant une structure en domaine très proche de *Bj*FixL et *Ec*Dos comme déterminé par des analyses *in silico*. Ces études, encore préliminaires, suggèrent que PA5442 pourra être un bactériophytochrome avec un domaine hémique associé (2.4).

II-Résultats et Discussion

2.1. Etudes structure fonction de *Bj*FixLH

Cette partie présente les résultats concernant les domaines senseurs FixLH ainsi que leurs mutants, ayant fait l'objet de publications jointes en annexe.

Le but ultime de ces expériences est de déterminer le mécanisme initial de détection de l'oxygène en liaison avec la dynamique de la protéine, ainsi que la nature des interactions entre différents ligands diatomiques (NO, CO, et O_2) et l'hémo-domaine senseur, et le rôle de l'acide aminé arginine 220 (voir Introduction) dans la poche de l'hème.

Cette connaissance des interactions au niveau de l'hème est un préalable pour comprendre comment la liaison de l'oxygène se traduit en transduction du signal interne.

La première étape de ces différentes expériences était le clonage, l'expression fonctionnelle et la purification de l'hémo-domaine senseur de *Bj*FixL (*Bj*FixLH).

2.1.1. Clonage de *fixL*H

Le fragment du gène *BjfixL* correspondant aux codons 142 à 270, qui code pour l'hémo-domaine FixLH, a été amplifié par PCR, en utilisant l'ADN génomique de *Bradyrhizobium japonicum* comme matrice, et les oligonucléotides suivants:

5'-GCC ATG GAG ACC CAC CTC CGC TCG-3' (sens) et
5'-CAG GCG CGT CGA CAG GAA CTG CAA-3' (anti-sens).

Cette réaction a permis d'introduire des sites de restriction *Nco*I en 5' et *Sal*I en 3', respectivement. Le produit amplifié (taille 384 pb) a été testé sur gel d'agarose (figure 2.1) et ensuite cloné dans le plasmide pET28 (a+) sous contrôle du promoteur T7, après digestion par les enzymes *Nco*I – *Sal*I. La bonne insertion et la séquence de *BjfixLH* ont été vérifiées par séquençage. La sélection des clones positifs après transformation dans la souche BL21DE3 a été réalisée sur un milieu Luria-Bertani (LB) contenant de la kanamycine (pour détails voir Matériels et Méthodes).

Ce système permet la surexpression de FixLH après induction par isopropyl-1-thio-beta-D-galactopyranoside (IPTG) de la T7 polymérase à partir d'un promoteur lacUV5 dans la souche *Escherichia coli* BL21DE3.

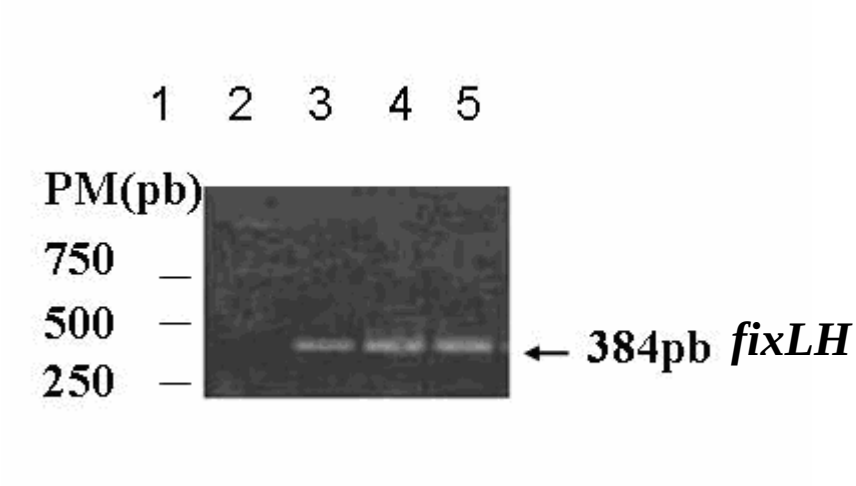


Figure 2.1 : Produit de PCR de *fixLH* (384pb) obtenu en utilisant différentes quantités d'ADN génomique de *Bradyrhizobium japonicum.* Ligne 1: marqueur PM, ligne 2 : contrôle négatif, ligne 3 :10 ng d'ADN génomique matrice, ligne 4 :20 ng ADN, ligne 5 : 30 ng ADN

2.1.2. Expression et purification de FixLH

Le plasmide pET28 (a+) permet l'expression de FixLH avec une séquence 6xHis en N-terminal et sa purification par chromatographie d'affinité sur des résines de métal chélate. La purification de FixLH a été effectuée essentiellement selon le protocole Xpress (Invitrogen) sur une colonne Ni-Probond agarose (Invitrogen) à l'aide d'un système « Fast Protein Liquid Chromatography » (FPLC), qui permet une grande reproductibilité et rapidité des purifications et permet également de suivre les caractéristiques spectroscopiques spécifiques de FixLH pendant la purification (figure 2.2). De façon générale, en fonction du type d'hème et de l'environnement local de celui-ci, les hémo-protéines possèdent des caractéristiques spectrales définies. Les formes réduites donnent jusqu'à trois principaux pics d'absorption dans les spectres UV/vis ; ils sont identifiés comme les bandes γ (Soret), α et β. Avec quelques exceptions les bandes α (autour de 550 nm) peuvent être utilisés pour identifier le type de l'hème, son état d'oxydo-réduction et

de ligandation. Les bandes β des hèmes *b* (comme dans FixL et Dos) se situent autour de 566-576 nm et les bandes γ autour de 400 nm.

Un chromatogramme de l'élution de la protéine FixLH est représenté dans la figure 2.2.

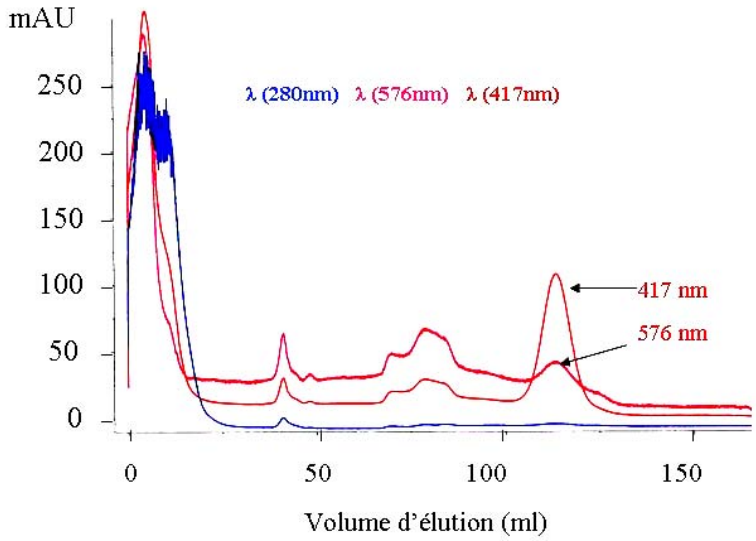


Figure 2.2 : Chromatogramme d'élution de FixLH sur une colonne d'affinité Ni-Probond à l'aide d'un système FPLC. L'absorbance de l'éluat est suivie à 280, 417 et 576 nm, longueurs d'onde caractéristiques de l'hème de FixLH.

Pour la détermination de la concentration des protéines FixLH purifiées un coefficient d'extinction ε_{395} = 1,6 x 10^5 $M^{-1}cm^{-1}$ a été utilisé (Gilles-Gonzalez *et coll.*, 1991). Le rendement moyen à partir d'un litre de culture était de 500 µl de protéine dont l'absorption à 395 nm correspond à une concentration de 44 µM, comme il est résumé dans le tableau 2.1, ci-dessous. La pureté des protéines FixLH est vérifiée par migration sur SDS-PAGE et correspond à ≥ 95 %.

Volume culture	Quantité de cellules	DO_{396nm} dans cuve 1mm	Concentration en protéine	Volume	Quantité de protéine en mg
1 litre	5 g	0,7	44 µM	0,5 ml	0,3 mg

Tableau 2.1. : Tableau synthétisant le rendement après expression et purification de FixLH.

2.1.3. Caractérisation de FixLH purifiée

Electrophorèse SDS PAGE

Sur le gel d'électrophorèse coloré au Bleu de Coomassie, la protéine FixLH purifiée apparaît sous forme d'une bande unique d'une masse moléculaire apparente de 14 kDa, en accord avec la masse moléculaire calculée à partir de la séquence de 14,1 kDa (voir Figure 2.3 de gauche, puits 2). Celle-ci est reconnue par un anticorps anti-poly-histidine dans une analyse immunoblot (Figure 2.3, droite).

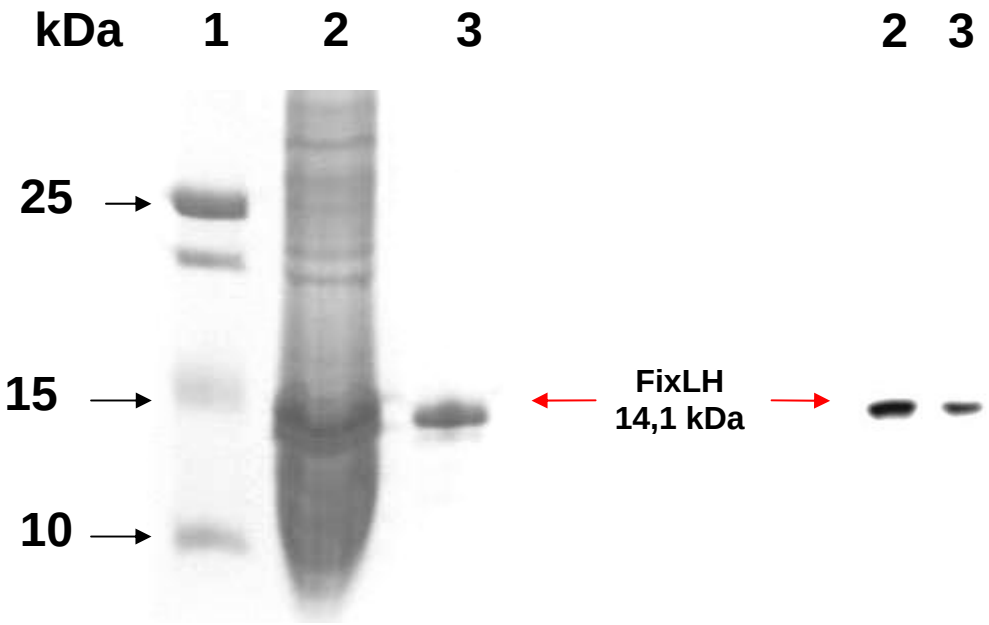


Figure 2.3 : (à gauche) SDS-PAGE 18% coloré au bleu de Coomassie, (à droite) immunoblot révélé par un anticorps anti-polyhistidine : ligne 1 : Marqueur de taille, ligne 2 : lysat total de des cellules, ligne 3 : FixLHwt purifiée. FixLHwt est indiquée avec une flèche rouge à 14,1 kDa.

Dans le but de tester si l'hémo-domaine FixLH purifié contient toujours son cofacteur hème, essentiel pour des analyses fonctionnelles, son spectre d'absorption a été enregistré après purification et élimination de l'imidazole (figure 2.4).

La position des pics d'absorption montre que l'hémodomaine FixLH surexprimé à conservé ses propriétés spectrales, observées pour la protéine non recombinante (Gilles-Gonzalez *et coll.*, 1991) avec la position des bandes Soret et α à 395 et 509 nm, respectivement.

Ces valeurs sont caractéristiques d'un hème *b* ferrique pentacoordonné, non ligandé et oxydé, un état typique après purification (Figure 2.4).

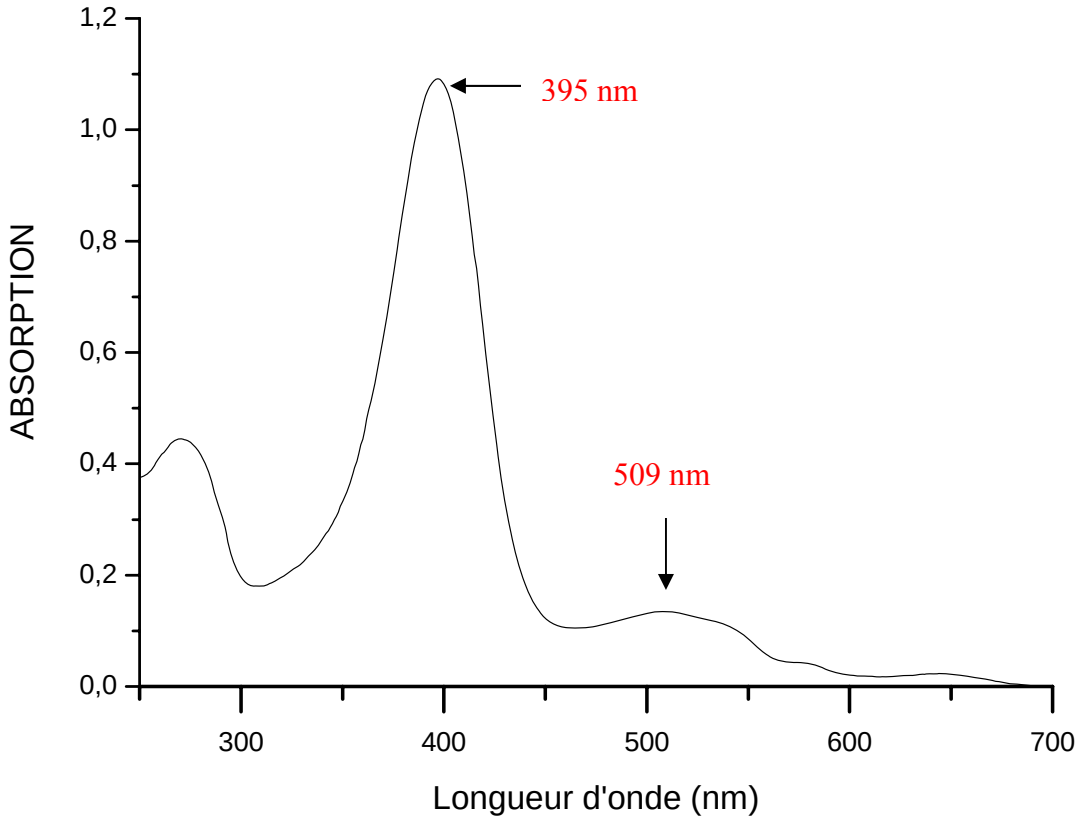


Figure 2.4: Spectre d'absorption de FixLH après purification et élimination de l'imidazole. Les maxima d'absorption correspondent à la bande Soret (395 nm) spécifique d'un hème pentacoordonné à l'état oxydé Fe3+ et à la bande α (509 nm).

2.1.4. Analyses de FixLH par spectroscopie d'absorption à l'équilibre

La liaison des ligands diatomiques sur le sixième site de coordination libre de l'atome de fer dans l'hème de FixLH se manifeste par des modifications spectrales, caractéristiques pour ces interactions. Comme point de départ, les spectres d'absorption à l'équilibre de FixLH non ligandé ont été mesurés. La forme réduite (Fe^{2+}) non ligandée de FixLH (forme « déoxy ») est caractérisée par un déplacement du maximum d'absorption de 395 nm vers 434 nm pour la bande Soret, spécifique d'un hème cinq fois coordonné haut spin, et de 509 nm à 560 nm pour la bande α (Figure. 2.5). Les spectres d'absorption à l'équilibre de FixLH non ligandée sont

similaires à ceux de la myoglobine réduite non ligandée (Antonini & Brunori, 1971). Le spectre de la protéine FixLH réduite, ligandée à l'O_2 (forme « oxy ») présente un pic à 418 nm, très similaire à celui de l'oxymyoglobine (Figure 2.5).

Ces données indiquent que les *spectres d'absorption à l'équilibre* de FixLH et de la myoglobine sont quasi identiques, avec les conformations de l'hème très similaires malgré des fonctions très différentes en tant que senseur ou protéine de stockage de l'oxygène, respectivement.

Les structures tridimensionnelles montrent également des similitudes dans la géométrie du système hème-O_2 (l'oxycomplexe) de FixLH et de la myoglobine ainsi que dans la forme en dôme de l'hème de la protéine non ligandée (Figure 2.5) (Gong *et coll.,* 2000). De même, la force de liaison entre l'atome de fer et le ligand O_2 est très similaire dans les deux protéines (Tamura *et coll.,* 1996).

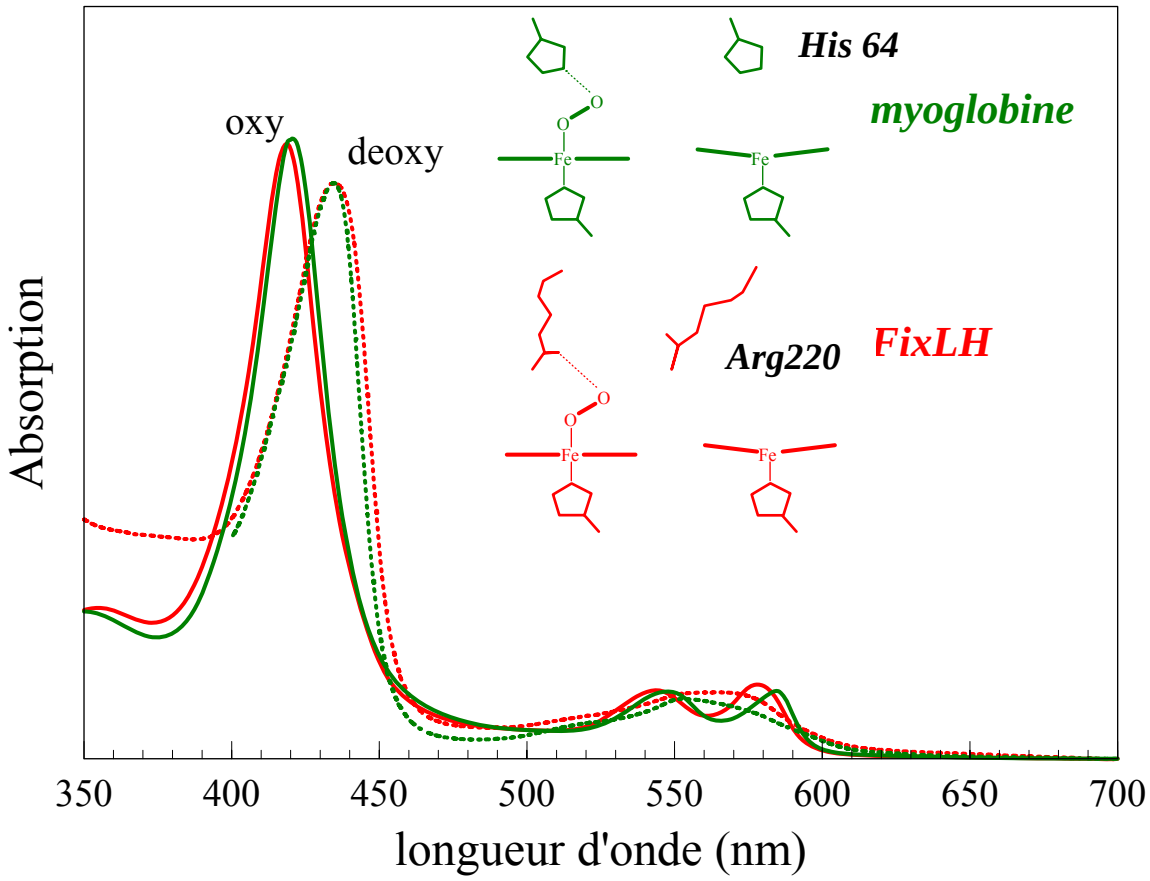


Figure 2.5 : Spectres d'absorption à l'état fondamental de FixLH réduite sous forme oxy (ligne pleine rouge) et forme déligandée (ligne en pointillés rouge) comparés à la myoglobine (ligne pleine verte) pour oxy et (ligne pointillée verte) pour la forme déoxy. La représentation du résidu clé dans la poche de l'hème (His64 pour la myoglobine et Arg220 pour FixL) est basée sur les structures cristallines des oxycomplexes.

Cependant, les propriétés de liaison de l'oxygène sont très différentes (Perutz *et coll.,* 1999). Alors que le taux de *dissociation* (k_{off}) de l'O_2 est similaire, l'*affinité* pour l'oxygène et le taux de *liaison* (k_{on}) est beaucoup plus faible pour FixL (Gilles-Gonzalez *et coll.,* 1994) que pour la myoglobine. Ces propriétés résultent d'une grande sensibilité aux changements de la concentration en oxygène de l'environnement. Cette différence d'affinité est la première caractéristique d'une protéine senseur à oxygène comme FixL par rapport à une protéine de stockage de l'oxygène telle que la myoglobine et laisse penser que les deux protéines sont capables de réagir à une gamme de concentration d'O_2 différente. Par ailleurs, dans le cas de FixL, un changement structural induit par la liaison à l'O_2 est nécessaire à sa fonction « senseur » et est à l'origine des processus de signalisation. Un tel changement structural peut être suivi dans un temps réel par la technique de la photodissociation suivie d'une détection par spectroscopie d'absorption ultrarapide (collaboration avec M. Vos, LOB).

2.1.5. Dynamique des ligands

Principe de la photodissociation

Avant de résumer les résultats obtenus, je présente rapidement le principe de cette technique. Comme indiqué ci-dessus, le domaine senseur FixLH possède à la fois une affinité faible pour l'oxygène et une faible vitesse de liaison (Gilles-Gonzalez *et coll.,* 1994). De façon générale, la dissociation de ligands diatomiques gazeux (O_2, CO, NO) d'un cofacteur hème associé à une protéine déclenche des modifications structurales qui éventuellement évoluent vers une conformation relaxée du système non lié. La durée de ces processus est très variable et peut s'étendre de quelques picosecondes (ps=10^{-12}s) aux millisecondes (ms=10^{-3} s).

Afin d'étudier les aspects dynamiques caractérisant l'interaction des ligands diatomiques avec les domaines senseurs à hème de FixL et Dos (partie 2.2) ainsi que plusieurs mutants de ces deux protéines, nous avons exploité la photodissociabilité du ligand en suivant la coordination de l'hème par spectroscopie d'absorption ultrarapide (Martin & Vos, 1994). Un schéma du principe des différents processus impliqués est représenté dans la figure 2.6. En effet l'absorption d'un photon par l'hème 'oxy', 6 fois coordonnée, résulte en la rupture du lien Fe-O_2. L'oxygène dissocié peut ensuite se relier à l'hème. Cette *recombinaison* dite *'géminée'*, car

elle implique *les deux mêmes* partenaires Fe et O_2, est très rapide, généralement dans l'échelle de temps picoseconde-nanoseconde (10^{-12} s - 10^{-9} s). Dans le cas d'un ligand externe, comme l'O_2, le ligand dissocié peut également sortir de la protéine. Dans ce dernier cas un complexe ligandé est reformé par combinaison avec d'autres *'nouveaux'* ligands en solution. On parle d'une *recombinaison 'bimoléculaire'*, à l'échelle microseconde-milliseconde (figure 2.6). La spectroscopie résolue en temps permet d'étudier les différentes vitesses de ces processus ainsi que la probabilité de recombinaison géminée et de sortie du ligand de la protéine. Ces phénomènes dépendent fortement de la nature du ligand et de l'environnement protéique de l'hème**.**

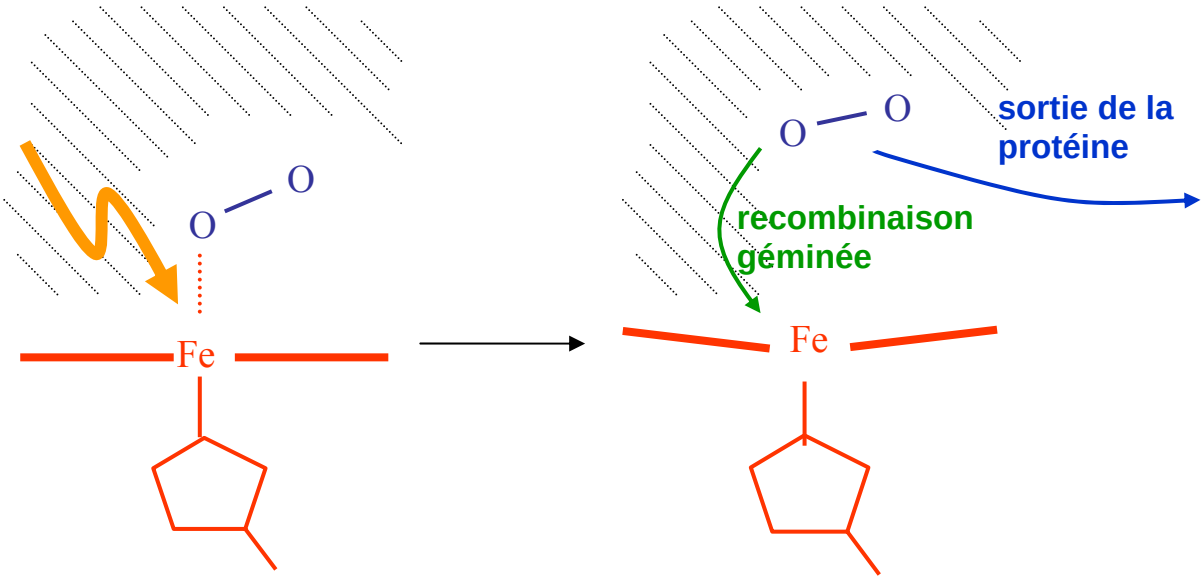


Figure 2.6 : Schéma du mécanisme de photodissociation et de recombinaison du ligand et de l'hème dans les hémoprotéines, illustré pour un oxy-complexe.

Il a été suggéré que le mécanisme de régulation de l'activité kinase de FixL est entre autre dépendant de l'état de spin du fer de l'hème (Gilles Gonzalez *et coll.,* 1995). L'activité kinase est augmentée quand le fer de l'hème est haut spin, c'est-à-dire dans la forme déoxyFixL.

Quand l'O_2 se lie à l'hème, le fer passe à l'état bas spin et le domaine kinase est inactivé. L'oxygène est le ligand diatomique qui inhibe le plus les protéines sauvages FixL (Dunham *et coll.,* 2003; Tuckerman *et coll.,* 2002 ; Akimoto *et coll.,* 2003).

Le changement d'état de spin peut être aussi provoqué par d'autres ligands de l'hème tel que le CO et le NO, mais l'effet sur l'activité kinase est beaucoup moindre.

2.1.6. Le domaine FixLH et l'interaction avec O_2

Dans notre étude, nous avons examiné les changements fonctionnels induits dans l'hémo-domaine senseur FixLH par son interaction avec des ligands exogènes, en particulier l'O_2 , son substrat.

Les mesures avec FixLH-O_2 s'avéraient particulières, parce que l'équilibration avec l'air (PO_2= 0,2 atm) produit une liaison oxy-FixLH incomplète (Gilles-Gonzalez *et coll.,* 1994). Pour minimiser cet effet, nous avons équilibré les échantillons directement avec 1 atm d'O_2. Dans ce cas nous obtenons seulement 1% de l'échantillon non ligandé.

Une observation importante est que le spectre d'absorption de l'hème photodissocié est différent par rapport à celui de l'hème non-ligandé (deoxy) au repos.

Après photodissociation, la majorité des molécules d'oxygène (90%) se recombine en ~5 ps au fer de l'hème (Figure. 2.7).

Aucune autre reliaison n'est observée jusqu'à 4 ns. La recombinaison avec l'oxygène est donc très rapide avec un taux très élevé et suggère un rôle de « piège à oxygène » de la poche de l'hème de FixLH (Liebl *et coll.,* 2002).

Une telle phase de recombinaison après photodissociation de O_2 a été également observée dans la myoglobine et l'hémoglobine (Petrich *et coll.,* 1988), mais avec une amplitude beaucoup plus faible que dans le cas de FixLH (Figure. 2.7).

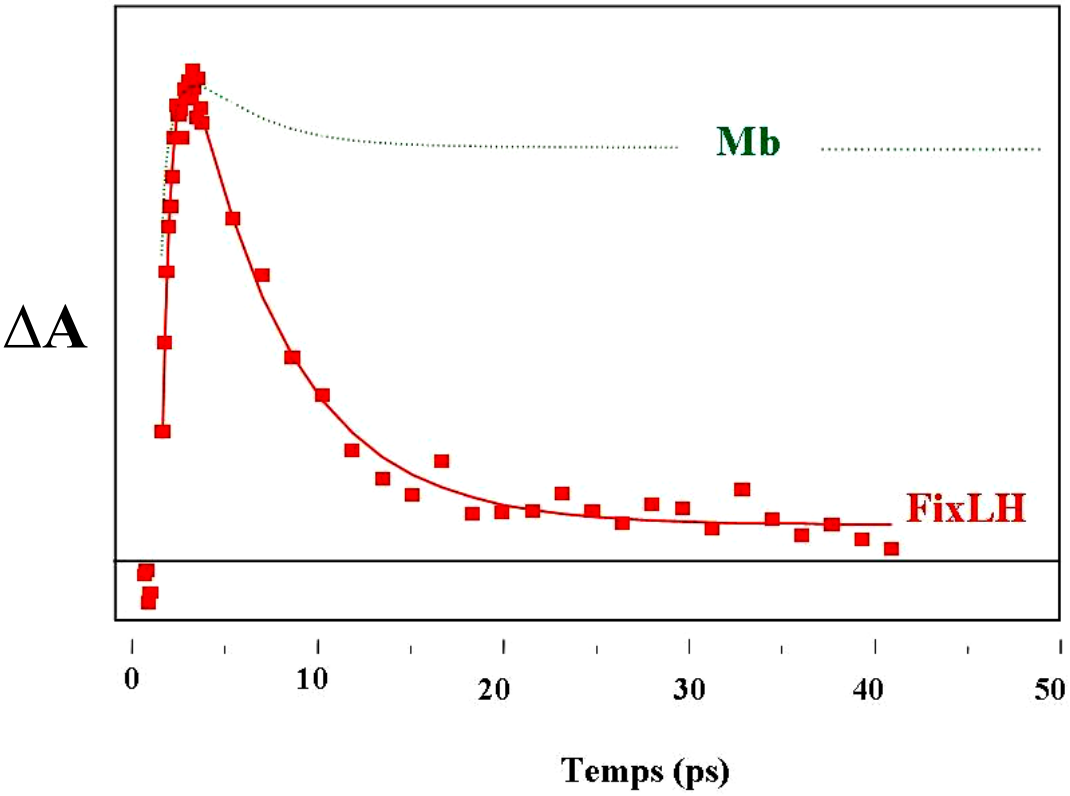


Figure 2.7 : Cinétique de recombinaison de l'oxygène de FixLHwt (courbe rouge) et Mb (courbe pointillée) suivie à 433 nm.

FixLH-CO et FixLH-NO

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les spectres associés à la recombinaison de CO et de NO avec FixLH dans le but de tester s'il existe une spécificité de l'hémo-domaine 'senseur' pour le ligand physiologique, l'oxygène. Nous avons trouvé que les cinétiques de recombinaison à l'échelle ultrarapide sont très similaires à celles de la myoglobine : le CO ne recombine pas en 4 ns et le NO recombine à ~95%, de façon multiphasique, à l'échelle picoseconde. Il s'avérait que les spectres transitoires de l'hème après dissociation de CO et de NO sont différents des spectres de différence à l'équilibre non-ligandés, mais de façon moins importante que les spectres après dissociation de l'O_2 (Figure 2.8). En revanche, les spectres transitoires pour CO et NO dissociés de la *myoglobine* sont superposables aux spectres à l'équilibre.

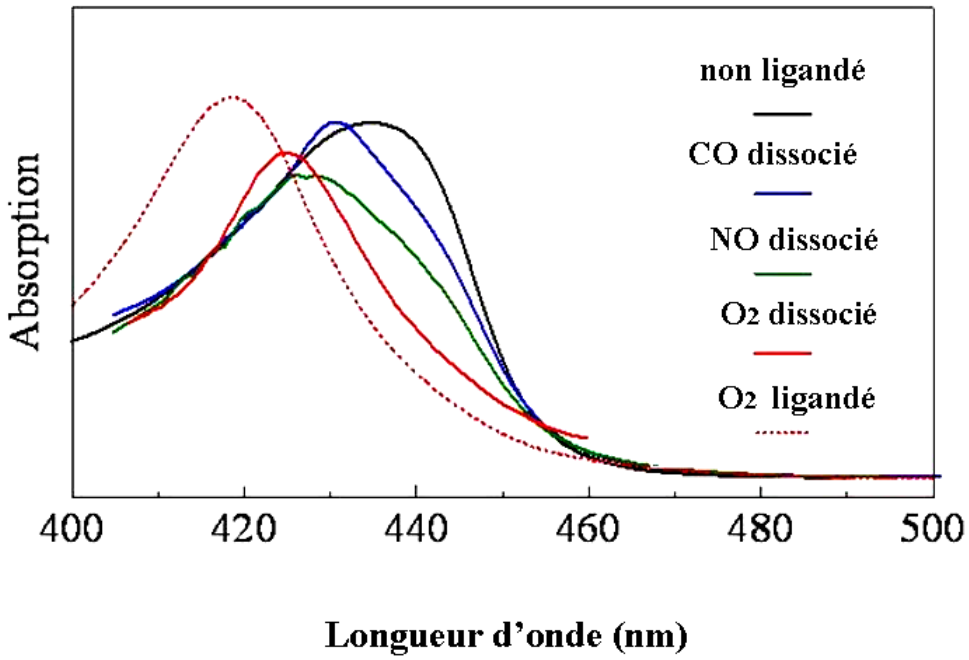


Figure 2.8: Spectres d'absorption absolus reconstruits de FixLH après dissociation du CO, NO, O_2, à l'échelle picoseconde, en comparaison avec les spectres d'absorption à l'équilibre des formes deoxy (non ligandé) et oxy (ligandé).

Nos mesures d'absorption résolue en temps montrent donc que pour les trois ligands diatomiques testés, CO, NO et O_2, les spectres transitoires sont différents de ceux de la forme non ligandée à l'équilibre.

Ce résultat implique que dans l'échelle de temps ultrarapide (picoseconde), l'hème et son environnement ne sont pas encore dans une conformation relaxée qui corresponde à l'état non ligandé à l'équilibre. En faisant l'addition des spectres différentiels avec les spectres ligandés à l'équilibre, nous avons reconstitué les spectres absolus des espèces dissociées (Figure 2.8).

En comparaison avec le spectre à l'équilibre de la forme non ligandée dont le maximum d'absorption de la bande Soret est à 435 nm, ces spectres intermédiaires de CO, NO et O_2 sont décalés vers la forme initiale ligandée, avec des maxima de la bande Soret à 431 nm, 427 nm et 424 nm, respectivement (Figure 2.8). Comme on peut le constater, la plus grande déviation concerne le ligand physiologique O_2.

Cette observation peut être corrélée avec l'effet des ligands sur l'activité kinase dans la protéine entière, qui est beaucoup plus grande pour O_2 que pour NO et CO (Tuckerman *et coll.*,

2002) et suggère fortement que les états dissociés ainsi identifiés correspondent à des états intermédiaires dans la voie de *signalisation interne* au sein de la protéine.

En ce qui concerne le ligand physiologique oxygène, cet état mène à la recombinaison de ~90% de l'oxygène dissocié tandis que ~10% de l'O_2 s'échappe et ne se recombine pas avant de sortir de la protéine. Il s'avère donc que la poche de l'hème sert de « piège » à O_2.

La figure 2.9 résume schématiquement cette vision des processus primaires pour l'oxycomplexe.

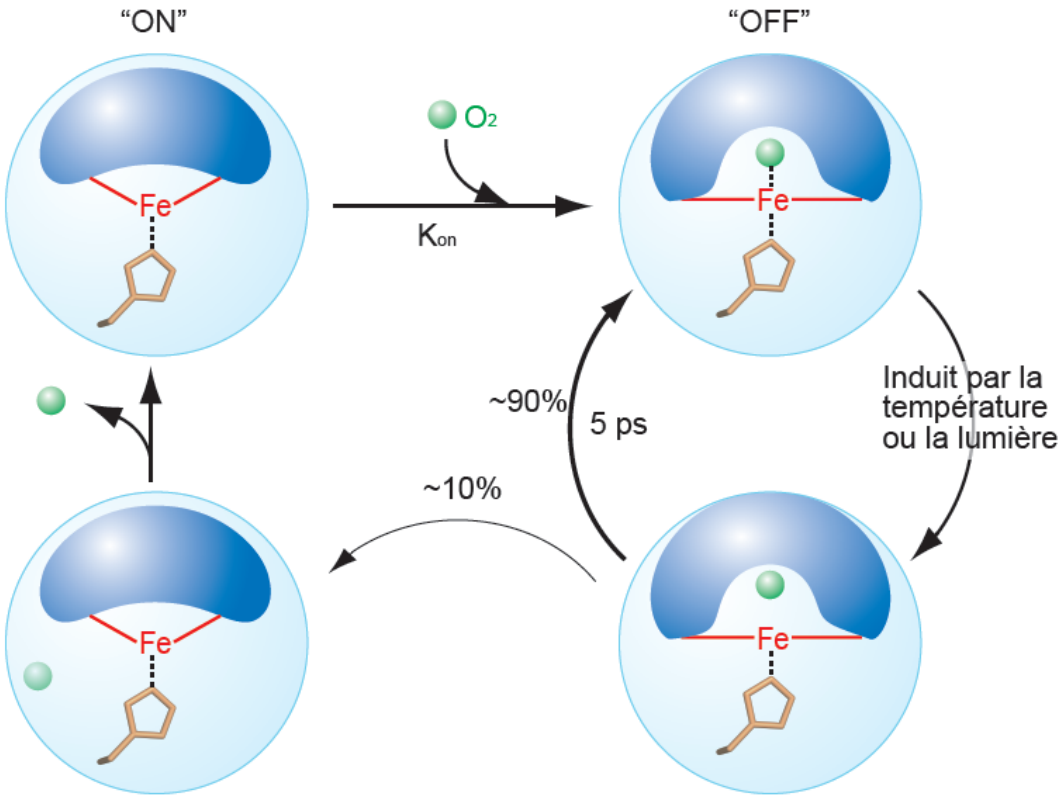


Figure 2.9 : Vue très schématique de la liaison et la dissociation d'O_2 dans FixL. Le cercle représente la protéine ; la zone grisée représente l'environnement de l'hème impliqué dans la transmission du signal. Il y a une grande barrière pour l'association d'O_2 dans l'état kinase « ON » et une grande barrière d'énergie pour l'éloignement de la poche de l'hème après dissociation dans l'état kinase « OFF».

Il semble qu'après dissociation (par la lumière dans l'expérience, ou thermiquement sous des conditions physiologiques), une transmission du signal ne s'effectue que très peu. Ceci

pourrait constituer un mécanisme pour adapter la vitesse de la réaction à la variation de pression de l'oxygène à une échelle typique de l'expression des gènes.

Un tel mécanisme pourrait être commun aux senseurs à hème de ligands gazeux, et une recombinaison rapide et aussi efficace spécifiquement pour le ligand physiologique a été également observée pour le senseur CooA à CO (Kumazaki *et coll.,* 2000) et le récepteur à NO guanylate cyclase soluble (Négrerie *et coll*., 2001).

Comme décrit auparavant dans les études structurales, il a été suggéré (Gong *et coll.,* 2000, Hao *et coll.,* 2002) que le résidu Arg220 joue un rôle important dans les premières étapes de la signalisation. En effet, ce résidu effectue une liaison hydrogène avec l'O_2 de l'oxycomplexe, mais possède une conformation très différente (interaction avec le groupement propionate 7 de l'hème) dans les formes deoxy (Figure 2.11), carboxy et nitrosyl.

C'est pour étudier le rôle précis de ce résidu dans l'interaction hème–ligand pendant les premières étapes de la transmission de signal que nous avons entrepris de réaliser dans un premier temps des mutants du résidu arginine 220 (R220) de FixLH.

2.1.7. Etudes des mutants R220 de FixLH

2.1.7. Position de l'acide aminé R220

Comme décrit dans l'Introduction, l'arginine 220 se situe dans la boucle FG, hautement conservé dans toute la classe des protéines FixL. Il possède un équivalent dans la protéine Dos *d'Escherichia coli* : l'arginine 97 (voir l'alignement présenté dans la figure 2.10).

```
                 40        50        60        70        80        90
EcDos       VLINENDEVMFFNPAAEKLWGYKREEVIGNNIDMLIPRDLRPAHPEYIRHNREGGKARVE
            ..:. .  ...:. :::.:.:... :.::.:...:.:.  :  :  :: . :  .  ..
BjFixL      IVIDGHGIIQLFSTAAERLFGWSELEAIGQNVNILMPEPDRSRHDSYISRYRTTSDPHII
              160       170       180       190       200       210

                 100       110       120       130       140       150
EcDos       GMSRELQLEKKDGSKIWTRFALSKVSAEGKVYYLALVRDASVEMAQKEQTRQLIIAVDHL
            :..: .  ...::. .  ......... :. :. ..::: . ..  . . ..:   . :.
BjFixL      GIGRIVTGKRRDGTTFPMHLSIGEMQSGGEPYFTGFVRDLTEHQQTQARLQELQSELVHV
              220       230       240       250       260       270
```

Figure 2.10: Alignement de séquences entre *Ec*DosH et *Bj*FixLH. Mise en évidence des acides aminés clés : His200 (bleu), Arg206 (vert), Ile215, Ile216 et Ile218 (orange), Arg220(rouge) dans *Bj*FixL, et His77, Met95 (violet) et Arg97 dans *Ec*Dos.

Les structures tridimensionnelles des hémo-domaines obtenues par diffraction des rayons X de ces deux protéines montrent l'importance du résidu Arg220 qui interagit avec le ligand O_2 lié à l'hème. Cependant, son rôle précis dans la transmission du signal n'est pas compris. En présence de l'oxygène ou de CN^- lié à l'hème, la structure de la poche de l'hème est très significativement modifiée, tout particulièrement la boucle FG (Thr 209 à Arg 220) et la position spatiale de l'arginine 220, comme on peut le voir dans la figure 2.11. En particulier, on voit l'interaction entre l'hème deoxy et l'Arg220 via un pont salin avec le groupement propionate 7 de l'hème d'une part et l'oxygène lié à l'hème interagissant avec l'arginine 220 via une liaison hydrogène d'autre part.

Pour comprendre le rôle de R220, nous avons muté ce résidu. Les mutations sont choisies pour modifier les propriétés électrostatiques et la capacité de former une liaison hydrogène avec une faible modification stérique. Nous avons donc substitué R220 par la glutamine (Q), l'acide glutamique (E), l'histidine (H), et l'isoleucine (I). Pour comparer avec une mutation décrite dans la littérature (Dunham *et coll.,* 2003), nous avons aussi effectué la substitution avec l'alanine (A) ; cette substitution engendre une modification stérique plus importante.

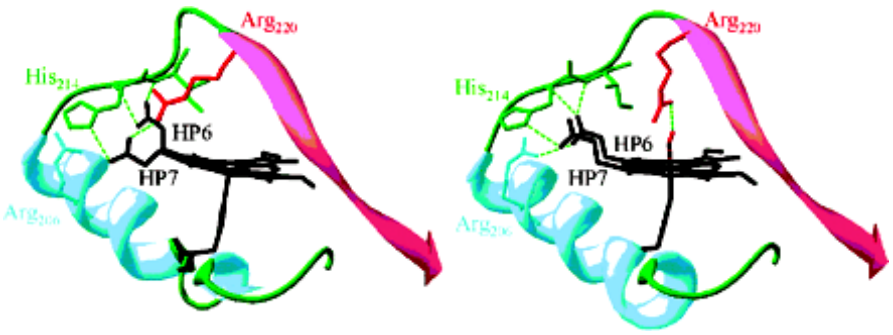


Figure 2.11 : Structure cristallographique de *Bj*FixLH à l'état déligandée (à gauche entrée PDB 1LSW) et oxy (à droite entrée PDB 1DP6), arginine 220 et les feuillets β sont en rouge, arginine 206 et les hélices α sont en turquoise, histidine 214 et isoleucine 215 et la boucle FG sont en vert. Les groupes propionates de l'hème sont indiqués HP6 et HP7 (d'après Gong *et coll*., 2000, Balland *et coll.*, 2005).

2.1.7.2. Construction des mutants R220 de FixLH

Le plasmide pET-FixLHwt contenant l'insert codant pour l'hémodomaine de la protéine sauvage FixLH, a servi de matrice pour la mutagenèse dirigée du résidu R220. Les substitutions R220H (histidine), R220Q (glutamine), R220I (isoleucine), R220A (alanine), et R220E (acide glutamique) ont été introduites selon le protocole ''QuikChange site-directed mutagenesis'' (Stratagene, voir Matériels et Méthodes) en remplaçant le codon CGC de l'arginine par CAC, CAG, ATC, GCC et GAG, respectivement.

2.1.7.3. Analyse biochimique des produits mutés exprimés et purifiés.

L'expressionet et la purification des différents mutants a été réalisée en suivant le même protocole que pour la protéine de type sauvage.

Le dosage protéique et l'absorption des mutants à 395 nm après purification montrent un niveau d'expression équivalent à celui de la protéine FixLH sauvage. L'analyse sur SDS-PAGE et en immunoblot (figure 2.12) montre les différents mutants de FixLH à la masse moléculaire attendue de 14,1 kDa. La mutation de l'arginine n'a pas modifié le rendement protéique de FixLH quelle que soit la substitution introduite en comparaison avec la protéine sauvage FixLH dans les mêmes conditions d'expression et de purification.

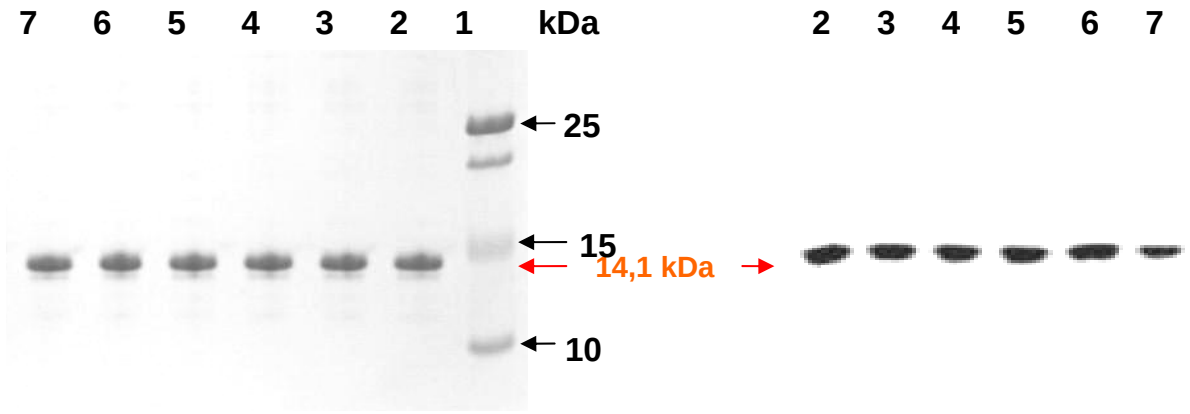


Figure 2.12: (gauche) SDS-PAGE 18% coloré au bleu de Coomassie, (à droite) immunoblot révélé par un anticorps anti-polyhistidine : ligne 1: Marqueur de taille, ligne 2: FixLHwt purifiée, ligne 3: FixLH-R220A, ligne 4: FixLH-R220E, ligne 5: FixLH-R220H, ligne 6: FixLH-R220I, ligne 7: FixLH-R220Q. La masse moléculaire de 14,1kDa est indiquée avec une flèche rouge.

2.1.7.4 Spectroscopie d'absorption à l'équilibre des mutants R220

Les mesures d'absorption de *Bj*FixLH et des mutants R220 ont été effectuées entre 250 et 750 nm, et les résultats sont donnés dans le tableau 2.1.

protéine	Met (Fe^{3+})	Déoxy (Fe^{2+})	Fe^{2+}-CO	Fe^{2+}-O2
Bandes d'absoption	γ	γ α	γ α	γ α
*Bj*FixLHwt	**395**	**434 560**	**425 542 574**	**417 543 577**
*Bj*FixLH-R220E	**395**	**434 562**	**425 542 573**	
*Bj*FixLH-R220H	**409**[a]	**434 560**	**425 542 574**	**418 542 578**
*Bj*FixLH-R220I	**395**	**433 563**	**425 542 573**	**421 543 577**
*Bj*FixLH-R220Q	**395**	**434 562**	**424 542 574**	**419 543 577**
*Bj*FixLH-R220A	**395**	**439 562**	**425 542 573**	

Tableau 2.2 : Valeurs des maxima d'absorption UV-visible de FixLH et de ses mutants dans différents états. A pH neutre, la forme Fe^{3+} de *Bj*FixLH-R220H lie une molécule d'eau (Balland *et coll.,* 2006)[a], ce qui décale le spectre d'absorption.

Les valeurs des maxima d'absorption en présence de CO des différents mutants sont très similaires à ceux de FixLHwt, ce qui indique que ceux-ci sont capables de fixer pleinement le CO, comme la protéine de type sauvage. En revanche, nous avons constaté d'importantes différences en ce qui concerne la fixation de l'O_2.

Un examen du spectre de la forme oxygénée (Figure 2.13) indique qu'en présence de 10 mM d'ascorbate de sodium et sous 1 atm d'O_2, la formation du complexe réduit Fe^{2+}-O_2 se fait pour 50% et 80% pour R220I et R220Q respectivement. Pour R220A, seul 20% d'oxycomplexe sont formés, et pour R220E un oxycomplexe stable n'est pas formé ; mais on obtient un mélange de complexes Fe^{2+} et Fe^{3+} non ligandés. Pour R220H, 100% de fixation d'O_2 sous 1 atm d'O_2 est atteint aussi bien que dans l'air. Ainsi ce mutant montre un taux de fixation et une affinité pour l'O_2 plus importante que la protéine sauvage qui n'est pas capable de fixer 100% de O_2 dans l'air (Balland *et coll.,* 2005).

Pour FixLHwt et le mutant R220Q une étude par spectroscopie Raman de l'oxycomplexe a été effectuée (Balland *et coll*., 2005). Les résultats des analyses sont résumés dans la figure 2.13.

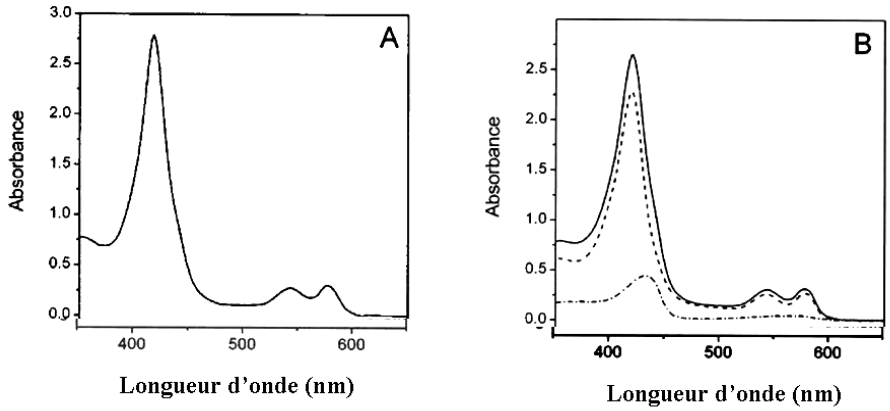


Figure 2.13 Spectres d'absorption visible enregistrés à température ambiante (A) pour FixLHwt, (B) pour FixLH-R220Q. Les spectres en trait plein correspondent à l'échantillon réduit à une exposition d'1atm O_2. Le spectre tiret-point (B) correspond à la fraction FixLH-Fe^{2+}, et le spectre (tiret) en B correspond à la fraction FixLHFe^{2+}-O_2. Le taux de formation de FixLHFe^{2+}-O_2 est obtenu à partir des amplitudes du spectre FixLH-Fe^{2+} soustrait afin d'obtenir une forme FixLHFe^{2+}-O_2 similaire à FixLHwt.

Des résidus substitués, seul le mutant R220H établit une liaison hydrogène avec l'atome d'oxygène terminal (l'atome non lié à l'hème), mais moins forte que avec R220. Par ailleurs, R220A ne peut pas faire de liaison hydrogène (figure 2.14).

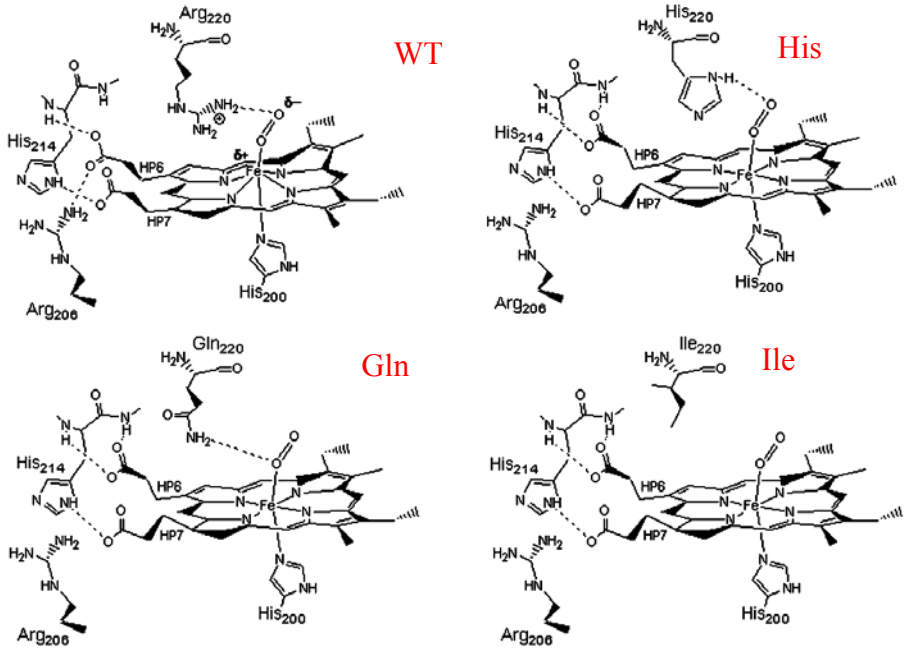


Figure 2.14: Schéma représentant les différentes formes d'interaction du résidu 220 avec l'O_2 dans l'oxycomplexe de FixLHwt et des mutants R220H, R220I, R220Q (d'après Balland *et coll.*, 2005).

2.1.7.5 Dynamique des ligands

Dans le but d'étudier le rôle de R220 dans la dynamique des ligands, nous avons effectué des analyses par spectroscopie ultrarapide sur les différents oxycomplexes des mutants R220A et R220H (collaboration A. Jasaitis, LOB) de la même façon que pour le type sauvage décrit précédemment.

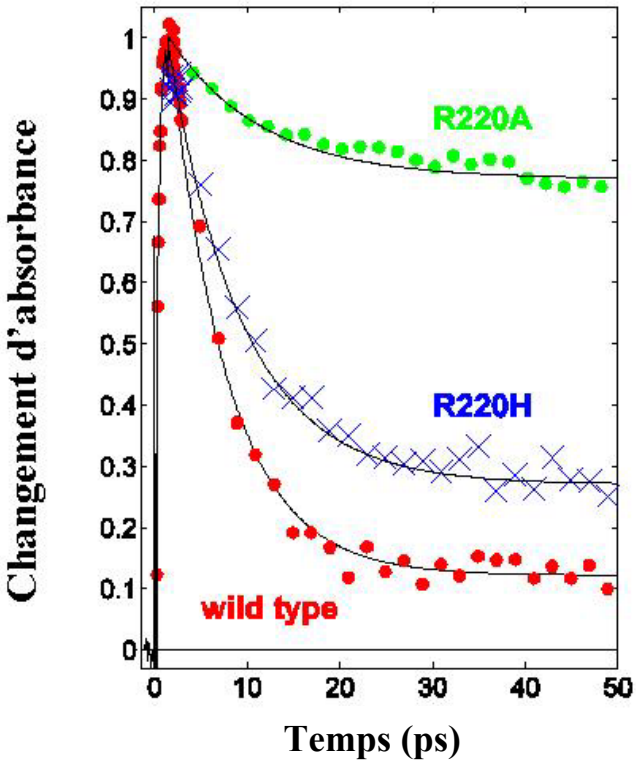


Figure 2.15 : Cinétique de recombinaison d'O_2, mesurée à 442nm, de FixLH-O_2. La cinétique en rouge correspond à FixLH, vert au mutant R220A, et les croix bleues au mutant R220H.

Pour l'ensemble des mutants, une phase de recombinaison de ~5 ps est observée. L'amplitude relative de cette phase est moins importante que dans le type sauvage (90%) pour tous les mutants, dans l'ordre A<H<WT (Figure. 2.15).

L'observation que seul His220 forme une liaison hydrogène avec l'oxygène terminal (Figure 2.14) et la présence de la liaison O_2-résidu 220 après dissociation (Liebl *et coll.*, 2002) sont responsables du piégeage d'O_2.

Les spectres associés à la phase de recombinaison sont beaucoup moins changés que le type sauvage par rapport à l'état déligandé y compris pour R220H. Ceci est en accord avec l'hypothèse que l'état dissocié de la protéine de type sauvage correspond à un état « contraint », intermédiaire dans la transmission.

Pour comprendre le facteur déterminant de l'affinité de l'oxygène dans la poche de l'hème de FixLH, et en particulier les propriétés cinétiques dans les premières picosecondes après dissociation, des simulations moléculaires ont été réalisées sur la protéine sauvage et sur le mutant R220A.

Dans la protéine de type sauvage, après rupture de la liaison hème-oxygène, dans la majorité des trajectoires simulées (8 sur 13) l'oxygène ne quitte pas la poche de l'hème, mais reste proche de sa position initiale (sur la figure 2.16, simulation structurale rouge), alors qu'avec le mutant R220A, l'oxygène présente une forte mobilité et s'éloigne de la poche de l'hème dans les trajectoires de 50 picosecondes (simulation en vert)

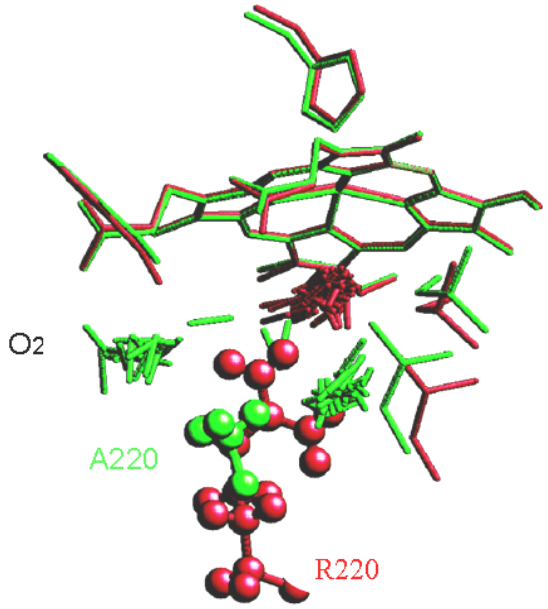


Figure 2.16: Comparaison de la dynamique moléculaire après dissociation de O_2 de FixLHwt (rouge) et de FixLH-R220A (verte) sur une échelle de 50 ps. La position de l'oxygène dissocié (tige verte ou rouge) est superposée à la structure de l'hème et des résidus R220 ou A220 (boules et bâtonnets) à des intervalles de 1 ps (d'après Jasaitis *et coll.*, 2006).

Le piégeage de l'oxygène dans la poche de FixLH sauvage semble dû à l'arginine 220 avec laquelle il interagit. Cette interaction est mise en évidence dans la simulation moléculaire

de la figure 2.17 A et B qui représente une trajectoire parmi la minorité de trajectoires dans lesquelles l'O_2 sort de la poche de l'hème dans FixLHwt. On voit que les mouvements de l'Arg220 et de l'O_2 sont concertés dans cette simulation. Il semble que l'oxygène déplace l'arginine et que la liaison hydrogène n'est pas rompue pendant ce processus.

Le premier changement de conformation de la chaîne peptidique au sein de l'hémodomaine paraît donc associé à la migration de l'O_2. La réorientation de l'arginine après ce processus de migration de l'O_2 est vers la position « deoxy », comme établi par cristallographie, mais ne correspond pas encore à celle-ci (Figure 2.17 B et C).

En particulier, sur une échelle de 50 ps, le groupe propionate 7 de l'hème reste en interaction avec un résidu arginine 206 et ne forme pas encore de pont salin avec l'arginine 220 (figure 2.17 C). D'autres changements de conformation sont donc attendus à une échelle de temps plus longue, non accessible par ces simulations et qui restent à déterminer.

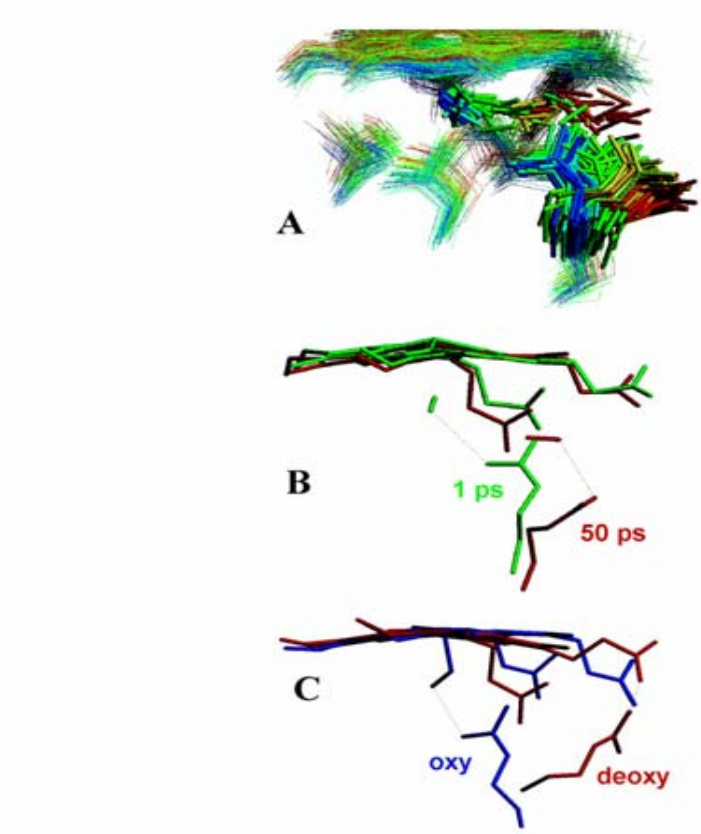


Figure 2.17: Simulation moléculaire de FixLH durant une des trajectoires dans lesquelles l'oxygène sort de la poche de l'hème. (A) Superposition des structures de dissociation Fe-O_2 à intervalles de 1ps entre -50 et 50 ps. Le changement de couleur du bleu vers le rouge se réfère au temps. (B) Structures de l'hème, de l'O_2, et de R220 à 1ps (en vert) et à 50 ps (en rouge) après dissociation. (C) Structure cristallographique de l'oxy-complexe (bleu, entrée PDB 1DP6) et du complexe non ligandé (rouge, entrée PDB 1LSW). Les traits en pointillés représentent les liaisons hydrogènes et les ponts salins conférés aux structures durant les simulations (d'après Jasaitis *et coll*., 2006).

L'ensemble de ces résultats démontre que la présence d'un résidu arginine en position 220 est en grande partie responsable d'une part des perturbations de l'hème lors de la dissociation de ligands et d'autre part de la forte réactivité de l'hème de FixL vis à vis du ligand physiologique O_2. Par ailleurs, les changements de conformation induits par le déplacement du fer de l'hème peuvent affecter l'histidine proximale H200 et par conséquent l'hélice contenant à la fois H200 et R206 participant ainsi à une réorganisation de la poche de l'hème responsable de la transduction du signal (Balland *et coll.*, 2005).

Des études prévues sur la protéine entière et les mutants R206I et I215A nous permettrons de renforcer nos premières analyses décrites dans ce travail et d'avancer vers une meilleure compréhension du mécanisme de transduction du signal dans la protéine FixL.

2.2. Dos : une nouvelle protéine senseur d'*Escherichia coli*

En 2000, Delgado-Nixon *et coll.,* découvrent une nouvelle protéine bactérienne senseur à hème, Dos, qu'ils supposent être un senseur direct à oxygène. En comparaison à FixL, Dos possède un hème six fois coordonné à l'état non ligandé et ligandé, la structure tridimensionnelle de l'hémodomaine (Park *et coll*., 2004) montre la présence d'une histidine proximale (H77) et d'une méthionine (M95). Cette dernière semble être déplacée par l'oxygène. Cette hypothèse m'a conduit à m'intéresser tout d'abord au mécanisme de détection de l'oxygène par l'hémodomaine isolé (DosH) et plus particulièrement, je me suis intéressée au rôle de la méthionine 95 (figure 2.18) et finalement au mode de fonctionnement de la protéine entière.

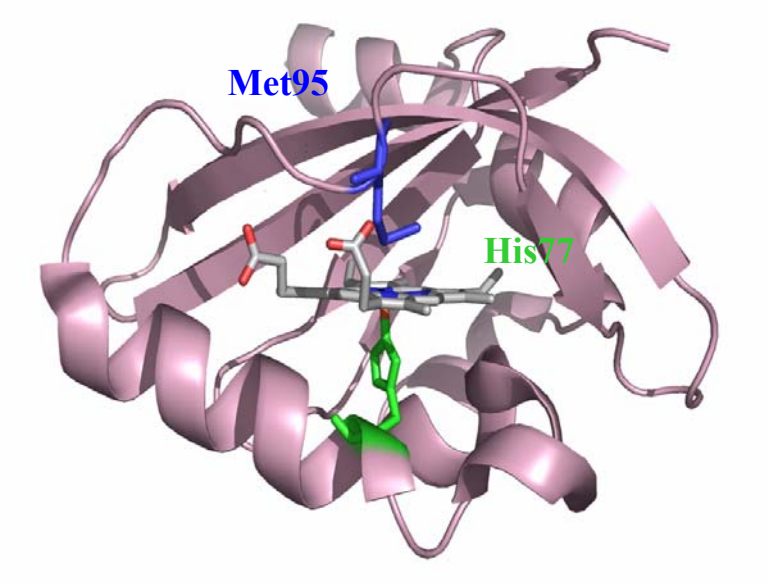


Figure 2.18 : Structure cristallographique tridimensionnelle de l'environnement de l'hème dans la protéine recombinante native *Ec*DosH). L'histidine 77 proximale est colorée en vert, la méthionine 95 en bleu, l'hème est en gris. Structure réalisée Pymol et l'entrée PDP 1S66.

La figure 2.18 montre la structure de l'environnement de la poche de l'hème DosH. La présence ou l'absence de ligands liés provoquent des changements significatifs de la conformation et le réarrangement des acides aminés. Plus particulièrement la chaîne latérale de la méthionine adopte différentes orientations selon l'état de ligation. En absence de liaison à l'oxygène, FixLH est cinq fois coordonnée alors que DosH est six fois coordonnée. La méthionine 95 a été proposée pour cette sixième liaison en absence d'oxygène (Delgado-Nixon

et coll., 2000) et il a été démontré par la suite comme étant le ligand axial interne (Gonzalez *et coll.,* 2002 ; Sato *et coll.,* 2002). L'interaction avec un ligand (O_2, CO, NO) devrait déplacer ce résidu, et donc entraîner une perturbation dans la poche hémique différente de celle de FixL. Dès lors la substitution de celle-ci par différents acides aminés permettra de vérifier le rôle de cet acide aminé dans la discrimination aux ligands et l'activité de cette protéine.

2.2.1. Clonage de l'hémodomaine DosH

Dans un premier temps, la région du gène *yddU* (Blattner *et coll.,* 1997, renommé *dos* par Delgado-Nixon *et coll,* 2000) codant pour l'hémodomaine PAS senseur à oxygène (*dosH*, correspondant aux codons 1 à 152) a été clonée dans le plasmide pCRT7-NT (Invitrogen) sous le contrôle d'un promoteur T7.

Nous avons introduit le gène en utilisant les amorces suivantes :

5'-ATG AAG CTA ACC GAT GCG GAT A -3' (sens)

5'-C GAC CGA CCG GTG ATT GTC CTC -3' (anti-sens).

Le nouveau vecteur pCRT7-DosH, possède une séquence de 6x histidines. Après clonage, nous avons vérifié par PCR et séquençage la bonne insertion et la séquence de l'insert (*dosH)* ainsi que la taille de l'insert avant expression. L'hémodomaine DosH est exprimée avec la séquence 6x histidines ce qui nous a permis par la suite de la purifier par chromatographie d'affinité sur une colonne greffée d'ions nickel.

Le vecteur d'expression pCRT7-*dosH* est utilisé pour transformer les bactéries BL21DE3 et la sélection des clones positifs a été réalisée sur un milieu contenant du LB/ampicilline (détails des protocoles dans Matériel et Méthodes).

2.2.2. Mutagenèse dirigée de M95

Le plasmide contenant l'insert codant pour l'hémo-domaine de la protéine sauvage, pCRT7-*dosH* a servi de matrice pour la mutagenèse dirigée. Les substitutions M95H, M95A et M95I ont été introduites par mutagenèse dirigée après avoir dessiné les amorces avec le codon méthionine ATG substitué, selon le protocole ''QuikChange site-directed mutagenesis''(Stratagene) par CAC, ATC et GCC, respectivement. Toutes les constructions ont été confirmées par séquençage avant l'expression des protéines et leur analyse par spectroscopie.

2.2.3. Expression et purification de DosH

La purification de l'hémodomaine DosH a été effectuée selon un protocole identique à celui de FixLH (voir Matériels et Méthodes).

Pour déterminer la concentration de la protéine DosH purifiée, un coefficient d'extinction ε_{416} = 129 $mM^{-1}cm^{-1}$ a été utilisé (Hirata *et coll.*, 2003). Le rendement moyen à partir d'1 litre de culture était de 500 µl de protéine dont l'absorption à 416 nm correspond à une concentration de 62 µM, comme il est résumé dans le tableau 2.3 ci-dessous. La pureté des protéines FixLH, vérifiée par migration sur SDS-PAGE, correspond à ≥ 95 %.

Ce procédé nous a permis de purifier 0,496 mg de protéines à partir d'1 litre de culture.

Volume culture	Quantité de cellules	DO_{416nm} dans une cuve 1mm	Concentration en protéine	Volume final	Quantité protéine en mg
1 L	5 g	0,8	62 µM	0,5 ml	0,496 mg

Tableau 2.3 : Tableau synthétisant le rendement de la purification de DosH.

Le spectre d'absorption (Figure 2.19) de DosH après élimination de l'imidazole montre que comme pour FixLH, l'hémodomaine surexprimé a conservé ses caractéristiques.

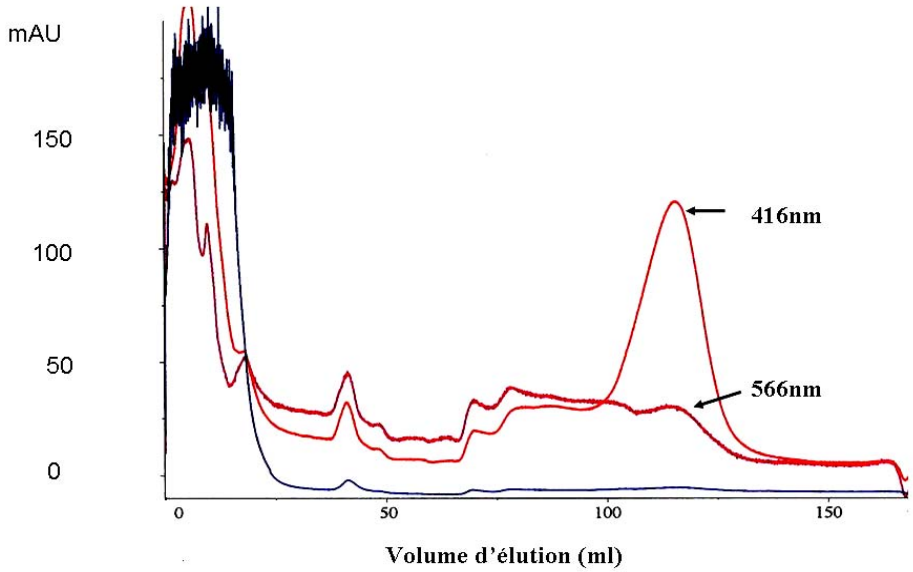


Figure 2.19 : Chromatogramme d'élution de DosH sur une colonne Nickel Probond (Invitrogen). L'absorbance de l'éluat est mesurée à 280 nm (courbe bleue), 416 nm (courbe rouge) et 566 nm (courbe fuschia). 416 et 566 nm sont des longueurs d'ondes caractéristiques de DosH oxydé.

Le maximum d'absorption correspond à la bande Soret (416 nm) spécifique d'un hème *b* Fe^{3+} hexacoordonné et les bandes α sont situées à 534 nm et 563 nm. La bande à 359 nm correspond à la bande δ de l'hème.

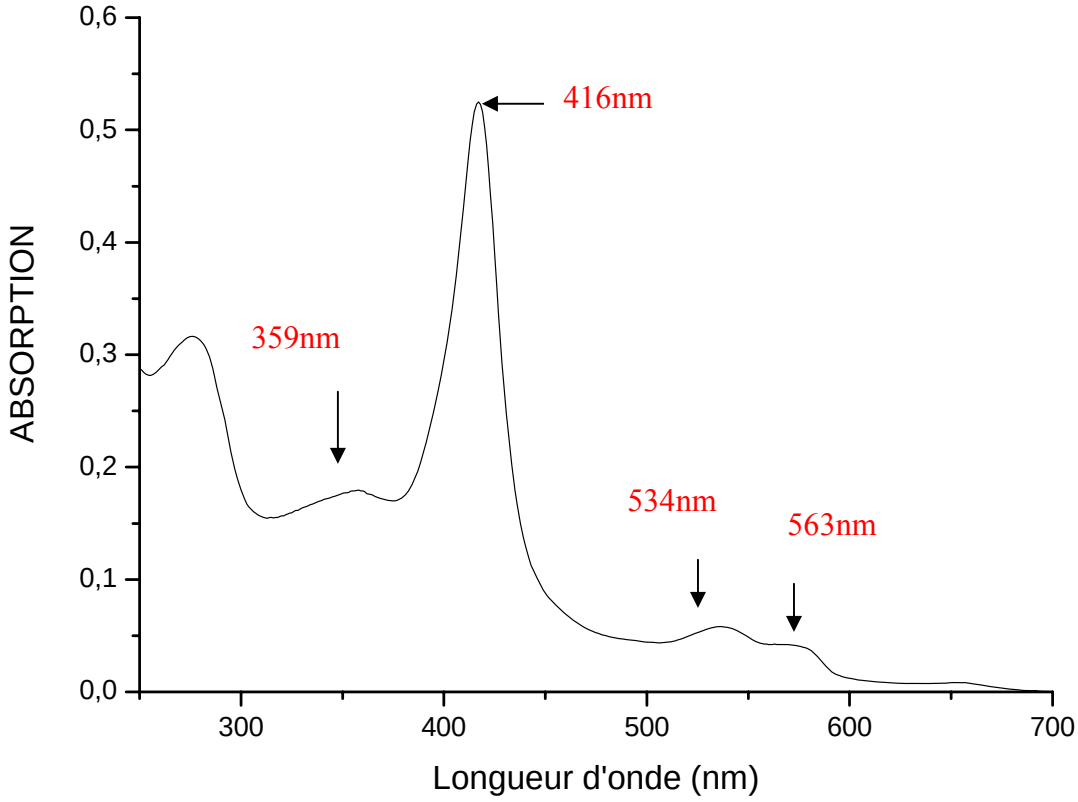


Figure 2.20: Spectre d'absorption de DosH après purification et élimination de l'imidazole. Le maximum d'absorption correspond à la bande Soret (416 nm) spécifique d'un hème *b* Fe^{3+} hexacoordonné et les bandes α sont situées à 534 nm et 563 nm. La bande à 359 nm correspond à la bande δ de l'hème.

La pureté des différents échantillons est vérifiée par migration sur SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie (figure 2.21). Nous pouvons observer dans l'éluat de la colonne de purification (pic d'absorption à 416 nm sur le chromatogramme de la figure 2.19) la présence d'une seule bande de masse moléculaire attendue de 16 kDa, calculée à partir de la séquence. Celle-ci est reconnue par l'anticorps anti-poly-histidines par analyse immunoblot.

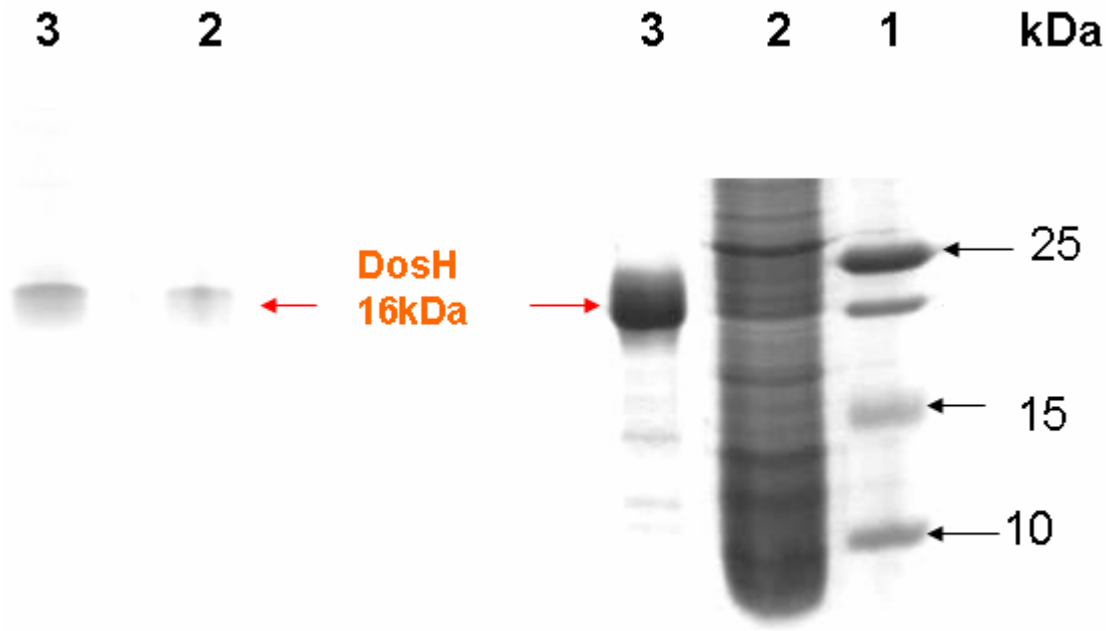


Figure 2.21 : Analyse des produits d'expression de DosHwt par SDS-PAGE 18% (gel de gauche) immuno blot révélé par un anticorps antipolyhistidine et (gel de droite) coloré au Bleu de Coomassie. Ligne 1: marqueur de taille, ligne 2: extrait brut de cellules exprimant DosH, ligne 3 : DosH purifiée.

2.2.4. Analyses par spectroscopie d'absorption à l'équilibre

Les spectres d'absorption à l'équilibre de DosH pour les différents états de ligandation sont montrés sur la figure 2.22. Pour les formes réduites, les spectres des formes CO, NO et O_2 ligandées sont similaires à ceux de FixL, caractéristiques d'un hème six fois coordonné. En revanche, le spectre de DosH réduit Fe^{2+} révèle une coordination avec deux ligands axiaux, qui ont été identifiés comme His77 et Met95 (Sasakura *et coll.*, 2002 ; Sato *et coll.*, 2002; Tomita *et coll.*, 2002), contrairement à FixLH dont l'hème est cinq fois coordonné. Le spectre de la forme Fe^{3+} (oxydée ou met) indique aussi un hème 6-fois coordonné. La structure 3D indique que dans cette forme, His77 et une molécule d'eau sont liées (Kurokawa *et coll.*, 2004).

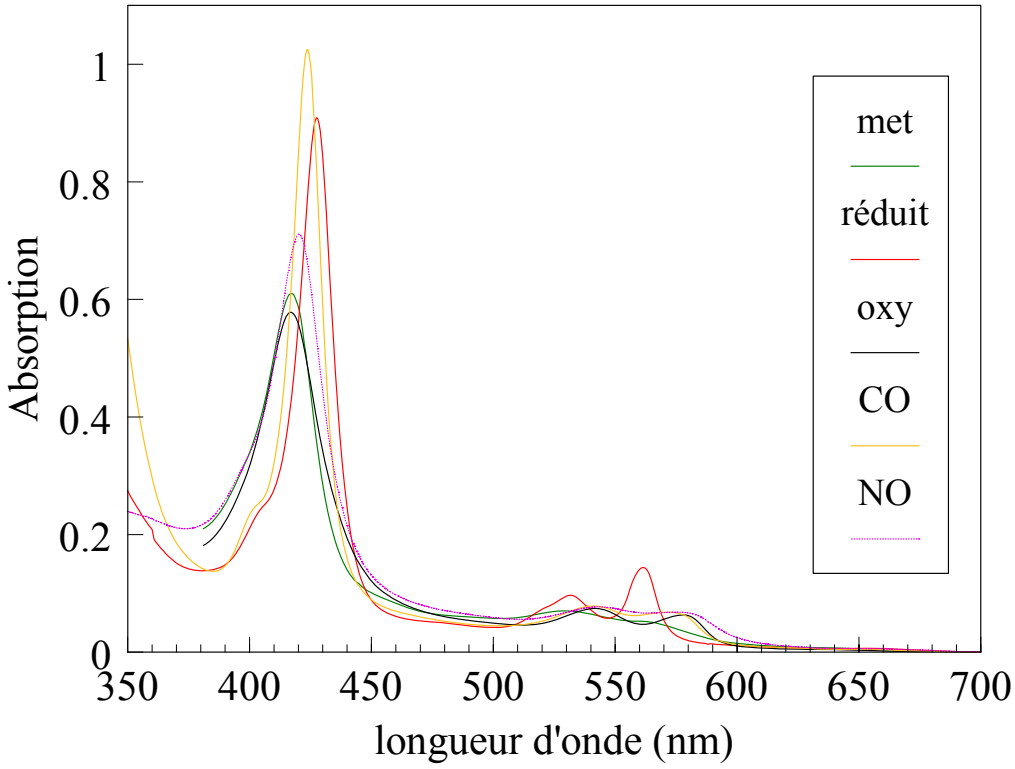


Figure 2.22 : Spectres de l'état fondamental de la protéine sauvage EcDosH des différentes formes non ligandées et associées aux ligands CO, NO et O_2. La forme met correspond à la forme purifiée oxydée non ligandée.

Deux rôles différents de senseur ont été proposés pour Dos : senseur à oxygène (Delgado-Nixon *et coll.*, 2000) et senseur redox (Sasakura *et coll.*, 2002). Dans les deux cas, la méthionine 95 doit jouer un rôle important, car sa liaison avec l'hème est déplacée par l'O_2 dans le premier cas et par l'H_2O dans le deuxième cas. Pour pouvoir étudier le rôle de ce résidu dans les premiers processus de transmission intra-protéine, j'ai construit des mutants où Met95 est remplacé par Ala et Ile (incapables de lier l'hème, Ile est de volume similaire à Met) et His (capable de se lier à l'hème).

2.3. Caractérisation des mutants M95A, M95I et M95H

2.3.1. Analyse biochimique des produits exprimés et purifiés

Les protéines mutées exprimées et purifiées sont analysées sur SDS-PAGE 18% avec la présence d'une bande unique de protéines migrant à la masse moléculaire apparente attendue de 16 kDa.

Les mêmes échantillons sont ensuite analysés par immunoblot (figure 2.23) révélé par un anticorps anti-polyhistidine et montrent la même bande protéique à 16 kDa.



Figure 2.23: Analyse des produits d'expression de DosHwt et M95A, M95H et M95I purifiés immuno blot révélé par un anticorps anti-polyhistidine. Ligne 1 : marqueur de taille, ligne 2 : DosHwt purifiée, ligne 3 : M95A purifiée, ligne 4 : M95H purifiée, ligne 5 : M95I purifiée. La masse moléculaire apparente de la protéine est indiquée par une flèche rouge à 16 kDa.

Les protéines mutées M95H et M95I ont un taux d'expression similaire à celui de la protéine sauvage dans les mêmes conditions d'expression, en revanche le taux d'expression du mutant M95A est plus faible.

Pour mieux visualiser l'effet de la mutation en position M95, des modélisations moléculaires à partir de la protéine DosH à l'état non ligandé ont été effectuées avec les mutants M95A, M95I, et M95H (figure 2.24). Les mutations M95A, M95I sont celles qui induisent le plus grand changement stérique dans la poche de l'hème.

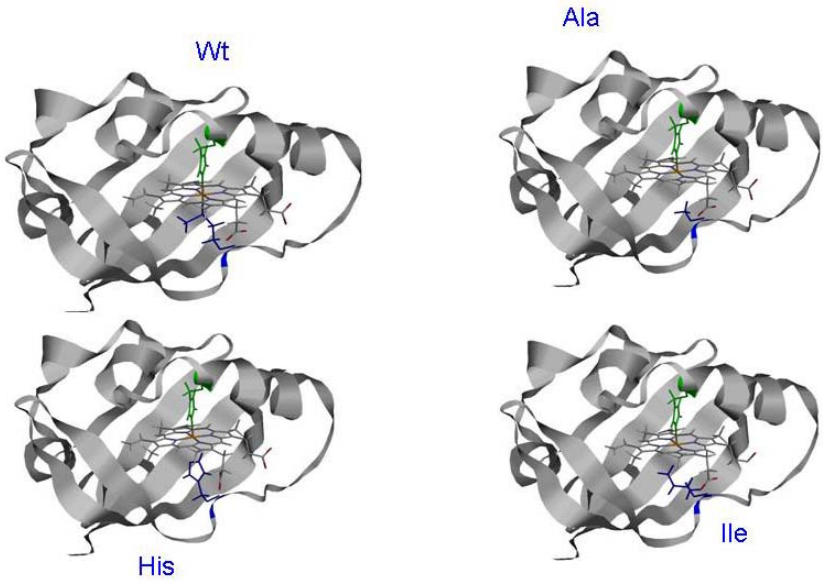


Figure 2.24: Analyse structurale comparative des différents mutants de DosH, mettant en évidence les modifications dans la poche de l'hème. Entrée PDB 1S67, correspondant à l'hémodomaine de Dos non ligandé (Park *et coll*, 2004). Réalisation des structures avec le logiciel Rasmol.

2.3.2. Analyse par spectroscopie d'absorption

La figure 2.25 montre les spectres d'absorption à l'équilibre des trois différents mutants générés en comparaison avec la protéine sauvage (les valeurs des maxima d'absorption sont résumées dans le Tableau 2.2). Ces spectres sont qualitativement similaires à celui de la protéine sauvage DosH qui présente un hème six fois coordonné et une absorption typique à 416 nm et 534-563 nm pour l'état oxydé. Cependant le mutant M95A montre un rendement plus faible après purification, l'hème dans ce mutant se détache plus facilement, ce qui a rendu les manipulations par spectroscopie d'absorption plus difficiles.

Toutes ces protéines sont six fois coordonnées à l'état Fe^{3+}, ce qui indique que la molécule d'eau liée à l'hème pour le type sauvage reste présente dans la poche de l'hème dans tous les mutants. On peut remarquer que pour le mutant M95I, où la méthionine a été remplacée par une isoleucine comme dans FixL, la coordination de l'hème Fe^{3+} est différente de FixL (figure 2.25).

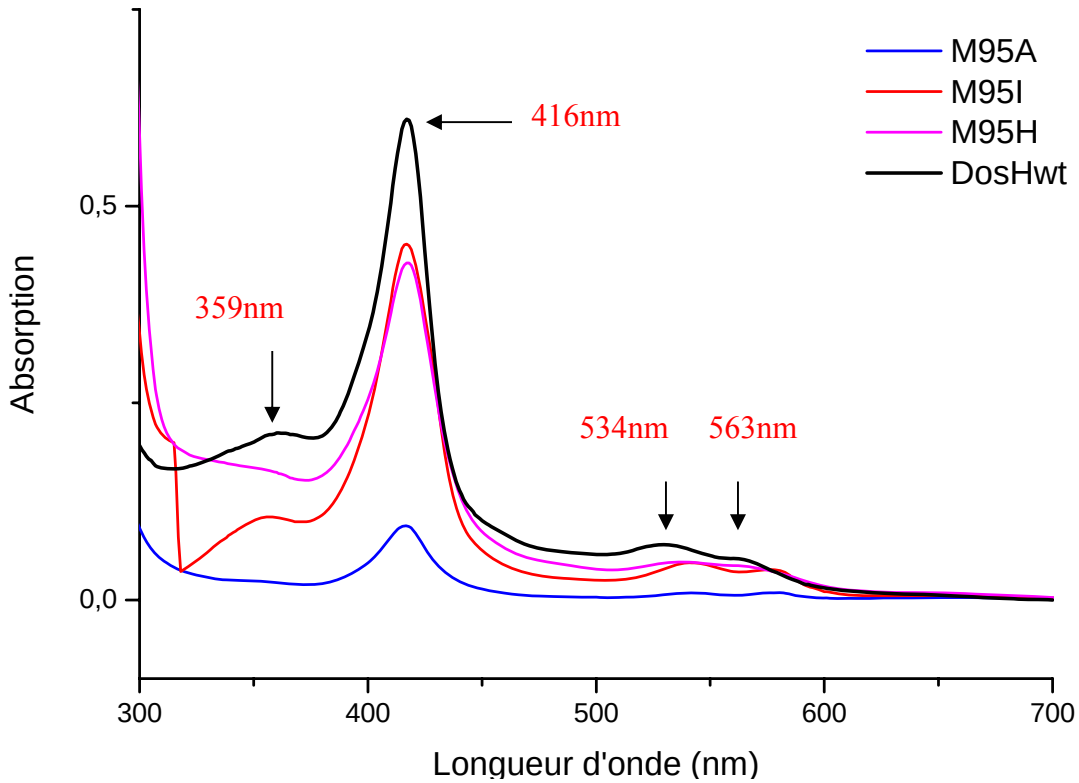


Figure 2.25 : Spectre d'absorption de DosHwt (spectre noir) et des mutants M95A (spectre bleu) M95H (spectre fuschia) et M95I (spectre rouge) après purification et élimination de l'imidazole. Le maximum d'absorption correspond à la bande Soret (416 nm) spécifique d'un hème six fois coordonné et les bandes α β en 534nm, 563nm. Pour la protéine DosHwt une bande à 359 nm a toujours été observée. Cette bande est aussi présente dans le mutant M95I et correspond à la bande δ de l'hème.

Après réduction en *absence* de ligand externe, le mutant M95H forme un complexe six fois coordonné, comme le type sauvage, indiquant que l'histidine en position 95 lie l'hème, ainsi l'hème devient « bis-His » coordonné. Sous les mêmes conditions, les mutants M95A et M95I sont 5 fois coordonnés, en accord avec le fait que ces résidus ne peuvent pas former une liaison avec l'hème (Tableau 2.4). Les formes réduites ligandées des mutants ont des caractéristiques spectrales similaires à celles du types sauvage.

protéine	Met (Fe^{3+})	Déoxy (Fe^{2+})
Bandes d'absorption	γ, α	γ, α
Doswt	417, 534-563	
DosHwt	416, 534-563	423, 532-563
	6c	6c
	129 $mM^{-1}cm^{-1}$	175 m $M^{-1}cm^{-1}$
DosHM95A	414, 534-563	432, 560
	6c	5c
	124 $mM^{-1}cm^{-1}$	
DosHM95H	415, 533-564	427, 5 32-561
	6c	6c
	126 $mM^{-1}cm^{-1}$	
DosHM95I	356, 417,541-575	428,531-560
	6c	5c

Tableau 2.4 : Propriétés d'absorption des formes non-ligandées de la protéine *Ec*DosH et des différents mutants étudiés. Les valeurs des coefficients d'absorption sont celles de Watanabe et *coll.,* 2002 et de Gilles-Gonzalez et *coll*., 2002). 5c et 6c indique l'état de coordination du fer de l'hème.

2.3.3. Dynamique des ligands dans DosHwt et les mutants M 95

La cinétique de recombinaison du CO avec l'hémodomaine DosH est remarquable, de part sa constante de vitesse de 1.5 ns (correspondant à une amplitude de 60% de CO dissocié) (figure 2.26). Dans beaucoup d'hémoprotéines, dont FixL et la myoglobine, il n'y pas de recombinaison géminée du CO sur l'échelle de temps inférieur aux microsecondes. Cette

particularité de DosH suggère que la poche de l'hème est très restreinte, laissant peu de liberté de mouvement pour le CO dissocié. Bien que légèrement différentes, les principales caractéristiques de la recombinaison de CO dans les mutants M95H et M95I sont très similaires à celles du type sauvage (figure 2.26). Ce résultat implique que ce n'est pas le résidu méthionine 95 qui est en premier impliqué dans la recombinaison nanoseconde. Nous en déduisons qu'en présence de CO, la méthionine ne se trouve pas à proximité et donc une réorganisation importante de la poche de l'hème entre la liaison d'un ligand externe et interne est en cause dans la protéine réduite.

Nous pouvons suivre le même raisonnement pour le ligand O_2, car la recombinaison très rapide (5.3 ps) et très efficace avec l'O_2 dans la protéine DosHwt est qualitativement similaire dans le mutant M95H (figure 2.26, *inset*). Cela permet de conclure qu'il y a une réorganisation importante de la poche de l'hème entre la liaison de l'O_2 et la méthionine, en accord avec les structures 3D de l'hémodomaine DosH (Park *et coll.*, 2004).

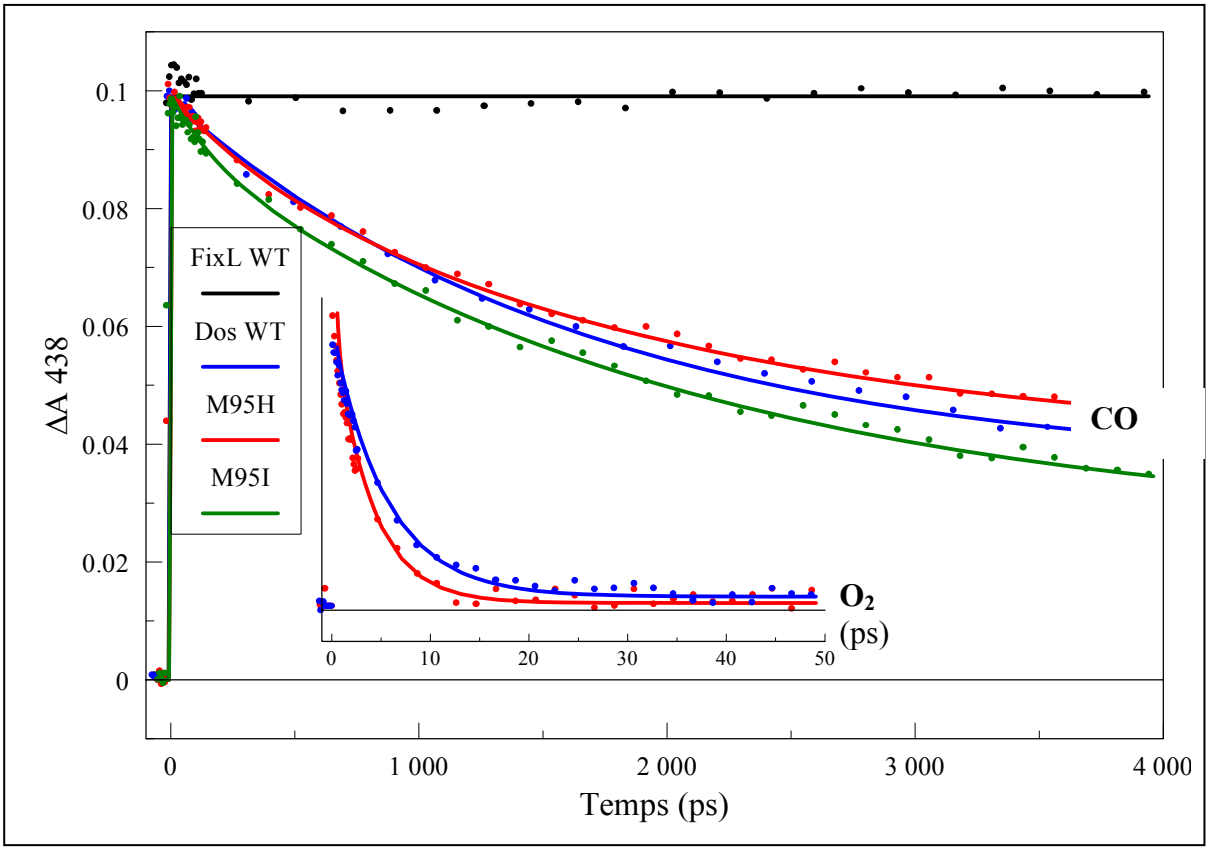


Figure 2.26 : Cinétique de recombinaison de CO avec DosHwt et mutants en position M95, en comparaison avec FixLH. Insert : recombinaison d'O2 avec DosH et M95H. Ces cinétiques sont mesurées à 438 nm.

Par ailleurs, nous observons que les caractéristiques cinétiques et spectrales de la recombinaison d'O_2 dans DosHwt sont similaires à celles de FixLHwt, dont nous avons discuté les implications générales dans le rôle senseur de la protéine.

Il est possible de photodissocier la méthionine 95, ligand interne de l'hème *réduit* et ainsi étudier sa recombinaison en absence de ligand diatomique (CO, NO, O_2). Un tel comportement a été observé dans plusieurs protéines (en particulier le cytochrome *c* (Cianetti *et coll.*, 2004) et le senseur CooA (Kumazaki *et coll.*, 2000), où la cinétique observée est monophasique avec une constante de temps de ~7 ps.

Dans DosHwt, par contre, la cinétique de recombinaison est clairement bi-phasique ce qui suggère que la deuxième phase (35 ps) représente la recombinaison à partir d'une conformation intermédiaire qui intervient dans le cheminement de signalisation (échange Met95–O_2). Dans le mutant M95H l'hème réduit est aussi six fois coordonné avec une liaison Fe^{2+}-M95H (tableau 2.4.). Contrairement à la protéine sauvage, la cinétique de recombinaison de His95 (figure 2.27) est mono-phasique (~8 ps) et par conséquent la configuration intermédiaire n'est pas atteinte.

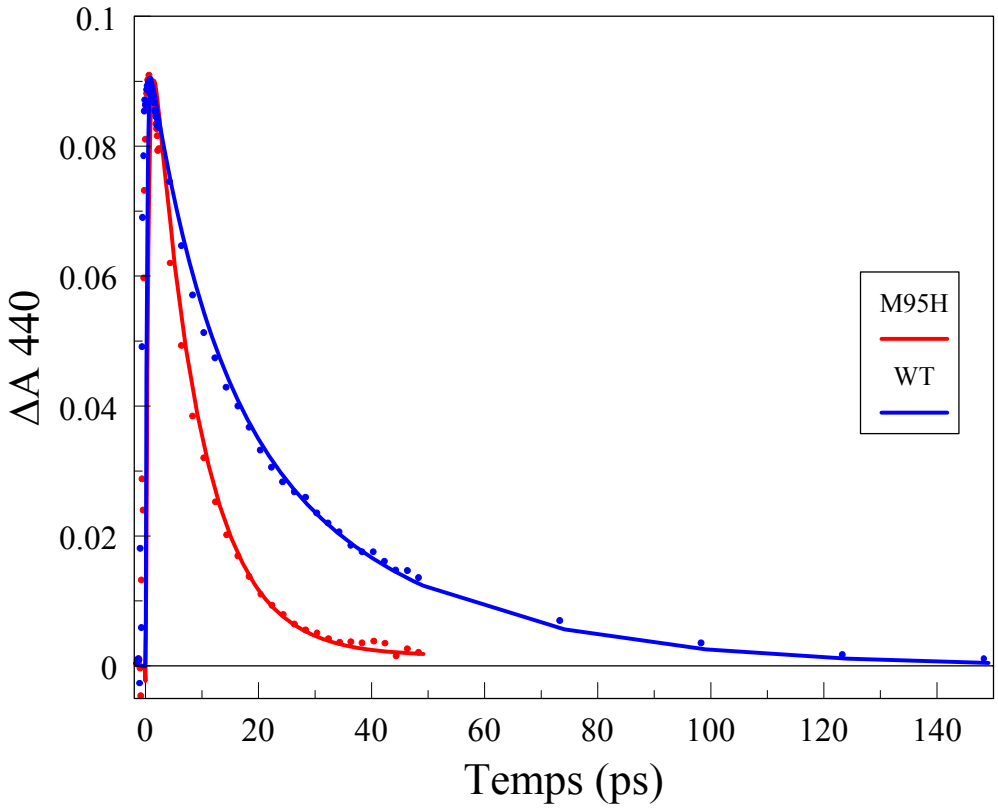


Figure 2.27 : Cinétiques de recombinaison de ligands internes avec DosHwt et M95H. La cinétique est monoexponentielle (constante de temps 8 ps) dans le cas de recombinaison avec His95 et bi-exponentielle (constantes de temps 7 ps et 35 ps, amplitudes 1:1) avec Met95.

Un modèle illustrant ces données pour la protéine sauvage et pour le mutant M95H est présenté en figure 2.28.

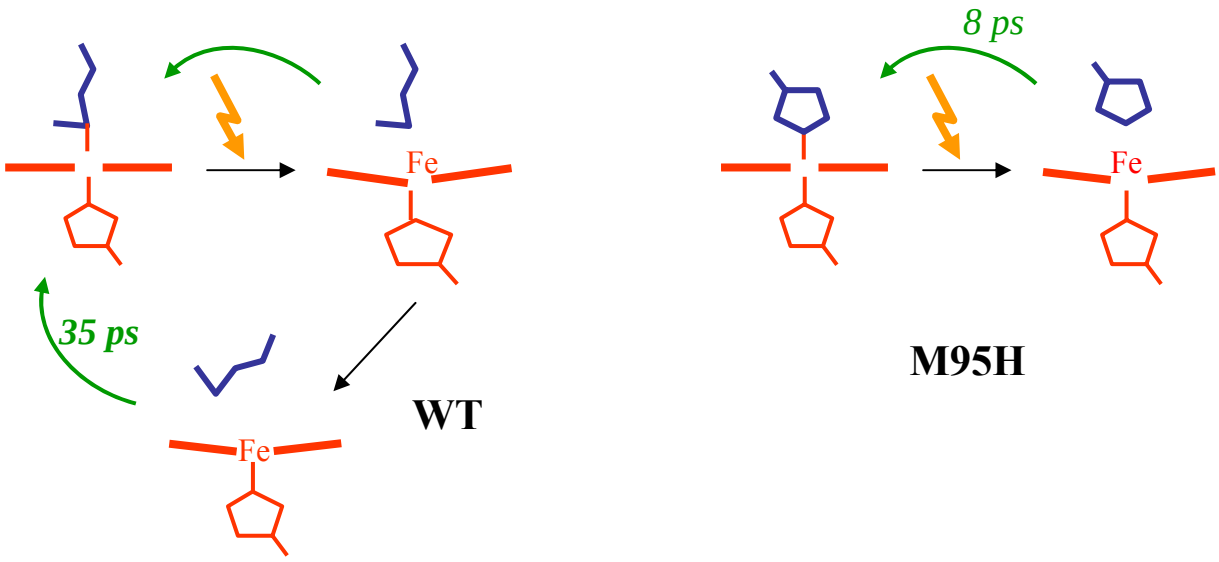


Figure 2.28 : Schéma de recombinaison de ligands internes dans DosH réduite. Dans le type sauvage (schéma à gauche), après dissociation de Met95, il y a une compétition entre la recombinaison directe avec l'hème (en ~7 ps) et un changement conformationnel de la méthionine, qui mène à une recombinaison plus lente. Dans le mutant M95H (à droite), seule la recombinaison directe de His95 avec l'hème peut avoir lieu.

En perspective, nous prévoyons d'explorer l'influence de l'environnement de l'hème sur la flexibilité fonctionnelle proposée pour Met95, en générant d'autres mutants, et en utilisant des techniques de spectroscopie vibrationnelle (Raman et infrarouge). Arg 97 semble un bon candidat de part sa position dans la poche de l'hème, et son intéraction avec l'O_2 dans l'oxycomplexe comme Arg220 dans FixL.

2.4. Clonage et expression de la protéine entière *Ec*Dos

Jusqu'à ce jour nos analyses structure-fonction des protéines Fixl et Dos ont porté exclusivement sur leur hémodomaine senseur. Afin de mieux comprendre la fonction de Dos et

le mécanisme de la signalisation intra-protéique, j'ai entrepris le clonage et l'expression de la protéine entière, comprenant le domaine catalytique phosphodiestérase.

Le gène de la protéine entière d'*Ec*Dos (résidus 1 à 799) a été amplifié par PCR en utilisant les amorces suivantes : 5'-ATG AAG CTA ACC GAT GCG GAT -3' (sens) et 5'-TCA GAT TTT CAG CGG TAA CAC -3' (anti-sens). Il a ensuite été introduit dans le plasmide pCRT7/NT (voir Matériels et Méthodes) et exprimée dans la souche BL21DE3 sur une durée de 5 h à 37°C, en présence et absence d'IPTG. A titre de contrôle, cette construction a été également introduite dans la souche DH 5*a*. La cinétique de l'expression dans les lysats cellulaires est présentée dans la figure 2.29. On peut constater une expression de la protéine Dos entière dans BL21DE3 en fonction du temps après induction. Dos migre comme bande protéique avec une masse moléculaire apparente d'environ 90 à 95 kDa (voir lignes 6, 9, 12 et 14), bien en accord avec sa masse moléculaire de 90.4 kDa calculée à partir de la séquence protéique.

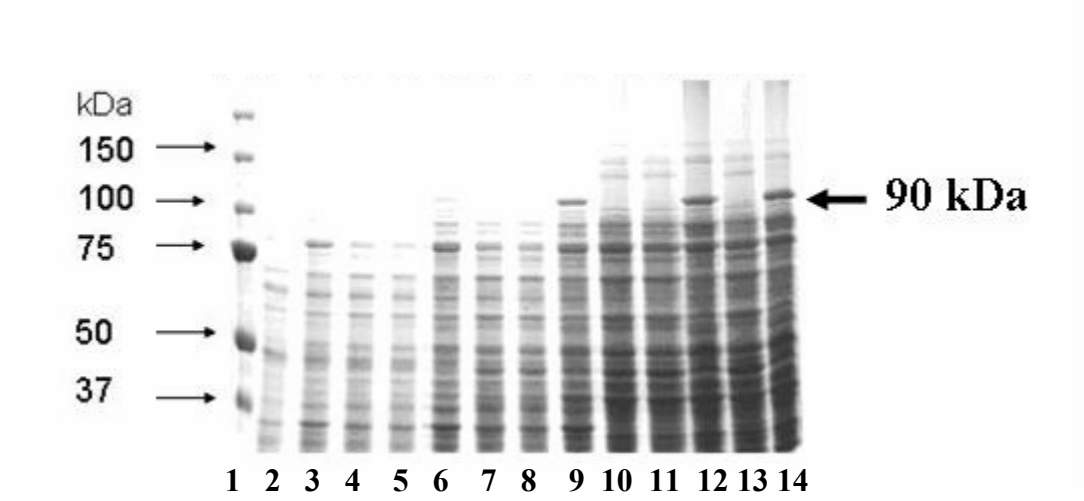


Figure 2.29: SDS-PAGE 8% coloré au bleu de Coomassie des produits d'expression Doswt dans les souches DH5 α et BL21DE3 après différents temps d'incubation.
1 : marqueur, 2 :T0/DH5α, 3 :T0/BL21DE3, 4 :T1H/DH5α (-) 5 :T1h/DH5α (+), 6 :T1H/BL21DE3 (+), 7 :T2H/DH5α (-), 8 :T2h/DH5α(+), 9 :T2h/BL21DE3(+),10 :T4h/DH5α(-) ,11 :T4h/DH5α (+), 12 :T4h/BL21DE3 (+), 13 :T5h/DH5α (+), 14 :T5h/BL21DE3 (+).
La flèche indique la position de la protéine Doswt entière (90,4 kDa). (+) et (–) indique la présence ou l'absence d'IPTG pour l'induction de l'expression.

Pour la purification j'ai suivi le même procédé que pour l'hémodomaine DosHwt. J'ai constaté que le rendement protéique de Dos est très faible, en comparaison avec des résultats obtenus avec le domaine senseur DosH isolé dans les mêmes conditions d'expression et de

purification. D'une part, ce rendement faible peut s'expliquer par la nature hydrophobe de la région N-terminale de Dos, provoquant la formation de corps d'inclusion. De plus, un mauvais repliement de la protéine (90.4 kDa) peut la rendre plus sensible à une dégradation enzymatique.

D'autre part, une toxicité du produit exprimé vis-à-vis de la souche bactérienne utilisée peut exister. En effet en 2005, Ryjenkov *et coll.,* ont rapporté que l'expression du domaine GGDEF chez *Rhodobacter sphaeroides* dans la souche BL21DE3 d'*E. coli* était très toxique pour cette souche. Ils ont reproduit la même expérience chez *Synechocystis sp.* et chez *E. coli* avec le même résultat, et ont déduit ainsi que ce n'est pas la protéine issue de GGDEF qui est responsable de la toxicité, mais plutôt le produit de l'activité de celle-ci, le di-GMPc.

Dans le but d'améliorer le rendement de la protéine entière Dos, je poursuis actuellement plusieurs pistes :

a) clonage dans deux plasmides sous contrôle des promoteurs moins forts (T5) ou étroitement contrôlable comme pBAD
b) expression de ces constructions dans la souche *E. coli* DH5α, où plusieurs protéines à domaine GGDEF ont été récemment surexprimées avec succès (Ryjenkov *et coll.,* 2005)
c) tronquer la partie N-terminale de Dos de manière spécifique pour réduire son dégré d'hydrophobicité.

2.4.1. Partenaires possibles de Dos

La protéine Dos d'*Escherichia coli* est constituée d'un domaine senseur possédant un hème à l'extrémité N-terminale, et d'un domaine catalytique phosphodiéstérase en C-terminal.

Un rôle comme senseur direct à oxygène a été proposé pour Dos (Delgado-Nixon *et coll*., 2000), ainsi qu'une fonction comme senseur redox (Sasakura *et coll.,* 2002, 2005). Différente de FixL, qui fait partie d'un système de régulation à deux composants avec son régulateur de réponse FixJ, chez Dos aucun système de ce type n'a été mis en évidence, et il n'a pas été identifié de partenaires d'interaction. Pour le domaine catalytique phosphodiésterase de Dos, une spécificité pour le di-GMPc (Schmidt *et coll.,* 2005 ; Mendez-Ortiz *et coll.,* 2006), ainsi qu'un rôle dans la régulation du niveau d'AMPc cellulaire dans *Escherichia coli* ont été suggérés (Sasakura *et coll*., 2004, 2005, 2006). Ce qui m'a amenée à rechercher des partenaires possibles de Dos.

Dans une première étape, j'ai effectué des analyses *in silico* dans le but d'obtenir plus d'information sur l'organisation génomique de *yddU* (renommé *dos*) et les ORF l'entourant qui pourront servir de point de départ pour une analyse expérimentale. Une représentation du contexte génomique se trouve sur la figure 2.30.

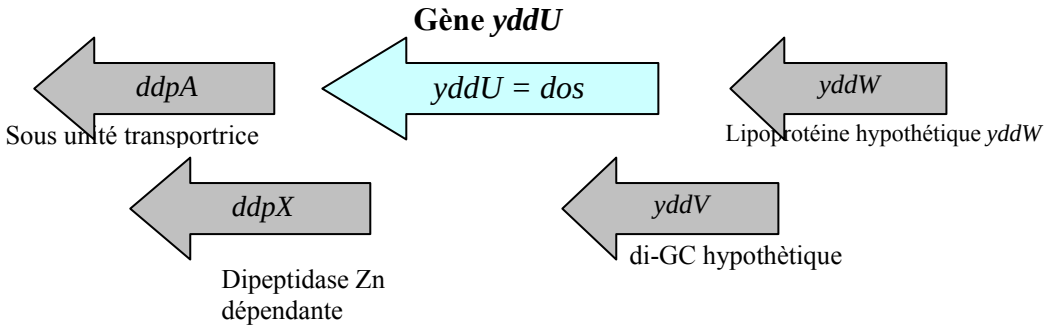


Figure 2.30 : Représentation du contexte génomique du gène *yddU d'Escherichia coli*

Quelques fonctions ont été attribuées aux gènes dans le contexte génomique du gène *yddU : ddpA* code pour une sous-unité d'un transporteur de fonction inconnue, *ddpX* pour une dipeptidase Zn dépendante, *yddW* pour une lipoprotéine hypothètique, et enfin *yddV* pour une diguanylate cyclase.

Dans la perspective de mieux caractériser cette protéine ainsi que ces partenaires d'interaction potentiels, j'ai fait synthétiser (par le laboratoire Charles River, France) un anticorps polyclonal chez le lapin, dirigé contre l'hémodomaine DosH, qui m'a servi dans l'expérience d'immunoprécipitation à partir de lysats de cellules bactériennes. Différentes variantes des tampons de lyse et plusieurs paramètres ont été testés au cours des différentes expériences (procédé décrit dans Matériels et Méthodes). Cependant dans ces réactions, je n'ai pas observé de complexe associé à l'anticorps anti-DosHwt, ni à un anticorps anti-polyhistidine en utilisant 500 µL de lysat cellulaire bactérien après surexpression.

Cette absence de complexe peut s'expliquer d'une part par le repliement de la protéine Dos qui empêche sa détection par l'anticorps et d'autre part par l'absence de partenaire protéique sous ces conditions de réaction. Très récemment Mendez-Ortiz *et coll.* (2006) ont décrit une co-transcripition du gène *yddV* avec *dos* mais aucune étude biochimique n'a été effectuée. Ces résultats préliminaires ne permettent pas pour l'instant de conclure qu'un partenaire direct

d'interaction n'existe pas pour Dos. Probablement la méthode est encore limitée par un faible rendement protéique et le fait que l'anticorps ne soit pas dirigé contre la protéine entière.

Actuellement, je travaille sur une autre approche, par la réalisation d'une souche bactérienne avec une délétion du gène *dos* pour étudier les effets sur la morphologie des colonies, sur de la croissance au cours du temps ou en milieu microaérophile, ainsi que sur l'activité phosphodiésterasique.

2.5. Un nouveau senseur à hème chez *Pseudomonas aeruginosa ?*

2.5.1. Analyses *in silico*

Au cours de mes études sur les protéines senseurs FixL et Dos, j'ai rencontré un certain nombre de bactéries capables de vivre en condition d'hypoxie, parmi lesquels la bactérie Gram-négative *Pseudomonas aeruginosa*. Sa capacité à s'adapter à des conditions d'hypoxie m'a amenée à étudier la possibilité de l'existence d'un hémosenseur chez cette bactérie. En conséquence, j'ai cherché des homologies entre les séquences consensus des domaines PAS de FixL et Dos dans le génome de *P. aeruginosa*.

Afin d'identifier une séquence protéique commune, des analyses *in silico* ont été réalisées avec les programmes SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) et CDD (*Conserved Domain Database*) (*www.sanger.ac.uk/softaware*). Cette analyse m'a permis d'identifier une séquence protéique de *Pseudomonas aeruginosa PA5442, qui possède* des domaines communs avec les deux protéines senseurs précédemment étudiées. Les résultats sont regroupés dans la figure 2.31.

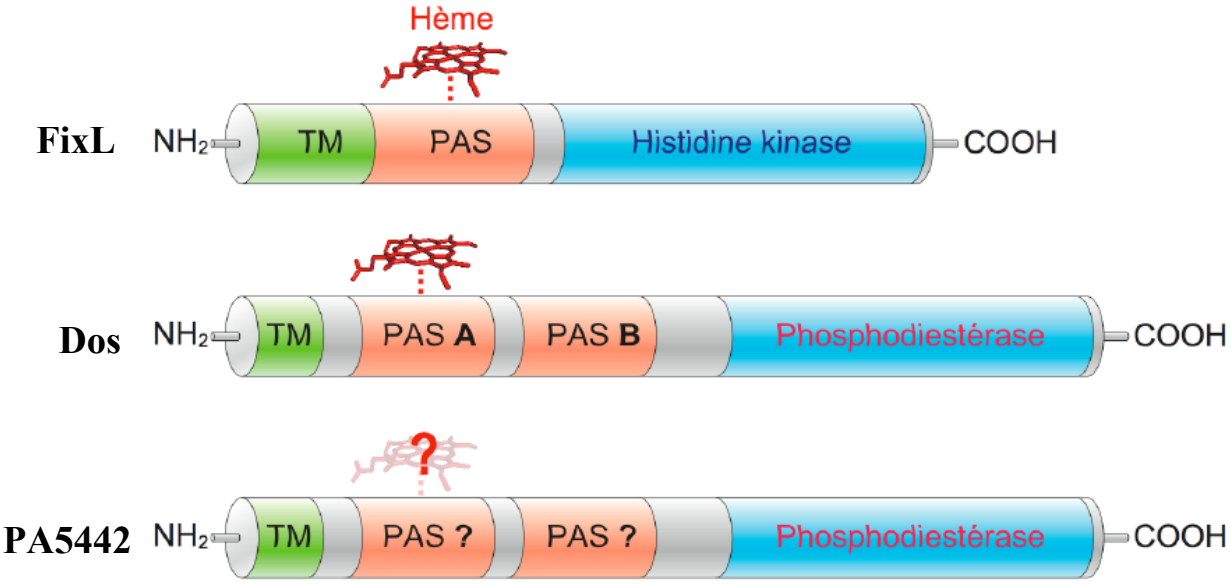


Figure 2.31. Analyse comparative des domaines structuraux de PA5442, *Ec*Dos et *Bj*FixL. Les domaines communs PAS, GGDEF, EAL sont décrits ultérieurement dans le manuscrit.

Pour la protéine PA5442 de *P. aeruginosa*, deux domaines PAS sont identifiés avec le programme CDD. Le premier s'étend des résidus 285 à 390, et un autre de 401 à 512. Mais on constate également la présence des domaines GGDEF et EAL dans Dos et PA5442. Le domaine GGDEF semble ubiquitaire chez un grand nombre de bactéries et est souvent associé à un domaine régulateur dans la transduction du signal. Sa fonction est impliquée dans la synthèse du di-GMPc, utilisé dans beaucoup de bactéries comme molécule de signalisation intracellulaire.

Les processus régulés par ce domaine incluent la synthèse d'exopolysaccharides, donc la formation de biofilm, la motilité et la différenciation des cellules. Pour ce qui est du domaine EAL, il est rencontré dans diverses protéines bactériennes de signalisation. Il est dénommé ainsi du fait de la conservation des acides aminés qui le compose (glutamate, alanine, leucine) et semble former le site actif de la phosphodiestérase. La protéine codée par le gène *pa5442* possède donc de nombreuses caractéristiques communes aux senseurs à ligands diatomiques et sur un plan structural semble proche de la protéine Dos.

Dans cette perspective j'ai ensuite effectué un alignement de séquences des domaines PAS de FixL, Dos et PA5442, afin d'identifier des acides aminés susceptibles d'être impliqués dans la liaison avec un cofacteur hémique (figure 2.32).

```
PA5442      410 ASESIVILDPAYNLLAVNQAFS.[2].TGYRREDVVGRNA.[1].LLVNTPE.[3].HYRQIRAE.[5].QWQGELVDTR 480
FIXL         13 IPDAMIVIDGHGIIQLFSTAAE.[2].FGWSELEAIGQNV.[1].ILMPEPD.[3].HDSYISRY.[9].GIGRIVTGKR 87
DOS          21 NMMGAVLINENDEVMFFNPAAE.[2].WGYKREEVIGNNI.[1].MLIPRDL.[3].HPEYIRHN.[9].GMSRELQLEK 95
```

Figure 2.32 : Alignement de séquences des protéines PA5442 de *Pseudomonas aeruginosa, Bj*FixL et *Ec*Dos. Les histidines conservées (H77 dans la protéine DosH, H200 dans FixLH et H458 dans PA5442) sont indiquées en jaune.

Une comparaison de séquences des domaines PAS des trois protéines indique la présence d'un résidu histidine conservé (H77 dans la protéine DosH, H200 dans FixLH et H458 dans PA5442 ; Figure 2.32) susceptible d'être l'équivalent de l'histidine proximale de Dos et FixL dans PA5442, suggérant re un hémodomaine PAS.

2.5.2 Clonage du gène *pa5442*

Un fragment du gène *pa5442* a été amplifié par PCR correspondant aux résidus 280 à 952 (comprenant les deux domaines PAS et la région 3') puis cloné dans le plasmide pCRT7 en utilisant le système d'insertion par des topoisomèrases (TOPO). Le produit de clonage a été amplifié par PCR, pour vérifier l'orientation de l'insert dans le plasmide, et séquencé. J'ai ensuite transformé le produit de clonage dans les bactéries BL21DE3 et DH5α, qui sont utilisées pour l'expression de la protéine, expression réalisée à partir du plasmide pCRT7 placé sous le contrôle du promoteur T7. Le protocole est identique à celui de Dos et FixL (détails dans Matériels et Méthodes).

2.5.3. Purification de la protéine PA5442 de *Pseudomonas aeruginosa*

La purification de la protéine PA5442 a été effectuée de façon identique à celle de FixLH ou DosH avec un rendement très faible. En analysant par SDS-PAGE et immunodétection l'extrait soluble après sonication (lysat clair) et les culots cellulaires contenant les protéines insolubles (extraits bruts), j'ai pu évaluer le niveau d'expression de PA5442 et estimer si la protéine est exprimée sous forme soluble ou dans des corps d'inclusion. Les résultats présentés dans la figure 2.33 montrent l'analyse des extraits bruts cellulaires et des lysats clairs.

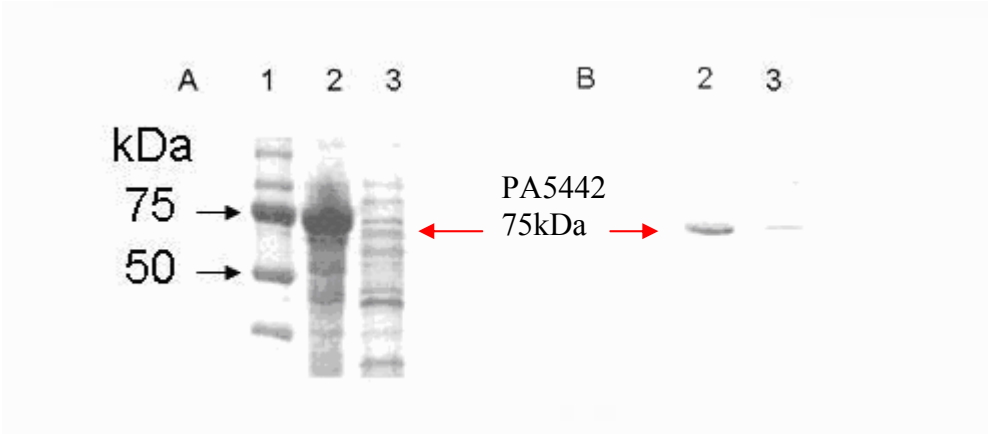


Figure 2.33 : SDS-PAGE 8% des produits d'expression de PA5442, dans BL21DE3 (A) gel coloré au Bleu Commassie (B) immunoblot révélé avec un anticorps antipolyhistidine (1): Marqueur moléculaire de taille, (2) extrait brut contenant PA5442, (3) lysat clair contenant PA5442.

On peut voir que la protéine PA5442, représentée par la bande principale avec une masse moléculaire apparente de ≈ 75 kDa (Figure 2.33A) se trouve majoritairement dans le culot bactérien, donc sous forme insoluble (corps d'inclusion). La présence de la protéine a été confirmée par une immunodétection avec un anticorps anti-polyhistidine (Figure 2.33B).

Dans le but d'améliorer le rendement de l'expression de la protéine sous forme soluble, j'ai ensuite effectué plusieurs séries d'expériences en variant la durée d'expression (cinétique sur 5 h), la température (30°C et 37°C) et la concentration de l'inducteur IPTG (0,5 mM et 1 mM). Les résultats montrent une expression à partir de 2 h d'incubation quelle que soit la température. Le temps d'expression optimal est atteint entre 4 h et 5 h d'incubation. Pour nos expériences, nous avons retenu la durée de 4 h ; malgré tout, la plus grande fraction de la protéine se retrouve dans le culot après extraction en condition native. Des essais d'extraction en condition dénaturante (urée 8 M) provoquent la dénaturation irreversible de la protéine.

C'est pourquoi nous avons décidé de refaire le clonage dans un vecteur possédant un promoteur faible du type pQE80 ou pBAD dans le but de réduire la fraction de la protéine non-soluble.

2.5.4. Caractérisation spectroscopique

L'analyse de la protéine purifiée par absorption dans l'UV-visible, montre la présence d'une bande d'absorption à 409 nm (Figure 2.34) et un spectre atypique en comparaison avec les deux hémoprotéines précédemment étudiées FixL et Dos.

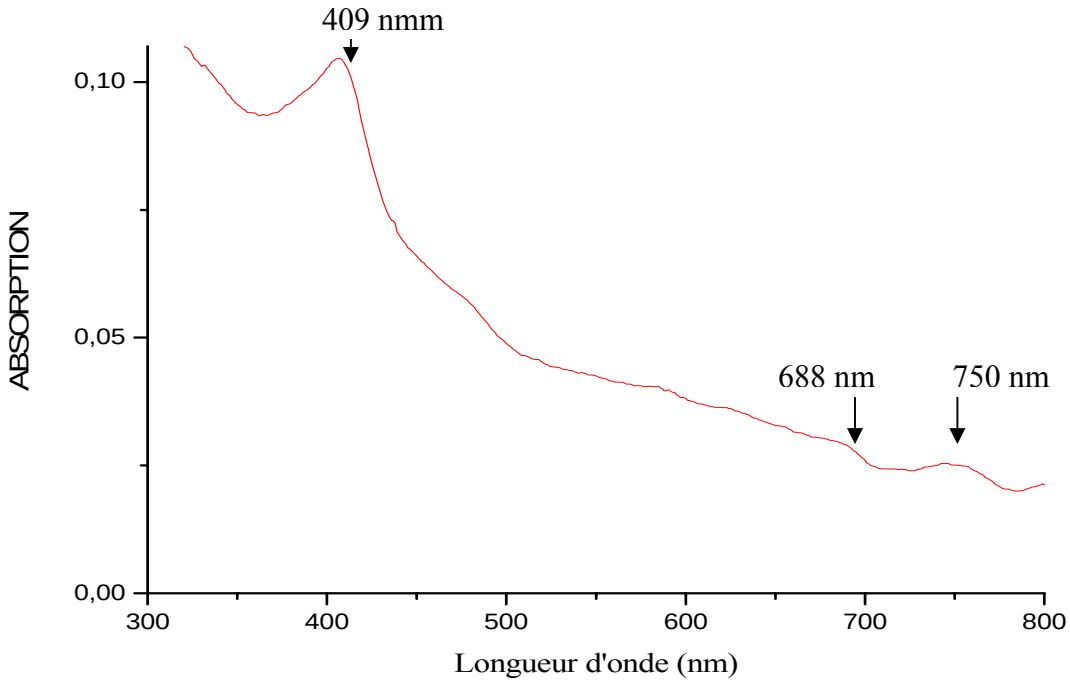


Figure 2.34 : Spectre d'absorption de la protéine recombinante PA5442 après purification. Les maxima d'absorption sont situés à 409 nm et à 688-750 nm. Le coefficient d'extinction à 280 nm dans du tampon phosphate 20 mM pH 7.5 : 10825 $M^{-1}cm^{-1}$ est obtenu par le programme ProtParam après avoir entré la séquence de la protéine PA5442.

Cette valeur est intermédiaire de celles obtenues pour FixLH et DosH (395 nm et 416 nm) et est très proche de celle que l'on obtient avec la protéine FixLH en présence de traces d'imidazole. Ce spectre ne permet pas de savoir avec certitude si la protéine PA5442 possède un hème comme cofacteur et le faible rendement limite à ce jour une caractérisation plus approfondie par spectroscopie.

Les premières analyses spectrales révèlent des caractéristiques plutôt inattendues pour un hémosenseur. Nous avons observé la présence de bandes d'absorption dans la région 650-750 nm, qui varient en fonction de la luminosité ambiante. De plus, la solution de la protéine PA5442 après purification présente une couleur verte et précipite en présence d'une forte lumière ambiante. Ceci pourrait être en accord avec une fonction phytochrome et m'a amenée à produire et purifier la protéine à l'abri de la lumière en chambre noire. La protéine ainsi préparée présente également une absorption dans les longueurs d'onde 600-750 nm.

Comme le montre la figure 2.35, il y a une variation du spectre dans la région 600-750 nm au cours du temps d'illumination. Ces caractéristiques spectrales sont retrouvées dans les

phytochromes, qui présentent des bandes d'absorption autour de 600-750 nm (Wegele *et coll.*, 2004).

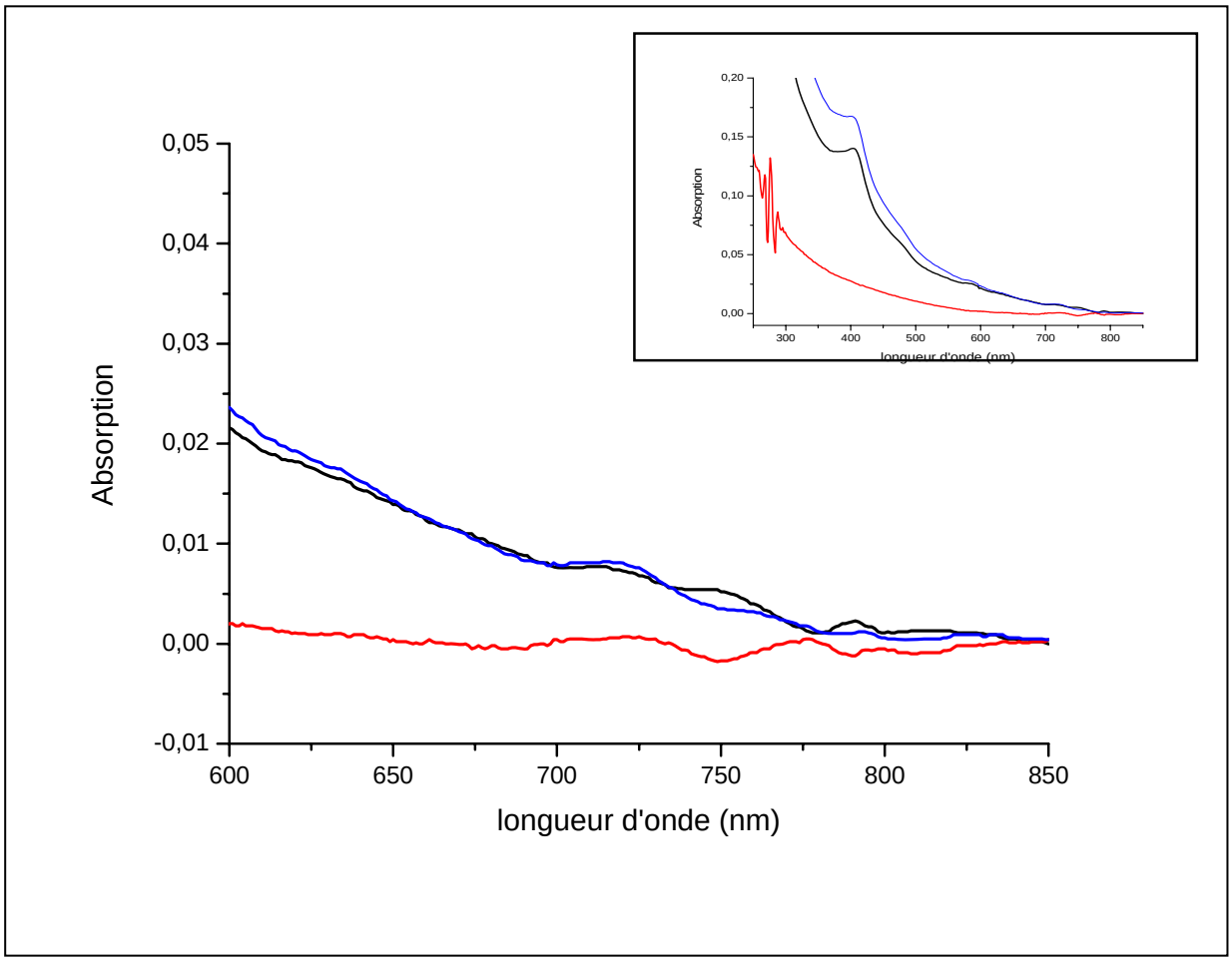


Figure 2 .35: Spectres d'absorption de la protéine recombinante PA5442, dans la région visible après purification à l'obscurité (spectre noir). Après photolyse avec une lampe émettant à 750 nm pendant 20 min (spectre bleu) et le spectre de différence (rouge). En insert sont présentés les mêmes spectres sur une plus grande gamme de longueur d'onde (300 à 850 nm).

Les phytochromes sont des photorécepteurs qui contrôlent de nombreuses phases de développement chez les plantes, dont l'adaptation de leur croissance à la lumière ambiante (Smith *et coll.*, 2000). Ces photorécepteurs sont constitués d'une partie protéique (apoprotéine) à laquelle est associé un groupement prosthétique : le chromophore biliverdine, qui correspond à un composé tétrapyrrolique à chaîne ouverte. Il est présent sous deux formes selon la longueur d'onde : Pr (pour 'red', rouge), la forme inactive dont le maximum d'absorption se situe à 660

nm et la forme Pfr (pour 'far-red', rouge lointain) pour la forme active dont le maximum d'absorption est à 720 nm. Ces deux formes sont photoconvertibles.

Chez les plantes, le passage à la forme Pfr déclenche une cascade d'événements biochimiques qui aboutissent à l'activation de plusieurs familles de gènes de régulation du métabolisme.

Les bactériophytochromes sont vraisemblablement une forme ancestrale des phytochromes des plantes supérieures. Ils présentent une structure en domaines : en N-terminal un domaine photosenseur de fixation du chromophore homologue à celui des plantes, et en C-terminal deux domaines PAS qui sont trouvés dans nombre de protéines régulatrices eucaryotes et procaryotes, et un domaine histidine kinase similaire au sous-domaine liant l'ATP de l'histidine phosphotransférase des systèmes senseurs à deux composants bactériens (Lagarias *et coll*., 2002).

Les similitudes d'organisation entre Dos, FixL (protéines senseurs de gaz) et les phytochromes (protéines photoréceptrices) suggèrent que ces protéines possèdent un mode de fonctionnement homologue, ce qui supposerait que les phytochromes transmettent le signal selon un processus comparable à celui des systèmes à deux composants. Aujourd'hui il y a très peu de bactériophytochromes qui ont été biochimiquement caractérisés, et les observations spectroscopiques permettent la mise en lumière de leurs propriétés en raison de leurs deux formes photoreversibles.

Pour confirmer la nature de PA5442 et éventuellement déterminer si la protéine possède une activité phosphodiésterase (voir 2.4.1.), il faut optimiser l'expression et la purification de la protéine recombinante. Un hème ou un dérivé similaire semble présent, mais il n'est pas évident de savoir s'il s'agit d'un composé intrinsèque de la protéine. Par spectroscopie de fluorescence on peut vérifier la présence d'un chromophore biliverdine, indicatif d'un phytochrome. Ces expériences permettront d'identifier de façon non ambiguë l'activité de la protéine PA5442 et son rôle dans *Pseudomonas aeruginosa.*

III-Conclusions et Perspectives

Des hémoprotéines sont impliquées dans un grand nombre de fonctions biologiques, qui incluent le stockage et le transport d'oxygène, le transfert d'électrons et la catalyse. Durant, les dernières années une nouvelle classe d'hémoprotéines a été découverte fonctionnant comme des protéines senseurs à hème et détectant de petites molécules de gaz comme l'O_2, CO ou NO. Ces protéines de signalisation émettent leur réponse en couplant un hémo-domaine 'senseur' à une région catalytique de transmission et contrôlent des processus adaptatifs à l'environnement, souvent par l'expression de gènes spécifiques. La compréhension du mécanisme de détection directe de ligands par ces protéines senseurs est donc cruciale pour expliquer leur aptitude à accomplir leur fonction.

Les deux hémo-protéines bactériennes FixL et Dos agissent comme des senseurs directs à l'oxygène. La fixation de l'oxygène sur l'hémo-domaine 'senseur' induit un changement structural qui permet l'activation d'un domaine enzymatique : une histidine-kinase pour FixL et une phosphodiestérase pour Dos. En l'absence d'oxygène fixé, l'hémo-domaine permet l'activité enzymatique, alors qu'en présence de celui-ci l'enzyme est inhibée. Le mécanisme de la liaison de l'oxygène à l'hème se traduisant en signal de transduction est l'une des questions principales dans le fonctionnement de ces protéines senseur.

Un objectif de ce travail de thèse était de tenter de répondre à différentes questions concernant le domaine senseur hème : sa spécificité pour le ligand physiologique, le mécanisme initial de détection de l'oxygène en liaison avec la dynamique de la protéine, ainsi que le rôle des acides aminés clé de la poche de l'hème : R220 pour FixL et M95 pour Dos.

Pour cela, je me suis d'abord intéressée à la liaison de l'oxygène sur les hemodomaines de FixLH et DosH. A cet effet, plusieurs approches expérimentales ont été utilisées, associant des techniques de la biologie moléculaire, de la biochimie et de la spectroscopie d'absorption visible à l'équilibre et résolue en temps. Après avoir établi un système de surexpression des hèmodomaines FixLH et DosH et effectué la caractérisation biochimique des protéines recombinantes, la propriété de photodissociabilité de la liaison hème-ligand a été exploitée pour suivre la dynamique des ligands dans la poche de l'hème et plus particulièrement la vitesse de recombinaison de l'O_2 au fer de l'hème.

Les récentes structures tridimensionnelles de FixLH-O_2 (Gong *et coll.,* 2000) et DosH-O_2 (Park *et coll.,* 2004) ont permis d'identifier différents acides aminés clés dans l'environnement de l'hème. Partant de ces différentes structures, des mutants de FixLH et DosH ont été réalisés dans le but d'étudier dans un premier temps le rôle des acides aminés pour l'affinité du ligand oxygène pour ces protéines et dans un second temps sur le mécanisme de transduction du signal.

La coordination de l'hème avec différents ligands et les spectres d'absorption à l'équilibre de FixLH sont similaires à ceux de la myoglobine, cependant les propriétés de liaison de l'oxygène sont très différentes. Après photodissociation de CO et NO, les cinétiques de recombinaison sont qualitativement similaires pour FixLH et Mb. En revanche, en comparaison à la myoglobine, le spectre transitoire de FixLH est très différent dans la région d'absorption de l'hème non-ligandé comparé au spectre de différence à l'équilibre, signe d'un environnement de l'hème différent de la forme deligandée à l'équilibre. Cette différence est d'autant plus importante pour l'oxygène, ligand physiologique. Les contraintes sur l'hème associé à cette perturbation spectrale peuvent expliquer la vitesse remarquable de recombinaison de 5 ps pour 90% d'oxygène dissocié. Avec la protéine DosH, la détection et la transmission du signal sont différentes, en effet, on trouve une recombinaison similairement rapide et un rendement plus grand pour le ligand oxygène (97%) (Liebl *et coll*., 2002).

Ensemble, ces résultats montrent que la poche de l'hème de FixL et Dos agit spécifiquement comme un piège pour le ligand physiologique oxygène, et dans ce sens possède des points communs avec d'autres senseurs à hèmes, notamment CooA pour le CO et la guanylate cyclase pour le NO (Nègrerie *et coll*., 2001; Zhao *et coll*., 1999; Brandish *et coll.,* 1998). La structure du complexe *Bj*FixLH-O_2 (Gong *et coll.,* 2000) indique que la stabilisation du complexe oxy est due largement à la présence d'une arginine dans la poche de l'hème (Arg220). La création d'une liaison hydrogène par cette arginine stabilise la fixation de l'oxygène en le gardant plus proche de l'hème après la dissociation.

Nous avons constaté dans les mutants FixLH-R220 (vers H, I, Q, E et A) d'importantes différences dans la capacité de liaison avec l'O_2. Nos résultats montrent que l'arginine 220 influence fortement le taux de liaison de l'oxygène sur l'hème. Quant au complexe avec O_2, l'arginine est orientée vers l'intérieur de la poche de l'hème et interagit avec l'oxygène via une liaison hydrogène (Gong *et coll.,* 2000). Nos études montrent que c'est l'Arg 220 qui est responsable des contraintes sur l'hème après dissociation de l'O_2 et de la grande vitesse de

recombinaison (Jasaitis *et coll.,* 2006). Des simulations moléculaires indiquent que la première étape de transmission implique un mouvement concerté de l'O_2 et de l'Arg 220.

Dans l'ensemble, les résultats présentés indiquent que par la suite les mouvements de l'arginine dans la poche de l'hème ne sont pas seuls responsables des changements de conformation de la protéine associés à l'inactivation de l'histidine kinase. D'autres résidus impliqués dans la transmission du signal, en particulier l'Arg 206 liée aux propionates de l'hème (Gilles-Gonzalez *et coll*., 2006) et Ile 215, pourraient effectuer des mouvements concertés avec l'Arg 220, et seront explorés en associant la mutagenèse dirigée à des études spectroscopiques et biochimiques. La production de l'holoprotéine FixL nous permettrait d'appuyer ces résultats par la réalisation de dosages enzymatiques.

Pour DosH, l'hème est dans tous les cas six fois coordonné au résidu méthionine 95 (Gonzalez *et coll.,* 2002; Sato *et coll.,* 2002) comme second ligand axial. Cependant celle-ci peut être déplacée par les ligands externes. Nos analyses montrent que le ligand interne Met 95 se recombine de façon biphasique en 7 et 35 ps, temps relativement long en comparaison à l'oxygène (Liebl *et coll.,* 2002). La comparaison avec le mutant M95H (histidine comme sixième ligand de l'hème) suggère que la phase de 35 ps correspond à la recombinaison d'un intermédiaire de signalisation, lié à la flexibilité de la méthionine. L'ensemble du mécanisme moléculaire n'est pas encore élucidé.

Le travail sur l'holoprotéine Dos se poursuit dans le but de comprendre son mécanisme enzymatique d'une part (l'identification du substrat spécifique) et d'autre part pour mieux comprendre son rôle physiologique. Enfin nous continuerons les expériences sur la mise en évidence des partenaires d'interaction possibles et leur rôle éventuel dans le mécanisme moléculaire de Dos.

Les études préliminaires réalisées sur une protéine de fonction inconnue, PA5442 de *Pseudomonas aeruginosa* montrent qu'elle ne possède pas les caractéristiques typiques d'un senseur à oxygène, comme nous pouvions nous y attendre d'après la forte homologie d'organisation en domaines avec Dos et FixL. Cependant, la présence de ces domaines PAS multiples impliquerait un rôle de senseur. Les premiers résultats obtenus tendent vers l'hypothèse d'un phytochrome, c'est-à-dire un senseur de lumière. En effet cette protéine présente une forte sensibilité à la lumière et montre une absorption dans la région 600-750 nm,

propriétés non partagées par les protéines Dos et FixL. Une amélioration de l'expression et du rendement de purification de cette protéine nous permettront de disposer d'une quantité de matériel suffisante pour une meilleure caractérisation, et finalement d'étudier le mécanisme de transmission du signal au sein du domaine PAS.

IV-Matériels et Méthodes

4.1. Matériels

4.1.1. Origine des réactifs

Les réactifs utilisés au cours de ce travail ont été obtenus auprès des fournisseurs indiqués ci-dessous. Les produits chimiques courants ont été commandés chez Sigma Aldrich et VWR.

Fournisseurs	Réactifs
News England Biolabs	Endonucléases de restriction : *Sal*I
Roche	*Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI, *Nco*I,
Fluka	Ammonium sulfate, imidazol, PMSF, glycerol
Accros organics	Nickel
Sigma Aldrich	NaCl, NaOH, DNASe, RNAse, aprotinine, pepstatine, leupeptine, Lysozyme, ampicilline, kanamycine, IPTG, antipolyhistidine de souris couplé à la peroxydase, hydrosulfite de sodium, iodoacetamide, Triton X-100, sodium azide, Bleu de Coomassie R (Brillant Blue R), Hepes, serum albumine bovine, histidine, bleu de bromophenol, xylène cyanol, beta-mercapto-éthanol, Tween 20, pronase E; thiamine-HCl, biotine, Na-pantothenat.
Invitrogen	pCRT7-TOPO TA expression kits, résine Probond Ni dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ladder 1Kb ADN, anticorps anti-anticorps de lapin couplé à la peroxydase
Stratagene	Polymerase P*fu Turbo*, BL21DE3, XL1-Blue, *Quik-change site-directed mutagenesis kit,*
Life Technology	HB101, DH5α, Taq polymérase
Qiagen	*Qiaprep spin Miniprep kit, Qiaquick PCR purification* kit
Appligen	BET, TEMED,
Bio-Rad	Precision Plus Protein standard Dual Color, Acrylamide-bis 37,5:1, SDS 10%, Trans-Blot SD Transfert Cell, *Opti-4CN Ki*t, lait écrémé
Millipore	Filtre Biomax 5, 10, 30 MWCO, membrane Immobilon
Difco	Produits culture bactérienne : Tryptone, extrait de levure
Genome express	Séquençage (2004-2006)
MWG Biotech AG	Séquençage (2003-2004)
Sigma-Genosys	Synthèse oligonucléotides (2001-2004)
Eurogentec	Synthèse oligonucléotides (2004-2006)
Laboratoire Charles River	Synthèse Anticorps anti-DosHwt d'*E.coli* chez le lapin NZW KBL
LGC	ADN génomique de *Pseudomonas aeruginosa* (souche PAO1 ATCC 17933)

4.1.2. Souches de bactéries utilisées

- *Bradyrhizobium japonicum* : la souche de type sauvage de la collection de DSMZ (DSM n°30131 ATCC 10324). Les bactéries ont été cultivées à 30°C / 160 rpm dans le milieu PSY (Regensburger & Hennecke, 1983).
- Souches *d'Escherichia coli* : HB101 [F^- Δ (*gpt-pro*A) 62 *leu*B6 *sup*E44 *ara*-14 *gal*K2 *lac*Y1 Δ (*mcr*C-*mrr*) *rps*L20 (Str^r) xyl-5 mtl-1 *rec*A13] (Hanahan D. (1983). *J.Mol. Biol*. 166 : 557-580). Croissance à 37°C / 250 rpm dans du milieu LB (Luria Burtani : tryptone 10%, extrait de levure 5%, NaCl 10%, pH7.0) (Miller J.H (1972) Experiments in bacterial genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, NY. Nous avons appliqué ces conditions à toutes nos cultures.

TOP1O : F *mrc*AΔ (*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ8O lac ZΔM15 lacX74 *deo*R *rec* A1 araD139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L *end*A1 *nup*G . Cette souche a été utilisée dans les étapes de clonage des produits PCR dans les plasmides pBAD-TOPO, pCRT7-NT-TOPO (Invitrogen) et pET28a (Novagen).

XL1-Blue : F' Tn1O pro+B $laci^S$ Δ (lacZ) M15/recA1 endA1 gyrAA96 (NaI^r) thi hsdR17 (r_k-m_k) supE44 relA1la (Charrier *et coll*, 1997). Cette souche a servie à la transformation et amplification des produits de mutagénèse dirigée (Stratagene).

BL21 (DE3): F^- *omp*T *hsd*SB (r_B-m_B)) *gal dcm* (λ*clts*857 *nin*5, *ind*1, *Sam lac* UV5-T7gene1). Cette souche dérivée d'*Escherichia coli* , et lysogène pour le phage λ, possède le gène codant pour l'ARN- polymérase du bactériophage T7, sous contrôle du promoteur de l'opéron lactose (Studier *et coll.*, 1990).

4.1.3. Milieux de culture

Le milieu PSY est composé de : KH_2PO_4, Na_2HPO_4, $CaCl_2$, $MgSO_4$, peptone, extrait de levure, H_3BO_3, $ZnSO_4$, $CuSO_4$, Na_2MoO_4, $MnCl_2$, $FeCl_3$; Thiamin-HCl, biotine, Na-Pantothenat (Regensburger & Hennecke, 1983) a été utilisé pour la mise en culture de la souche *Bradyrhizobium japonicum*.

Les cultures sont cultivées à 37°C / 250 rpm dans du milieu LB (Luria Burtani : tryptone 10%, extrait de levure 5%, NaCl 10%, pH7.0) (Miller J.H, 1972). Les milieux sont stérilisés par

autoclave 30 min à 120°C sous une pression de 1 atm pour les milieux liquides ou 0,5 atm pour les milieux solides.

Après refroidissement les suppléments nécessaires (antibiotiques) sont ajoutés stérilement après filtration sur membrane 0,22 µm

composition	Milieu LB liquide /litre	Milieu LB solide / litre
Bacto-tryptone	10g	10g
Extrait de levure	5g	5g
NaCl	10g	10g
Bacto-agar		15g
Eau distillée	Qsp1 L	

Antibiotiques et réactifs pour culture.

Toutes ces solutions sont stérilisées par filtration sur membrane 0,22µm aliquotées et stockées à -20°C et à l'abri de la lumière.

Solution	Concentration de stockage
ampicilline	100 mg/ml dans H_2O
kanamycine	50 mg/ml dans H_2O
IPTG	1Mol/l dans H_2O

4.1.4. Les plasmides utilisés

Deux types de vecteur ont été utilisés dans ce travail :

a) Le vecteur pBAD-TOPO (Invitrogen) qui possède le promoteur P_{BAD} inductible par l'arabinose ainsi que deux séquences permettant une identification facile du produit cloné après expression et purification : une séquence épitope V5 permettant une mise en évidence par immunoblot et une séquence 6xHis-tag utilisée pour la purification par affinité.

b) Les vecteurs pET28-a (Novagen) et pCRT7-NT TOPO (Invitrogen), qui possèdent une séquence promotrice reconnue par l'ARN-polymérase du bactériophage λ, une séquence codant pour une séquence polyhistidine (His-Tag), un site de clonage multiple et un terminateur également reconnu par l'ARN-polymérase.

Ces vecteurs portent également le gène codant la protéine LacI, le gène régulateur de l'opéron lactose, et le gène codant la β-lactamase, qui confère aux bactéries transformée une résistance à l'ampicilline.

Ils sont utilisables dans la souche BL21DE3 et l'expression est induite par ajout d'IPTG (isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside).

Le vecteur pCRT7-TOPO/NT est maintenu linéaire grâce à des topoisomérases I du Vaccinia virus qui se lient par une liaison covalente aux thymidines de chaque extrémité du vecteur (figure 4.1).

De plus, la Taq polymérase utilisée en fin de PCR possède une activité terminale transférase matrice indépendante qui ajoute une adénosine à l'extrémité 3' des produits amplifiés. Ces adénines peuvent reconnaître les thymidines du vecteur et s'y fixer ; car l'hydroxyle du 3' peut attaquer la liaison phospho-tyrosyl établie entre le vecteur et la topoisomérase.

Ceci permet l'insertion du produit PCR dans le site de clonage (figure 4.1)

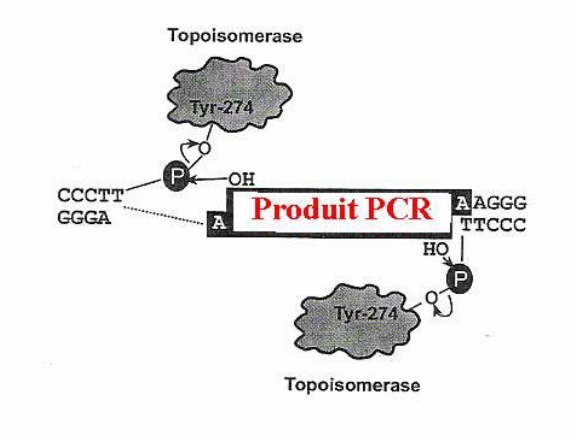


Figure 4.1 : Représentation du mécanisme de ligature du produit de PCR dans le vecteur pCRT7/NT® TOPO.

Les constructions plasmidiques réalisées et utilisées, ainsi que les oligonucléotides sont répertoriés dans les tableaux 4.1 et 4.2

Tableau 4.1 : Vecteurs et constructions utilisés.

Nom	**Résistance**	**Séquences spécifiques**	**Taille en pb**	**Fournisseur**
pBAD-TOPO	ampicilline	His-tag et épitopeV5	4100	Invitrogen©
pCRT7-TOPO/NT	ampicilline	His-tag en N-terminal	2870	Invitrogen©
pET28a+	kanamycine	His-tag en C-terminal	5369	Novagen©
Nom	**Séquence spécifique de**		**Région sur le gène complet**	
pET-FixLHwt	Hémodomaine sauvage de *Bj*FixL		Codons 142 à 270	
pET-FixLHR220A	Hémodomaine muté arginine 220		Codons 142 à 270	
pET-FixLH R220E	Hémodomaine muté arginine 220		Codons 142 à 270	
pET-FixLH R220H	Hémodomaine muté arginine 220		Codons 142 à270	
pET-FixLH R220I	Hémodomaine muté arginine 220		Codons 142 à 270	
pET-FixLH R220Q	Hémodomaine muté arginine 220		Codons 142 à 270	
pCRT7-DosHwt	Hémodomaine sauvage de *Ec*Dos		Codons 1 à 152	
pCRT7-DosHM95A	Hémodomaine muté méthionine95		Codons 1 à 152	
pCRT7-DosHM95H	Hémodomaine muté méthionine95		Codons 1 à 152	
pCRT7-DosHM95I	Hémodomaine muté méthionine95		Codons 1 à 152	
pCRT7-Doswt	Protéine entière *Ec*Dos		Codons 1 à 799	
pCRT7-PA5442	Protéine tronquée PA5442		Codons 280 à 952	

Tableau 4.2: Oligonucléotides utilises

NOM	**Séquence**
1-FixLHwt	Fw :5’- gcc atg gag ac cac ctc cgc tcg-3’
	Rv : 5’- ttg cag ttc ctg gag acg cgc ctg-3’
2-R220A	Fw : 5’- c atc atc ggc atc ggc gcc atc gtg acc ggc-3’
	Rv : 5’- g ctt gcc ggt cac gat cgg gcc gat gcc gat-3’
3-R220E	Fw. 5’- cat cat cgg cat cgg cga gat cgt gac cgg c-3’
	Rv. 5’- gct tgc cgg tca cga tct cgc cga tgc cga t-3’
4-R220H	Fw. 5’- cat cat cgg cat cgg cca cat cgt gac cgg c-3’
	Rv. 5’- gct tgc cgg tca cga tgt ggc cga tgc cga t-3’
5-R220I	Fw. 5’- cat cat cgg cat cgg cat cat cgt gac cgg c-3’
	Rv. 5’- cgt tgc cgg tca cga tga tgc cga tgc cga t-3’
6-R220Q	Fw. 5’- cat cat cgg cat cgg cca gat cgt gac cgg c-3’
	Rv. 5’- gct tgc cgg tca cga tct ggc cga tgc cga t-3’
9-DosHwt	Fw: 5’- atg aag cta acc gat gcg gat-3’
	Rv: 5’- aac ggc aat aat caa ttg tcg g-3’
10- M95A	Fw : 5’- gcg cgt gtt gag ggg gcg agtc ggg agc tca g-3’
	Rv: 5’- ctgcagctcccgactcgccccctcaacacgcgc-3’
11-M95H	Fw: 5’- gcg cgt gtt gag ggg cac agtcgggag ctg cag-3’
	Rv: 5’- ctgcagctcccgactgtgccccctcaacacgcgc-3’

12-M95I	Fw : 5'- gcg cgt gtt gag gga tta gtc ggg agc tgc agc tg-3'
	Rv: 5'- cag ctg cag ctc ccg act aat ccc ctc aac acg cgc-3'
13-Doswt	Fw: 5'- atg aag cta acc gat gcg gat-3'
	Rv: 5'- tca gat ttt cag cgg taa cac -3'
14-PA5442	Fw: 5'- atg gcc ctg gac gcc agc gaa-3'
	Rv: 5'- tca acg agc ctg gcg caa acc-3'

4.2. Methodes

4.2.1. Manipulation de l'ADN

4.2.1.1. Extraction de l'ADN génomique

A partir de 50 ml de culture de DO_{600}=1 (souche ATCC 10324 de *Bradyrhizobium japonicum*) cultivée dans du milieu PSY à 30°C /160 rpm (Regensburger & Hennecke, 1983) et la souche HB101 de *Escherichia coli* cultivée dans du LB à 37°C/ 250 rpm (Miller JH, 1972).

- centrifugation des cellules
- reprendre le culot dans Tris-HCl 50 mM pH 8.0,
- traiter par le lysozyme, la pronase E, du SDS,
- incuber à 60°C / 5 min,
- agiter 30 min à 37°C,
- précipiter l'ADN avec 1/10 NaCl 5 M et 2 volumes éthanol 100% froid,
- reprendre le culot dans 0.1X SSC pH7.5
- agiter à 4°C une nuit,
- dialyse contre Tris-HCl 10 mM et EDTA 1 mM pH8.0,
- traiter par RNAse 30 min à 37°C,
- extraire 3 fois par phénol–alcool isoamyl-chloroforme,
- précipiter par éthanol 100% froid,
- reprendre le culot dans du TE.
- Laver avec éthanol 70% froid
- Reprendre dans eau distillée stérile.
- Stocker par petits aliquots de 10 µl à (–20 °C) jusqu'à usage.

a) Amplification et clonage du gène BjFixLH

A partir de la séquence nucléotidique de *Bradyrhizobium japonicum* (Anthamatten *et coll*., 1990) deux amorces ont été déterminées pour amplifier par PCR l'hémodomaine, fragment du gène *fixL* correspondant aux codons 142 à 270 : La matrice est de l'ADN génomique de la souche *Bradyrhizobium japonicum* (ATCC 10324)

(Sens) 5'-GCC ATG GAG ACC ACC TCC GCT CG-3' et

(Anti-sens) 5'- TTG CAG TTC CTG GAG ACG CGC CTG -3'

Le gène est ensuite cloné après digestion enzymatique dans pET28a

b) Amplification et clonage du gène EcDosH

A partir de la séquence nucléotidique rapportée par Blattner *et coll*., 1997, deux amorces ont été déterminées pour amplifier l'hémodomaine, région du gène correspondant codons 1-152 du gène *yddU* d'*Escherichia coli* (renommé *dos).* La matrice pour la PCR est de l'ADN génomique de la souche *E.coli* HB101.

(Sens) 5'-ATG AAG CTA ACC GAT GCG GAT-3' et

(Anti-sens) 5'-AAC GGC AAT AAT CAA TTG TCG G-3'

Le gène est ensuite cloné dans pCRT7/NT.

c) Amplification et clonage du gène PA5442 de Pseudomonas aeruginosa

A partir de la séquence de l'ORF *PA5442 de Pseudomonas aeruginosa* (Stover *et coll*., 2000) deux amorces ont été déterminées pour amplifier le fragment de la région correspondant aux codons 280-952 du gène *PA5442 de Pseudomonas aeruginosa (*séquence issue de *www.ncbi.nlm.nih.gov/*). La matrice pour la PCR est de l'ADN génomique de la souche PAO1 (ATCC 17933).

(Sens) 5'-ATG GCC CTG GAC GCC AGC GAA-3'et

(Anti-sens) 5'- TCA ACG AGC CTG GCG CAA ACC-3'

Le gène est ensuite cloné dans le vecteur pCRT7/NT.

4.2.1.2. Conditions d'amplification des gènes par PCR

Principe

La PCR (Polymerase Chain Reaction) sert à l'amplification d'un fragment d'ADN *in vitro* prédéfini par des amorces spécifiques.

Elle est basée sur une répétition de trois phases, comme définies ci-dessous.

-Phase de dénaturation : à 94°C. Les doubles brins d'ADN se séparent.

-Phase d'hybridation : à 58°C. Hybridation des amorces sur leur séquence complémentaire sur les brins d'ADN cible.

-Phase d'élongation : à 72°C. Ajout de nucléotides aux amorces hybridées à l'ADN dans le sens 5' vers 3' par l'ADN polymérase de façon complémentaire.

Tableau 4.3: Conditions de PCR

Composants	Volume (en µl)	Concentration finale
Tampon 10X : 100 mM Tris-HCl pH8.3, 500 mMKCl, 25 mM MgCl2,	5	1X
Mélange dNTP (10mM)	5	1 mM
Amorce sens (1µg/µl)	1	200 pmoles
Amorce anti-sens (1µg/µl)	1	200 pmoles
ADN matrice (100ng/µl)	1	100 ng
P*fu* Turbo polymérase (10U/µl)	1	1 unité
H_20 stérile	36	
Volume réactionnel final = 50 µl		

Tableau 4.4: Programme d'amplification

Programme d'amplification des gènes *BjFixLH, EcDosH,* et *Doswt* et *PA5442*					
Nombre de cycles	phase	température		durée	
1cycle	Dénaturation	94°C	93,5°C	45 secondes	45 secondes
30cycles	Dénaturation*	94°C	94°C	40 secondes	40 secondes
	Hybridation**	58°C	58°C	45 secondes	45 secondes
	Elongation ***	72°C	72°C	90 secondes	4 minutes
1cycle	Elongation finale	72°C	72°C	10 minutes	10 minutes

-NB PCR : utilisée

*cette température est directement liée à la qualité de la polymérase

** cette température est calculée en fonction du Tm de l'amorce (température hybridation =Tm – 5°C)

***cette température est généralement comprise entre 70 et 72 °C où l'activité de la polymérase est optimale. Il faut compter 1 minute pour l'amplification d'une séquence de 2 kilobases.

4.2.1.3. Clonage des gènes amplifiés

Stratégie de clonage

Au cours de mon travail j'ai utilisé deux méthodes de clonage :

a) La première est basée sur le système TOPO (voir 4.1).

Les produits de PCR amplifiés sont incubés 10 min à 72°C en présence de la Taq polymérase qui rajoute une queue polyA à chaque extrémité du produit de PCR permettant son clonage:

Tableau 4.5.Réaction de clonage avec le système TOPO

Composants	**Volume**
Produit PCR	2 à 4µl
Tampon salin	1µl
Vecteur	1µl
H_2O	Qsp 6 µl

b) La seconde est basée sur une digestion par des enzymes de restriction :

Le vecteur de clonage et le produit PCR sont digérés par les mêmes enzymes *Nco*I (Roche) et *Sal*I (New England Biolabs). Les produits digérés sont ensuite analysés sur gel agarose 1,2%, puis purifiés (Qiaquik PCR purification Kit de Qiagen).

L'insertion du fragment de PCR digéré se fait selon le protocole suivant :

Tableau 4.6. *Réaction de ligature de l'ADN*

Composants	**Quantité ou volume**
Vecteur linéarisé	25 ng à 250 ng
Fragment de PCR	200 ng à 750 ng
Tampon de ligation 10x	1µl
T4 DNA ligase	1 unité
H_2O qsp	10µl

La réaction est incubée 12 h à 16°C. La stoechiométrie relative insert/vecteur linéarisé est déterminante ainsi que le pureté et la qualité des produits utilisés. Plusieurs rapports stoechiométriques insert/vecteur ont été testés. L'absence de phosphatases et d'enzymes de restriction est nécessaire à la réussite de la ligature.

4.2.1.4. Analyse des produits amplifiés

Principe

Les électrophorèses en gel d'agarose permettent une analyse à la fois qualitative et quantitative de l'ADN après amplification et digestion enzymatique. Le pourcentage du gel est préparé en fonction de la taille de l'ADN à analyser.

Le principe de cette méthode est basé sur le fait que les molécules d'ADN se comportent comme des poly-acides dont la charge est négative à pH 8.O, migrant alors dans un champ électrique vers la cathode (pôle positif).

Le gel d'agarose à 1,2% se prépare dans un tampon TAE1X (Tris acétate, EDTA pH8.0), à ce mélange est ajouté du bromure d'éthidium (BET) à une concentration finale de 0,5 µg/ml. Le bromure d'éthidium est un agent intercalant des acides nucléiques, qui fluoresce quand il est excité par des rayons UV. Permettant ainsi de détecter la présence d'ADN. Pour déterminer la taille et la quantité de l'ADN, nous faisant migrer un marqueur étalon.

4.2.1.5. La transformation des produits clonés

Elle a été effectuée par deux méthodes : chimique (CaCl2/choc thermique) ou par électroporation, basée sur l'utilisation de bactéries compétentes ou électrocompétentes TOP10 (Invitrogen).

Préparation des bactéries chimio-compétentes

Nous avons utilisé deux techniques de transformation d'*E.coli*, la transformation chimique (Sambrook *et coll.*, 1989).

Une colonie isolée de la souche *E.coli* désirée est diluée dans 1,5 ml de milieu LB. La culture est incubée une nuit à 37°C/250 rpm.

Le lendemain, 25 ml de milieu LB sont inoculés avec 250µl de la préculture et incubé à 37°C/250 rpm jusqu'à obtention d'une densité optique à 600 nm de 0,4-0,8 (phase exponentielle).

Les cellules sont alors centrifugées à 2000 g /4°C /15 min; puis resuspendues dans 25 ml d'une solution de $CaCl_2$ 0,1M stérile et préalablement refroidie.

Toutes les étapes de préparation se font dans la glace. Les cellules sont de nouveau centrifugées dans les mêmes conditions que précédemment et resuspendues dans 2,5 ml de $CaCl_2$ 0,1M.

Les cellules sont alors prêtes à être transformées. Pour cela, les cellules sont aliquotées par 100 µl dans des microtubes (1,5ml) préalablement refroidis dans la glace.

Protocole

- Dans la glace ajouter l'ADN (20 à 100ng) à 50µl d'une suspension de bactéries *E coli* chimio-compétentes et laisser incuber 30 min.
- Agiter légèrement et transférer les tubes de réactions dans un bain-marie à 42°C pendant 35 secondes ('heat choc').
- Laisser les tubes 2 minutes dans la glace puis à température ambiante.
- Ajouter stérilement 0,25 mL de milieu liquide Luria Burtani (LB) préchauffé à 37°C puis transférer les tubes à 37°C durant 60 minutes sous agitation 250 rpm.
- Ensemencer 100 µL de la suspension de bactéries sur boîte LB-agar + antibiotique de sélection.

Transformation par électroporation

Les cellules TOP10 électrocompétentes sont décongelées sur glace puis 50 ng de vecteur est mélangé aux cellules et le tout est conservé sur la glace pendant 1 minute. Réglage des paramètres de l'électroporateur (Système Gene Pulser II, Biorad) est réalisée selon le mode préconisé par fournisseur (25 µF (Capacitance), 200 Ω (Résistance), 2.5 kV (Voltage)).

Le mélange bactéries/ADN est placé au fond de la cuve d'électroporation (0.2 cm) de manière à ce que le mélange soit bien réparti d'un bord à l'autre pour assurer la diffusion du courant électrique. Lorsque le courant traverse les cellules, il y a formation de pores dans la membrane cellulaire et l'ADN peut alors pénétrer dans la cellule.

Le voltage est appliqué (constante de temps : 4.5-5 msec) puis 1 ml de milieu LB à température ambiante est ajouté immédiatement.

Le tout est transféré dans un microtube conique 1,5 ml et incubé 1 heure à 37°C sous agitation 250 rpm. 100 µl de cette culture sont ensemencés sur un milieu LB-agar avec ampicilline (100 µg/ml) ou kanamycine (50 µg/ml) et cultivé pendant la nuit à 37°C à 250 rpm.

4.2.1.6. Extraction et purification de l'ADN plasmidique

L'amplification de l'ADN plasmidique a été faite à partir de 10 ml de culture et L'extraction par lyse alcaline selon le protocole *QIAprep Spin Kit* de Qiagen (d'après Birnboim & Doly, 1979).

4.2.1.7. Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction

La digestion enzymatique est effectuée dans un volume total de 10 µl et à raison de 1unité enzymatique pour 1 µg d'ADN plasmidique (selon les conditions préconisées pour l'enzyme par le fournisseur)

- Dans un tube ajouter dans l'ordre suivant :

- 1 µl de tampon 10X
- 4 µl de plasmide (1 µg)
- 1 µl d'enzyme (10 U/µl)
- 3 µl H_2O (qsp 10 µl final)
- Laisser incuber une heure à 37°C.

Puis arrêter la réaction par ajout de 3 µl de tampon de charge pour l'analyse sur gel d'agarose 1,2%.

Composition du tampon de charge

- 0,1 % de bleu de bromophènole (indicateur de migration de l'ADN)
- 20 % de glycérol, dilué dans tampon Tris EDTA.

La digestion enzymatique est effectuée dans un volume total de 10 µl et à raison de 1unité enzymatique pour 1 µg d'ADN plasmidique (selon les conditions préconisées pour l'enzyme par le fournisseur)

Dans un tube ajouter dans l'ordre suivant :

- 1 µl de tampon 10X
- 4 µl de plasmide (1µg)
- 1 µl d'enzyme (10U/µl)
- 3 µl H_2O (qsp 10µl final)

Laisser incuber une heure à 37°C. Puis arrêter la réaction par ajout de 3µl de tampon de charge pour l'analyse sur gel d'agarose 1,2%.

Composition du tampon de charge

0,1 % de bleu de bromophenol (indicateur de migration de l'ADN, permettant d'estimer la vitesse apparente de migration), 20 % de glycérole.

4.2.1.8. Vérification des constructions plasmidiques

Quelques clones issus de la transformation sont prélevés à l'aide d'une anse stérile et incubés dans du milieu LB contenant l'antibiotique approprié pendant une nuit à 37°C/250 rpm. L'ADN plasmidique est ensuite purifié (protocole Miniprep, Qiagen).

La présence de l'insert de bonne taille a été contrôlée soit par : digestion des enzymes de restriction utilisées pour le clonage soit par PCR directement sur colonie en utilisant les deux amorces qui ont servies à l'amplification de l'insert, puis analyse sur gel d'agarose 1,2%.

4.2.1.9. Mutagenèse dirigée

Principe

La mutagenèse dirigée a pour objet de muter une séquence d'ADN à un endroit précis soit pour introduire un site de restriction soit pour modifier un codon.

J'ai utilisé le *Quikchange Site-Directed Mutagenesis (*Stratagene) pour réaliser des mutants dirigés, le principe est présenté dans la figure 4.2.

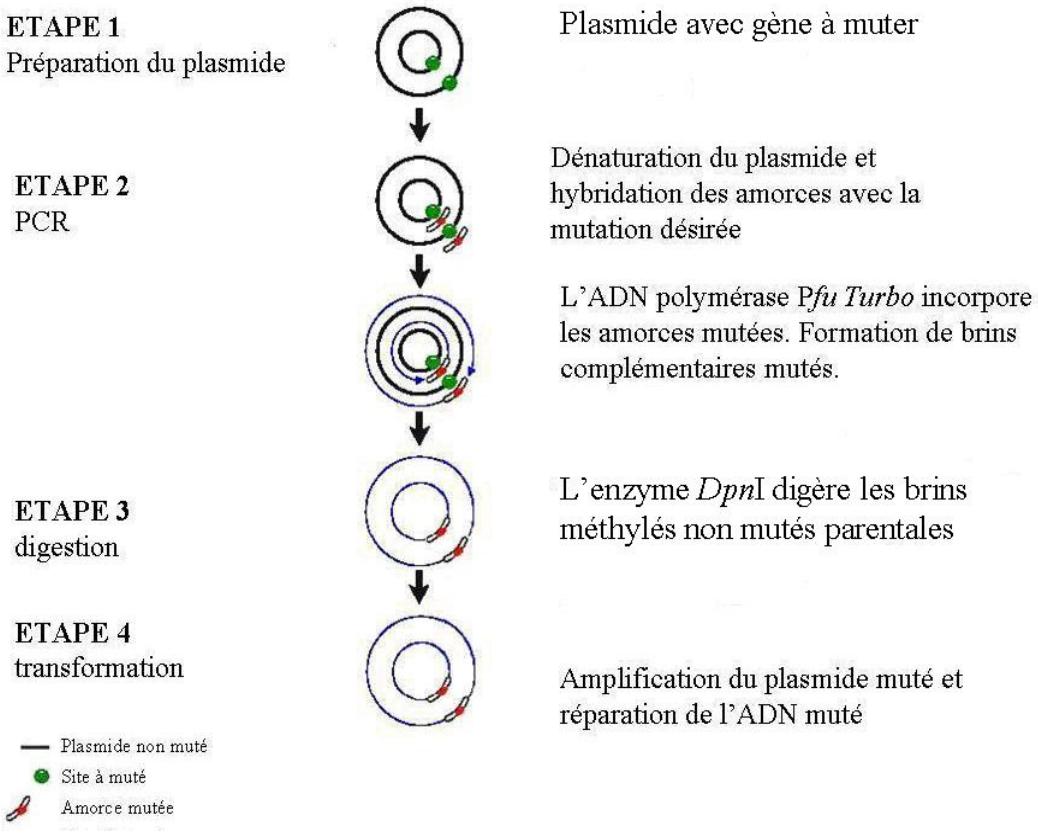


Figure 4.2: Schéma récapitulatif de l'insertion d'une mutation dirigée dans un plasmide par le système QuikChange (Stratagene).

La réaction se fait à partir de 50 ng d'ADN plasmidique circulaire, dans 50 µl de mélange réactionnel contenant 10 mM KCl, 10 mM de $(NH_4)2SO_4$, 20m MTris-HCl, pH 8.8, 2 mM de $MgSO_4$, 0,1% de Triton X-100 (volume/volume), 0,1% de BSA, 200 µM de chaque dNTPs 1 µl de l'ADN polymérase *Pfu Turbo*.

Les réactions de PCR ont été réalisées selon un programme de 18 cycles suivants : dénaturation à 95°C pendant 30 secondes (1 cycle), dénaturation 95°C pendant 30 secondes (18 cycles), hybridation à 55°C pendant 30 secondes, élongation à 68°C pendant 10 min.

Afin de vérifier l'efficacité de l'amplification à l'étape de PCR, nous contrôlons la zone amplifiée par séquençage des deux brins afin de s'assurer que la polymérase n'a pas introduit de mutation. Une fois la séquence vérifiée, nous avons procédé à l'expression des protéines.

4.2.2. Manipulation sur la protéine

4.2.2.1. Système d'expression dans *Escherichia coli*

Les régions des gènes correspondant à l'hémodomaine de la protéine FixL et des mutants R220, le gène de l'hémodomaine, des mutants M95 et le gène de la protéine entière Dos, et le gène *PA5442* à exprimer sont insérés dans les vecteurs pET28a+ ou pCRT7 décrits précédemment et transformés dans la souche bactérienne BL21DE3.

Le répresseur *lac* réprime l'expression de l'ARN T7 polymérase, et l'expression de la protéine d'intérêt est induite par ajout d'IPTG (isopropyl β-D thiogalactoside)**.**

Ainsi, quand ces souches sont transformées par un vecteur d'expression (comme les plasmides de la famille pET ou pCRT7) qui contient un promoteur fort (celui du bactériophage T7), la synthèse d'ARNm est accrue et la synthèse de la protéine d'intérêt peut atteindre une proportion de 40% à 50% des protéines totales.

Cependant, dans le cas de promoteurs forts, il y a une expression de base en absence d'inducteur. Cette « fuite » peut avoir 2 conséquences :

- une instabilité du vecteur et son éventuelle expulsion de la cellule hôte,
- une teneur élevée en ARNm qui peut détruire les ribosomes et donc tuer la cellule hôte, avant l'induction de l'expression de la protéine recombinante.

Une autre caractéristique importante de cette souche (et de toute souche dérivée de BL21) est qu'elle ne possède pas les gènes *omp*T et *lon* qui codent pour des protéases qui dégraderaient la protéine sur-exprimée.

4.2.2.2. Expression des protéines et extraction

Une colonie isolée est utilisée pour inoculer une pré-culture dans 10 mL LB contenant de l'ampicilline (100 µg/mL) ou de la kanamycine (50 µg/mL) en concentration finale. Après incubation à 37 °C pendant la nuit sous agitation 250 rpm.

La pré-culture est utilisée pour inoculer 500 à 1000 ml de milieu LB (dilution au 1/100) et la croissance s'effectue jusqu'à la phase de croissance exponentielle DO_{600} entre 0.5 et 0.7. Pour analyse (contrôle non induit), 1 mL de la pré-culture sont prélevés. Cet aliquot est centrifugé à 12000 rpm pendant 5 minutes, le culot est repris dans 50 µL de tampon Laemmli 3X et chauffé à 100°C pendant 5 minutes. L'échantillon est conservé à -20°C jusqu'à son analyse par SDS-PAGE.

La production de la protéine recombinante est induite en ajoutant à la culture de l'IPTG à une concentration finale de 1 mM. A titre de contrôle, 1 ml est prélevé toutes les 60 minutes afin de mesurer la cinétique d'expression.

Après 4 heures d'induction, les cellules sont récupérées par centrifugation à 10000 rpm pendant 20 minutes à 4°C.

Solubilisation des protéines

Le culot est repris dans un volume de 10 mL de tampon de lyse non dénaturant (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl pH8.0) ensuite traité par du lysosyme à une concentration finale de 1mg/ml pendant 30 min dans la glace suivi de 3 min de sonification (10 x 30 sec avec des intervalles de refroidissement de 10 sec) pour compléter la lyse.

Le lysat est ensuite centrifugé à 30000 rpm pendant 30 minutes à 4°C afin de récupérer la fraction soluble contenant notre protéine.

4.2.2.3. Purification des protéines

La purification s'effectue sur une colonne de résine Ni-Probond agarose (Invitrogen),à l'aide d'un système FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Akta Purifier, Amersham Biosciences).

Après fixation, la colonne est lavée avec 50ml de tampon (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl pH8.0) suivit de l'élution avec 25 ml du tampon (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM Na Cl, 250 mM Imidazol pH 8.0).

L'imidazole entre en compétition avec la séquence His-Tag (6xHistidine) pour la liaison aux atomes de nickel et les protéines recombinantes sont éluées.

Les différentes fractions de la purification (protéines non fixées : filtrat, lavages, éluat) récupérées sont analysées par SDS-PAGE, afin de vérifier la qualité de la purification

4.2.2.4. Détermination de la concentration protéique

a) Par spectroscopie d'absorption

Une détermination de la concentration protéique rapide consiste à mesurer l'absorbance à 280 nm et à calculer la concentration suivant la loi de Beer Lambert :

$$\mathbf{A=c\ d.\varepsilon}$$

(**A** : absorbance sans unité, **d**: trajet optique de la cuve en cm, **ε** : coefficient d'absorption molaire de la protéine en $l.mol^{-1}.cm^{-1}$).

b) Par colorimétrie ou méthode BCA

Principe

La méthode par colorimétrie consiste à fixer un colorant (petite molécule) sur les protéines, qui changent de couleur une fois fixée sur certains acides aminés.

La méthode BCA de Pierce (introduite par Paul Smith *et coll.*, 1958) combine la réduction du Cu^{2+} en Cu^{1+} par les protéines dans un milieu alcalin, et une détection par colorimétrie sélective du cation Cu^{1+} par l'acide bicinchoninique (Figure 4.3). On compare alors l'échantillon protéique à mesurer à une gamme de dilutions d'une solution étalon de la BSA

(sérum albumine bovine à 1mg/ml) à l'absorbance de chacune de ces solutions étalons puis on trace la courbe d'étalonnage. L'absorbance de la solution à doser est mesurée dans les mêmes conditions, puis reportée sur la courbe d'étalonnage; on fait ainsi une détermination graphique de la concentration en protéines de la solution à doser.

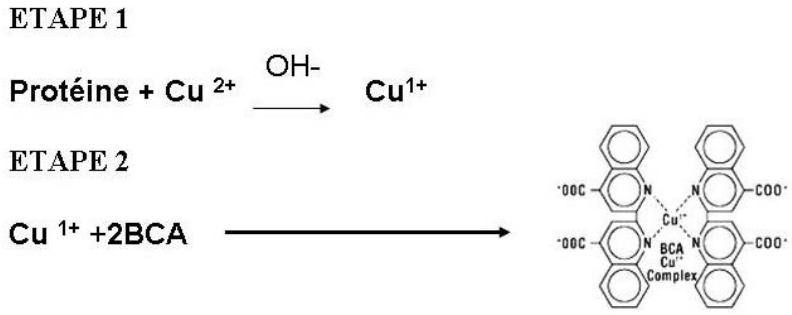


Figure 4.3 : Schéma réactionnel de l'acide bicinchoninique avec la protéine à doser.

Protocole

Dans un puits d'une plaque de microtitration sont déposés respectivement, en duplicat :

- 0, 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8 ; 12 ; 16 ; 20 ; 30 µl de BSA à 1mg/ml.
- 1 ; 4 ; 10 µl de l'échantillon dilué 5 fois
- 1 ; 4 ; 10 µl de l'échantillon dilué 10 fois

Puis ajouter :

- + (30-x) µl d'H_2O, x étant le volume de BSA ou de l'échantillon
- +10 µl de 0,3 M NaOH puis incuber 15 min à la température ambiante.

On ajoute dans chaque puits :

- 200 µl du réactif BCA (50 volumes de la solution A et 1volume de la solution B)
- incubé 30 min à 37°C.

L'absorption est mesurée à 570 nm dans un lecteur de plaques (Biorad) et les résultats sont comparés à la courbe standard de la BSA.

4.2.2.5. Analyse qualitative des protéines purifiées

a) SDS PAGE

Principe

Le but de ce type d'électrophorèse est d'obtenir une séparation des protéines selon leur masse moléculaire par migration sous l'effet d'un champ électrique. Cela est effectué sur un support en gel de polyacrylamide (PAGE) et par l'intermédiaire d'un détergent anionique, le dodécyl sulfate de sodium (SDS), qui supprime l'effet de la charge et de la forme individuelle d'une protéine.

En effet, par sa très forte affinité pour les protéines sur lesquelles il se lie par liaisons hydrophobes, le SDS va conférer une charge électrique constante, largement supérieure à la charge intrinsèque de la protéine.

Toutes les protéines vont donc apparaître identiquement chargées. De plus, par son effet détergent, le SDS dénature les protéines en faisant disparaître leur configuration spatiale.

b) Préparation des échantillons

L'appareil utilisé est un système Mini-Protean (Bio-Rad).

Du SDS est également ajouté dans le tampon de charge et de migration afin de maintenir ces modifications lors de la migration..

Les échantillons sont chargés dans le tampon suivant :

- 4% SDS
- 12% glycérol
- 50 mM Tris/Cl, pH 6,8
- 2% β-mercapto-éthanol

La dénaturation des échantillons est complétée par un chauffage à 100°C pendant 3 min avant le dépôt sur gel

c) Détection des protéines au Bleu de Coomassie

Les protéines sont ensuite fixées sur le gel trempé dans le tampon composé de 10% d'acide acétique et de 50% d'éthanol et 0,025% de Bleu de Coomassie R250.

Le gel est ensuite mis à décolorer dans le tampon constitué de 5% d'acide acétique et 30% d'éthanol.

La coloration et décoloration du gel sont effectuées sous agitation pendant 1heure.

4.2.2.6. Immunoblot

Principe

Le gel contenant les protéines est trempé pendant 15 min dans le tampon de fixation (20% éthanol, + 25 mM Tris-HCl, pH8.3, 192 mM glycine) ainsi que la membrane Immobilon PVDF (Millipore) découpée aux dimension. Auparavant, la membrane est trempée 1 minute dans de l'éthanol pur, puis rincée à l'eau distillée.

Le montage du transfert se fait par superposition de 2 papiers Whatman, le gel, la membrane et encore 2 papiers Whatman, avec l'orientation de la membrane côté anode.

a) Transfert

Après migration sur gel SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane Immobilon (Millipore), sous l'effet d'une différence de potentiel, dans un appareil *Trans-Blot Semi-Dry Transfert Cell* (Bio-Rad) pendant 30 min à raison de 5 mA/cm^2 de membrane.

Le tampon de transfert est constitué de :

- 25 mM Tris-HCl,
- 192 mM glycine, pH 8,3
- 20% éthanol.absolu

La qualité du transfert peut être vérifiée par trempage de la membrane pendant 10 min dans une solution de rouge Ponceau constituée de :

- 0,1 g de rouge Ponceau
- 200 µl d'acide acétique glaciale
- H_2O distillée jusqu'à 20 ml de volume final.

Rincer la membrane avec de l'eau distillée avant incubation dans l'anticorps spécifique

b) Immunodétection

Après transfert, la membrane est incubée 1h à 37°C sous agitation douce dans un tampon composé de

- 10 mM PBS, pH 7,6
- 0,1% Tween 20
- 10% de lait écrémé.

Ce traitement sert à saturer les liaisons non spécifiques de la membrane. Ensuite, la membrane est incubée pendant 2h dans le premier anticorps spécifique, dilué à une concentration de 0,2 µg/ml dans du tampon PBS-Tween, suivi de trois lavages de 10 min dans le même tampon. Une nouvelle incubation pour 1h avec un second anticorps lié la péroxydase (anticorps anti-anticorps spécifique de lapin couplé à la peroxydase dilué 3000 fois dans du PBS-Tween).

Les membranes sont lavées comme décrit précédemment. La détection chimique des protéines est effectuée à l'aide du kit *OptiCian* (Bio-Rad).

Tableau 4.7. récapitulatif des différents gels utilisés

Volume pour 10 ml de gel	**Gel de séparation**				**Gel de concentration**
Composants en ml	**6%**	**10%**	**12%**	**15%**	**4%**
H_2O	5,3	4	3,3	2,3	2,93
30%(37.5 :1) acrylamide:bis acrylamide.	2	3,3	4	5	0,66
1,5 M Tris-HCl pH8.8	2,5	2,5	2,5	2 ,5	x
0,5 M Tris-HCl pH6.8	x	x	x	x	1,26
10% SDS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05
10%Ammonium persulfate	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05
TEMED	0 ,008	0,008	0,008	0,008	0,004

Tableau4.8. Tampon de charge pour échantillons (Laemmli) stock 3X:

1M Tris-Cl pH6.8	2,4 ml
20% SDS	3 ml
Glycerol (100%)	3 ml
β-mercaptoethanol	1.6 ml ajouter extemporanément
Bromophenol blue	0,006g
10 ml stockage à 4°C	

Tableau4.9.Tampon de migration (Laemmli) stock 10X

Tris base (250mM)	30,3g
Glycine (1,92M)	144g
SDS (100%)	10 g
Compléter avec l'eau jusqu'à 1 litre	

4.2.2.7. Immunoprécipitation

Des anticorps polyclonaux anti-DosHwt ont été obtenus par le laboratoire Charles River, France (http://www.criver.com).

Pour déterminer leur spécificité, j'ai testé plusieurs dilutions dans un immunoblot.

Principe

Le principe de l'immunoprécipitation repose sur la création d'un réseau protéique en utilisant des anticorps spécifiques comme agent de liaison.

Le premier anticorps se lie aux protéines à précipiter et un anticorps secondaire permet de relier les anticorps primaires en réseau. Il en résulte un complexe de poids moléculaire élevé qui peut être précipité par centrifugation.

Une autre stratégie consiste à utiliser un composé suffisamment lourd (protéine A sépharose) reconnaissant l'anticorps primaire (ou secondaire), qui permet la précipitation du complexe par centrifugation.

Immunoprécipitation sur extrait cellulaire dans tampon non dénaturant

La préparation s'est faite à partir de lysat total bactérien d'un culot d'1 ml de cellules après surexpression de Dos et suivant le protocole ci-dessous.

Toutes les étapes se font à 4°C. Suite à l'incubation, le complexe est récupéré par centrifugation. Le surnageant est conservé pour analyse. Le culot est lavé avec du PBS et repris dans du tampon Laemmli 3X.

Les lavages sont également conservés pour l'analyse sur SDS-PAGE. Un échantillon de chaque étape est dénaturé 3 min à 100°C avant analyse sur SDS-PAGE et immunoblot.

Protocole

1-collecter dans un tube Falcon 1 ml de cellules par centrifugation (400g)
2-suspendre les cellules 2 fois de suite dans du tampon PBS froid dans le volume cellulaire du départ
3-ajouter 1 ml de tampon de lyse et suspendre par vortex 3 sec
4-mettre le tube dans la glace, 15 à 30min
5-centrifuger les cellules à 100000g pendant 1h
6-transférer le surnageant dans un tube propre et mettre dans la glace
7-tranférer dans un microtube :

- 30µl de protéine A sépharose
- 0,5ml de PBS froid
- 1µg d'anticorps purifié

8-dans un microtube 'contrôle' mettre 1 à 5 µl de préimmunsérum
9-mélanger 1h/4°C ; rajouter 0.01% Triton X-100
10-centrifuger 2 sec à vitesse max
11-aspirer le surnageant contenant les anticorps non liés
12-ajouter 1 ml du tampon de lyse et resuspendre les billes de protéine A sépharose par inversion 4x
13-laver en répétant les étapes 9 à 10
14-ajouter 10µl de BSA 10% au tube contenant le complexe Ag-Ab (11)
15-transférer dans le même tube la moitié du surnageant (étape 6) ; garder l'autre moitié pour la réaction non spécifique (étape 8)
16-incuber 1 à 2h à 4°C en agitant
17-centrifuger 5 sec à vitesse max
18-aspirer le surnageant contenant les protéines non liées
19-ajouter 1 ml de tampon de lavage, resuspendre par inversion 4x
20-centrifuger 2 sec à vitesse max
21-aspirer le surnageant et laisser 20µl de surnageant
22-laver le complexe 3x (3x10min) en laissant le tube 3 min sur la glace entre chaque étape
23-laver le complexe avec 1 ml de PBS froid
24-déposer sur les billes 25 µl de tampon Laemmli 2X
25-faire bouillir 5 min ; centrifuger 5 min
26-dépôt sur gel
27-coloration au Bleu de Coomassie et transfert sur membrane pour immunoblot

Tampons :

PBS pH 7,4 :

-136,8 mM NaCl
-2,5 mM KCl
-0,8 mM Na_2HPO4
-1,47 mM KHPO4
-0,9 mM $CaCl_2$
.0,5 mM $MgCl_2$

Tampon de lyse non dénaturant :

-1% Triton X-100
-50 mMTris HCl, pH7,4
-300 mM NaCl
-5 mM EDTA
-0.02% sodium azide

Ajouter extemporanément

-10 mM iodoacetamide
-1 mM PMSF
-2 µg/ml Leupeptine
-protéine A sépharose
-BSA 10%
-tampon de lavage
-50 mM TrisHCl, pH 7,4
-5 mM EDTA

J'ai testé les paramètres suivants afin de vérifier leur influence sur la quantité des protéines immunoprécipitées :

- des variantes des tampons de lyse
- la quantité du lysat et d'anticorps
- la quantité de protéine A sépharose

4.2.2.8. Spectroscopie d'absorption

Les spectres d'absorption à l'équilibre ont été effectués avec un spectromètre Shimadzu UV-vis 1601.

La spectroscopie d'absorption résolue dans le temps (résolution temporelle 30 fs, fenêtre temporelle maximale 4 ns) a été effectuée comme précédemment décrite (Martin & Vos, 1994).

Très brièvement, deux faisceaux laser courtes (durée ~30 fs) sont incidents sur l'échantillon : une intense, centrée à 560 nm dans la bande α, pour dissocier, et une faible, de lumière blanche, dont le spectre est enregistrée dans la zone Soret (400-500 nm), et qui sonde l'échantillon.

Une cinétique est construite en faisant varier le retard entre les deux faisceaux. La cadence laser étant de 30 Hz, la cuve est déplacée continuellement pendant l'enregistrement à fin d'exciter un volume frais à chaque paire d'impulsions.

Toutes les expériences sont réalisées à 20°C.

Préparation des échantillons

La solution de protéine, préparée avec l'hème sous forme oxydée, est placée dans une cuve en silice (Hellma) de 1 mm d'épaisseur, qui est fermée de façon étanche par un bouchon de caoutchouc. La concentration est de 50 à 70 μM. La solution est dégazée sous vide plusieurs fois, l'air étant remplacé par de l'argon. Tous les réactifs ajoutés par la suite sont dégazés de façon extemporanée.

-formes déoxy non liganDée

La réduction de l'hème se fait par ajout d'une solution mère d'hydrosulfite de sodium au moyen d'une seringue Hamilton, pour une concentration finale de 10 mM.

formes CO-liganDée

La forme carboxylée est obtenue à partir de la forme déoxy par équilibration avec 1 atm. CO.

-formes NO liganDée

La forme nitrosylée est obtenue par réduction avec 10 mM d'ascorbate de sodium et équilibrage avec 0,01 atm. NO.

- formes O_2 liganDée

La forme oxy est obtenue par réduction avec 10 mM d'ascorbate de sodium et équilibrage avec 1 atm. O_2.

V-Références bibliographiques

1. Akimoto S, Tanaka A, Nakamura K, Shiro Y, Nakamura H (2003). O_2-specific regulation of the ferrous heme-based sensor kinase FixL from *Sinorhizobium meliloti* and its aberrant inactivation in the ferric form. *Biochem Biophys Res Commun*. 304: 136-42.

2. Alex L.A. & Simon M.I. (1994). Protein histidine kinase and signal transduction in procaryotes and eucaryotes. *Trends Genet*.10: 133-138.

3. Anthamatten D. & Hennecke H. (1991).The regulatory status of the *fixL*- and *fixJ*-like genes in *Bradyrhizobium japonicum* may be different from that in *Rhizobium meliloti*. *Mol.Gen.Genet.* 223: 38-48.

4. Antonini, E. & Brunori, M. "Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands". *North-Holland Publishing Co*.: London. 1971.

5. Aono S., Matsuo T., Shimono T., Ohkubo K., Takasaki H., Nakajima H. (1997). Signal transduction in the transcriptional activator CooA containing a heme-based CO sensor: isolation of a dominant positive mutant which is active as the transcriptional activator even in the absence of CO. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 240 : 783-786

6. Arnold WP, Aldred R & Murad F (1977). Cigarette smoke activates guanylate cyclase and increases guanosine 3', 5'-monophosphate in tissues. *Science.* 198: 934-6.

7. Baca M, Borgstahl GE, Boissinot M, Burke PM, Williams DR, Slater KA, Getzoff Ed.(1994) Complete chemical structure of photoactive yellow protein: novel thioester-linked 4-hydroxycinnamyl chromophore and photocycle chemistry. *Biochemistry.* 33: 4369-77.

8. Balland V, Bouzhir-Sima L, Kiger L, Marden MC, Vos MH, Liebl U, Mattioli TA (2005). Role of arginine 220 in the oxygen sensor FixL *from Bradyrhizobium japonicum. J Biol Chem.* 280(15):15279-88.

9. Balland V, Bouzhir-Sima L, Anxolabehere-Mallart E, Boussac A, Vos MH, Liebl U, Mattioli TA. (2006). Functional implications of the propionate 7-arginine 220 interaction in the FixLH oxygen sensor from *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochemistry.* 45: 2072-84.

10. Batut J, Daveran-Mingot ML, David M, Jacobs J, Garnerone AM, Kahn D. (1989). *fixK,* a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti.* *EMBO J.* 8(4): 1279-86.

11. Birnboim HC & Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6): 1513–1523.

12. Bischoff, D.S. & Ordal, G.W. (1991). Sequence and characterization of *Bacillus subtilis CheB*, a homolog of *Escherichia coli CheY*, and its role in a different mechanism of chemotaxis. *J Biol Chem*, 266: 12301-12305.

13. Blattner FR, Plunkett G , Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 277(5331): 1453-74.

14. Boehning D & Snyder SH. (2002) Circadian rhythms, carbon monoxide and clocks. *Science*. 298: 2339-40.

15. Bourret RB, Hess JF, Borkovich KA, Pakula AA, Simon MI. (1989). Protein phosphorylation in chemotaxis and two-component regulatory systems of bacteria. *J Biol Chem.* 264: 7085-8. Review.

16. Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS. (2004). Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(7): 2659-64.

17. Brandish PE, Buechler W, Marletta MA (1998). Regeneration of the ferrous heme of soluble guanylate cyclase from the nitric oxide complex: acceleration by thiols and oxyhemoglobin. *Biochemistry.* 37(48): 16898-907.

18. Burbulys D, Trach K A, Hoch J A. (1991). Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell.* 64: 545–552.

19. Chan M.K. (2000). Heme protein biosensors. *Journal of Porphyrins and Phythalocyanines* 4: 358-361.

20. Chan MK. (2001). Recent advances in heme-protein sensors. *Curr Opin Chem Biol*. 5(2): 216-22.

21. Chang CK, Ward B, Ebina S. (1984) Kinetic study of CO and O_2 binding to horse heart myoglobine reconstituted with synthetic hemes lacking methyl and vinyl side chains. *Arch Biochem Biophys*. 31(2): 366-71.

22. Chang C. & Shockey J.A. (1999). The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 2: 352-358.

23. Chang, A.L., Tuckerman, J.R., Gonzalez, G., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M., Gilles-Gonzalez, M.A. (2001) Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry* 40: 3420–3426.

24. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 435-64.

25. Costerton J.W. (1999). Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 11(3-4): 217-21.

26. Cianetti S, Negrerie M, Vos MH, Martin JL, Kruglik SG (2004). Photodissociation of heme distal methionine in ferrous cytochrome *c* revealed by subpicosecond time-resolved resonance Raman spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 126(43): 13932-3.

27. Craven PA & DeRubertis FR (1978). Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. *J. Biol. Chem.* 253(23): 8433-43.

28. Crews S T, Thomas J B, Goodman C S. (1988). The *Drosophila single-minded* gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the *per* gene product. *Cell*. 52: 143–151.

29. Delgado-Nixon VM. Gonzalez G. & Gilles-Gonzalez MA. (2000). Dos, a heme-binding PAS protein from *Escherichia coli*, is a Direct Oxygen Sensor. *Biochemistry* 39: 2685-2691.

30. Denninger JW & Marletta MA (1999). Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 5: 334-50.

31. Ditta G, Virts E, Palomares A, Kim CH (1987). The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated. *J. Bacteriol.* 169(7): 3217-23.

32. Dunham CM, Dioum EM, Tuckerman JR, Gonzalez G, Scott WG, Gilles-Gonzalez MA. (2003). A distal arginine in oxygen-sensing heme-PAS domains is essential to ligand binding, signal transduction and structure. *Biochemistry*. 42(25): 7701-8.

33. Egli M, Gessner RV, Williams LD, Quigley GJ, van der Marel GA, van Boom JH, Rich A, Frederick CA. (1990). Atomic-resolution structure of the cellulose synthase regulator cyclic diguanylic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (8): 3235-9.

34. Fischer HM & Hennecke H (1987). Direct response of *Bradyrhizobium japonicum* nifA-mediated *nif* gene regulation to cellular oxygen status. *Mol. Gen. Genet.* 206: 621-626.

35. Fischer HM (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in Rhizobia. *Microbiol Rev* 58(3): 352-86.

36. Fisher RF & Long SR (1992). *Rhizobium* plant signal exchange. *Nature* 357: 655–660.

37. Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N., and Koonin, E.V. (2001). Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett* 203: 11–21.

38. Galperin M.Y. (2004). Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ. Microbiol*. 6: 552-567.

39. Gong, W., Hao, B., Mansy, S.S., Gonzalez G., Gilles-Gonzalez M.A. & Chan M.K. (1998). Structure of a biological oxygen sensor: new mechanism for heme-driven signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15177-15182.

40. Gong W., Hao, B. & Chan M.K. (2000). New mechanistic insights from structural studies of the Oxygen-Sensing Domain of *Bradyrhizobium japonicum* FixL. *Biochemistry* 39: 3955-3962.

41. Gilles-Gonzalez MA., Ditta GS. & Helinski DR. (1991). A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature* 350: 170-172.

42. Gilles-Gonzalez MA & Gonzalez G (1993) Regulation of the kinase activity of heme protein FixL from the two-component system FixL/FixJ of *Rhizobium meliloti*. *J Biol Chem.* 268(22): 16293-7.

43. Gilles-Gonzalez MA, Gonzalez G, Perutz MF, Kiger L, Marden MC & Poyart C (1994). Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, are a new class of heme proteins with distinctive ligand binding and autoxidation. *Biochemistry* 33: 8067-8073.

44. Gilles-Gonzalez MA, Gonzalez G & Perutz MF (1995). Kinase activity of oxygen sensor FixL depends on the spin state of heme iron. *Biochemistry* 34: 232-236.

45. Gonzalez G, Dioum EM, Bertolucci CM, Tomita T, Ikeda-Saito M, Cheesman MR, Watmough NJ, Gilles-Gonzalez MA (2002). Nature of the displaceable heme-axial residue in the *Ec*Dos protein, a heme-based sensor from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 41(26): 8414-21.

46. Gilles-Gonzalez MA & Gonzalez G. (2004) Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins. *J. Appl. Physiol.* 96(2): 774-83. Review.

47. Gilles-Gonzalez MA & Gonzalez G (2005). Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. *J Inorg Biochem* 99(1): 1-22.

48. Gilles-Gonzalez MA, Caceres AI, Sousa EH, Tomchick DR, Brautigam C, Gonzalez C, Machius M. (2006). A proximal arginine R206 participates in switching of the *Bradyrhizobium japonicum* FixL oxygen sensor. *J. Mol Biol.* 360(1): 80-9.

49. Gu YZ, Hogenesch JB & Bradfield CA (2000).The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 519-61.

50. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.

51. Hao, B., Isaza, C., Arndt, J., Sotis, M. & Chan, M.K. (2002) Structure-based mechanism of O_2 sensing and ligand discrimination by the FixL heme domain of *Bradyrhizobium japonium*. *Biochemistry* 41: 12952–12958.

52. Hardman JG & Sutherland EW (1969). Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3', 5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem* 244(23): 6363-70.

53. Hirata S., Matsui T., Sasakura Y., Sugiyama S., Yoshimura T., Sagami I., and Shimizu T. (2003). Characterisation of M95 mutants of heme-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem*. 270: 4771-4779.

54. Hoch, JA & Silhavy, TJ (1995). Two-component signal transduction. *Washington, D.C: American Society for Microbiology.*

55. Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, Hankinson O (1991). Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252: 954–958.

56. Iyer LM, Anantharaman V & Aravind L (2003). Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins. *BMC Genomics*. 4(1): 5.

57. Ignarro LJ, Wood KS & Wolin MS (1982). Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(9): 2870-3.

58. Ignarro LJ (1990). Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol. Toxicol*. 67(1): 1-7.

59. Jasaitis A, Hola K, Bouzhir-Sima L, Lambry JC, Balland V, Vos MH, Liebl U. (2006). Role of distal arginine in early sensing intermediates in the heme domain of the oxygen sensor FixL. *Biochemistry* 45(19): 6018-26.

60. Kerby RL, Hong SS, Ensign SA, Coppoc LJ, Ludden PW, Roberts GP (1992).Genetic and physiological characterization of the *Rhodospirillum rubrum* carbon monoxide deshydrogenase system. *J. bacteriol*. 74: 5284-5294.

61. Kerby RL, Ludden PW, Roberts GP (1995). Carbon monoxide- dependent growth of *Rhodospirillum rubrum* . *J. bacteriol*. 177: 2241-2244.

62. Key J & Moffat K (2005). Crystal structures of deoxy and CO-bound bjFixLH reveal details of ligand recognition and signaling. *Biochemistry*. 44(12): 4627-35.

63. Karow DS, Pan D, Tran R, Pellicena P, Presley A, Mathies RA, Marletta MA (2004). Spectroscopic characterization of the soluble guanylate cyclase-like heme domains from *Vibrio cholerae* and *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Biochemistry* 43(31): 10203-11.

64. Karow DS, Pan D, Davis JH, Behrends S, Mathies RA, Marletta MA.(2005). Characterization of functional heme domains from soluble guanylate cyclase. *Biochemistry*.44 (49):16266-74.

65. Kofoid EC & Parkinson JS. (1988). Transmitter and receiver modules in bacterial signaling proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(14): 4981-5.

66. Krumenacker JS, Hanafy KA & Murad F (2004). Regulation of nitric oxide and soluble guanylate cyclase. *Brain Res. Bull.* 62(6): 505-15.

67. Kurokawa, H., Lee, D.-S., Watanabe, M., Sagami, I., Mikami, B., Raman, C.S. & Shimizu, T. (2004). A redox-controlled molecular switch revealed by the crystal structure of a bacterial heme PAS sensor. *J. Biol. Chem*. 279, 20186–20193.

68. Kumazaki S, Nakajima H, Sakaguchi T, Nakagawa E, Shinohara H, Yoshihara K, Aono S. (2000). Dissociation and recombination between ligands and heme in a CO-sensing transcriptional activator CooA. A flash photolysis study. *J. Biol. Chem*. 275 (49): 38378-83.

69. Lagarias DM, Wu SH & Lagarias JC (1995). Atypical phytochrome gene structure in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *Plant Mol Biol* 29:1127–1142.

70. Liebl U, Bouzhir-Sima L, Negrerie M, Martin JL, Vos MH.(2002). Ultrafast ligand rebinding in the heme domain of the oxygen sensors FixL and Dos: general regulatory implications for heme-based sensors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20): 12771-6.

71. Liebl U, Bouzhir-Sima L, Kiger L, Marden MC, Lambry JC, Negrerie M, Vos MH. (2003). Ligand binding dynamics to the heme domain of the oxygen sensor Dos from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 42(21): 6527-35.

72. Lois AF, Ditta GS & Helinski DR (1993). The oxygen sensor FixL of *Rhizobium meliloti* is a membrane protein containing four possible transmembrane segments. *J. Bacteriol*. 175(4):1103-9.

73. Loomis WF, Shaulsky G & Wang N (1997): Histidine kinase in signal transduction pathways of eukaryotes. *J. Cell Sci.* 110: 1141-1145.

74. Martin JL & Vos MH (1994). Femtosecond measurements of geminate recombination in heme proteins. *Methods Enzymol*. 232: 416-30. Review.

75. Matsui M, Goto H, Niwa Y, Arisawa T, Hirooka Y, Hayakawa T (1998). Preliminary results of fine needle aspiration biopsy histology in upper gastrointestinal submucosal tumors. *Endoscopy* 30(9): 750-5.

76. Mendez-Ortiz MM, Hyodo M, Hayakawa Y & Membrillo-Hernandez J (2006). Genome-wide transcriptional profile *Escherichia coli* in response of high level of the second messager 3', 5'-cyclic diguanylic acid. *J. Biol. Chem.* 281: 8090-8099.

77. Miller JH (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

78. Miyatake H, Mukai M, Adachi S, Nakamura H, Tamura K, Iizuka T, Shiro Y, Strange RW, Hasnain SS (1999). Iron coordination structures of oxygen sensor FixL characterized by Fe K-edge extended x-ray absorption fine structure and resonance raman spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 274(33): 23176-84.

79. Morais Cabral JH, Lee A, Cohen SL, Chait BT, Li M, Mackinnon R (1998). Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell*. 95: 649–655.

80. Mizuno T (1997). Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res*. 4(2):161-8.

81. Monson EK, Ditta GS & Helinski DR (1995).The oxygen sensor protein, FixL, of *Rhizobium meliloti*. Role of histidine residues in heme binding, phosphorylation and signal transduction. *J Biol Chem* 270(10): 5243-50.

82. Montgomery BL & Lagarias JC (2002). Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci.* 7(8): 357-66.

83. Nambu JR, Lewis JO, Wharton KA J, Crews ST (1991). The *Drosophila single-minded* gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell.* 67:1157–1167.

84. Negrerie M, Bouzhir L, Martin JL, Liebl U. (2001). Control of nitric oxide dynamics by guanylate cyclase in its activated state. *J. Biol. Chem.* 276(50): 46815-21.

85. Nixon BT, Ronson CW & Ausubel FM (1986).Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(20): 7850-4.

86. Ota IM & Varshavsky A (1993). A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science* 262: 566-569.

87. Park H, Suquet C, Savenkova MI, Satterlee JD, Kang C (2002). Cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of DOS heme domain, a new heme oxygen sensor in *Escherichia coli. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr*. 58 (Pt 9): 1504.

88. Park H, Suquet C, Satterlee JD & Kang C (2004). Insights into signal transduction involving PAS domain oxygen-sensing heme proteins from the X-ray crystal structure of *Escherichia coli* Dos heme domain (*Ec* DosH).*Biochemistry* 43(10): 2738-46.

89. Parkinson JS & Kofoid EC (1992). Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet*. 26: 71–112.

90. Parkinson JS (1993). Signal transduction schemes of bacteria. *Cell.* 73: 857–871.

91. Paul, R., Weiser, S., Amiot, N.C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B. & Jenal, U. (2004). Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev.* 18: 715–727.

92. Pellequer JL, Brudler R & Getzoff ED (1999). Biological sensors: more than one way to sense oxygen. *Current Biology* 9: 416-418.

93. Pellequer JL, Wager-Smith KA, Kay SA & Getzoff ED (1998). Photoactive yellow protein: a structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5884–5890.

94. Pei, J. & Grishin, N.V. (2001). GGDEF domain is homologous to adenylyl cyclase. *Proteins* 42: 210–216.

95. Pellicena P, Karow DS, Boon EM, Marletta MA, Kuriyan J. (2004). Crystal structure of an oxygen-binding heme domain related to soluble guanylate cyclases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(35): 12854-9.

96. Pelmont J. (1993). Bactéries et Environnement (adaptations physiologiques) 897 p., *Presses Universitaires de Grenoble, PESSON P. & LOUVEAUX.*

97. Perraud AL, Weiss V & Gross R (1999). Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol.* 7(3): 115-20. Review.

98. Perutz MF, Paoli M & Lesk AM (1999). FixL, a haemoglobin that acts as an oxygen sensor: signalling mechanism and structural basis of its homology with PAS domains. *Chemistry and Biology* 6: 291-297.

99. Petrich JW, Poyart C & Martin JL(1988). Photophysics and reactivity of heme proteins: a femtosecond absorption study of hemoglobin, myoglobin, and protoheme. *Biochemistry* 27(11): 4049-60.

100. Regensburger B & Hennecke H (1983). RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. *Arch. Microbiol*. 135: 103-109.

101. Rodgers KR, Lukat-Rodgers GS & Barron JA (1996). Structural basis for ligand discrimination and response initiation in the heme-based oxygen sensor FixL. *Biochemistry* 35: 9539–9548.

102. Rompf A, Hungerer C, Hoffmann T, Lindenmeyer M, Romling U, Gross U, Doss MO, Arai H, Igarashi Y, Jahn D (1998). Regulation of *Pseudomonas aeruginosa hemF* and *hemN* by the dual action of the redox response regulators *Anr* and *Dnr*. *Mol. Microbiol.* 29(4): 985-97.

103. Ross, P., Mayer, R. & Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev.* 55: 35–58.

104. Ryjenkov DA, Tarutina M, Moskvin OV, Gomelsky M (2005). Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J. Bacteriol*. 187(5): 1792-8.

105. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. in « Molecular Cloning » (1992), *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.

106. Sasakura, Y., Hirata, S., Sugiyama, S., Suzuki, S., Taguchi, S., Watanabe, M., Matsui, T., Sagami, I. & Shimizu, T. (2002). Characterization of a direct oxygen sensor heme protein from *Escherichia coli*: effects of the heme redox states and mutations at the heme-binding site on catalysis and structure. *J. Biol. Chem*. 277: 23821–2382.

107. Sasakura Y, Kanda K, Yoshimura-Suzuki T, Matsui T, Fukuzono S, Han MH, Shimizu T (2004). Protein microarray system for detecting protein-protein interactions using an anti-His-tag antibody and fluorescence scanning: effects of the heme redox state on protein-protein interactions of heme-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli*. *Anal Chem.* 76(22): 6521-7.

108. Sasakura Y, Kanda K, Yoshimura-Suzuki T, Matsui T, Fukuzono S, Shimizu T (2005). Investigation of the relationship between protein-protein interaction and catalytic activity of a heme-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli* (*Ec*DOS) by protein microarray. *Biochemistry* 44(28): 9598-605.

109. Sasakura Y, Yoshimura-Suzuki T, Kurokawa H, Shimizu T (2006).

Structure-function relationships of *Ec*DOS, a heme-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli*. *Acc Chem Res* 39(1): 37-43.

110. Saito K, Ito E, Hosono K, Nakamura K, Imai K, Iizuka T, Shiro Y, Nakamura H.(2003). The uncoupling of oxygen sensing, phosphorylation signaling and transcriptional activation in oxygen sensor FixL and FixJ mutants. *Mol. Microbiol*.48 (2): 373-83.

111. Sato A, Sasakura Y, Sugiyama S, Sagami I, Shimizu T, Mizutani Y, Kitagawa T (2002). Stationary and time-resolved resonance Raman spectra of His77 and Met95 mutants of the isolated heme domain of a direct oxygen sensor from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 277(36): 32650-8.

112. Sawers RG (1991). Identification and molecular characterization of a transcriptional regulator from *Pseudomonas aeruginosa* PA01 exhibiting structural and functional similarity to the FNR protein of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5(6): 1469–148.

113. Schmidt AJ, Ryjenkov DA & Gomelsky M (2005). The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J. Bacteriol*.187 (14): 4774-81.

114. Shelver D, Kerby RL, He Y, Roberts GP.(1995). Carbon monoxide-induced activation of gene expression in *Rhodospirillum rubrum* requires the product of CooA, a member of the cyclic AMP receptor protein family of transcriptional regulators. *J. Bacteriol*.177 (8): 2157-63.

115. Shelver D, Kerby RL, He Y, Roberts GP (1997). CooA, a CO-sensing transcription factor from *Rhodospirillum rubrum*, is a CO-binding heme protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(21): 11216-20.

116. Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M, Romling U.(2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol. Microbiol*. 53(4): 1123-34.

117. Smith H. (1995) Physiological and ecological function within the phytochrome family. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46: 289–315.

118. Smith H. (2000). Phytochromes and light signal perception by plants: an emerging synthesis. *Nature.* 407: 585–591.

119. Soupene E, Foussard M, Boistard P, Truchet G, Batut J (1995). Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N2-fixation gene expression within the alfalfa root nodule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(9): 3759-63.

120. Spiro S & Guest JR (1991). Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli. Trends Biochem. Sci*. 16(8): 310-4.

121. Springer BA, Egeberg KD, Sligar SG, Rohlfs RJ, Mathews AJ, Olson JS. (1989). Discrimination between oxygen and carbon monoxide and inhibition of autooxidation by myoglobin. Site-directed mutagenesis of the distal histidine. *J Biol Chem* 264(6): 3057-60.

122. Stock, J.B., Ninfa, A.J. & Stock, A.M. (1989). Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* 53, 450-490.

123. Stone JR & Marletta MA (1994). Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33(18): 5636-40.

124. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrock-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406 (6799): 959-64.

125. Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.

126. Tal, R., Wong, H.C., Calhoon, R., Gelfand, D., Fear, A.L., Volman, G., Mayer R., Ross P., Amikam D., Weinhouse H., Cohen A., Sapir S., Ohana P., Benziman M. (1998). Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J Bacteriol* 180: 4416–4425.

127. Tamura K, Nakamura H, Tanaka Y, Oue S, Tsukamoto K, Nomura M, Tsuchiya T, Adachi S, Takahashi S, Iizuka T & Shiro Y(1996). Nature of endogenous ligand binding to heme iron in oxygen sensor FixL *J. Am. Chem. Soc*. *118*(39): 9434 – 9435.

128. Taylor BL & Zhulin IB (1998). In search of higher energy: metabolism-dependent behaviour in bacteria. *Mol. Microbiol*. 28(4): 683-90.

129. Taylor BL & Zhulin IB (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential and light. *Microbiol. Mol. Biol. Re*v. 63(2): 479-506.

130. Tomita T, Gonzalez G, Chang AL, Ikeda-Saito M, Gilles-Gonzalez MA. (2002). A comparative resonance Raman analysis of heme-binding PAS domains: heme iron coordination structures of the *Bj*FixL, *Ax*PDEA1, *Ec*Dos, and *Mt*Dos proteins. *Biochemistry* 41(15): 4819-26.

131. Tuckerman JR, Gonzalez G, Dioum EM, Gilles-Gonzalez MA (2002). Ligand and oxidation-state specific regulation of the heme-based oxygen sensor FixL from *Sinorhizobium meliloti*. *Biochemistry* 41(19): 6170-7.

132. Tuckerman JR, Gonzalez G & Gilles-Gonzalez MA (2001). Complexation precedes phosphorylation for two-component regulatory system FixL/FixJ of *Sinorhizobium meliloti*. *J Mol Biol.* 308(3): 449-55.

133. Watmough, N. J., Butland, G., Cheesman, M. R., Moir, J. W., Richardson, D. J. & Spiro, S. (1999). Nitric oxide in bacteria: Synthesis and consumption, *Biochim. Biophys. Acta 1411*: 456-474.

134. Watanabe, M., Matsui, T., Sasakura, Y., Sagami, I. & Shimizu, T. (2003). Unusual cyanide binding to a heme-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli*: effect of Met95 mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 299:169–172.

135. Wegele R, Tasler R, Zeng Y, Rivera M, Frankenberg-Dinkel N (2004). The heme oxygenase(s)-phytochrome system of *Pseudomonas aeruginosa. J. Biol Chem.* 279(44): 45791-802.

136. Weinrauch, Y., Penchev, R., Dubnau, E., Smith, I. and Dubnau, D. (1990). A *Bacillus subtilis* regulatory gene product for genetic competence and sporulation resembles sensor protein members of the bacterial two-component signal-transduction systems. *Genes Dev* 4: 860-872.

137. West, A.H. & Stock, A.M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* 26: 369-376.

138. Zhao Y, Brandish PE, Ballou DP, Marletta MA. (1999). A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26): 14753-8.

139. Zhulin IB, Taylor BL & Dixon R (1997). PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem. Sci.* 22: 331–333.

VI-Annexes

1. Article I

Ultrafast ligand rebinding in the heme domain of the oxygen sensors FixL and Dos: General regulatory implications for heme-based sensors

Ursula Liebl, Latifa Bouzhir-Sima, Michel Négrerie, Jean-Louis Martin, and Marten H. Vos

***Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, (2002), vol. 99, no. 20: 12771–12776**

Ultrafast ligand rebinding in the heme domain of the oxygen sensors FixL and Dos: General regulatory implications for heme-based sensors

Ursula Liebl, Latifa Bouzhir-Sima, Michel Négrerie, Jean-Louis Martin, and Marten H. Vos*

Laboratory for Optical Biosciences, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U451, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 7645, Ecole Polytechnique-Ecole Nationale Supérieure de Techniques Avancées, 91128 Palaiseau Cedex, France

Edited by Hans Frauenfelder, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, and approved July 29, 2002 (received for review May 23, 2002)

Heme-based oxygen sensors are part of ligand-specific two-component regulatory systems, which have both a relatively low oxygen affinity and a low oxygen-binding rate. To get insight into the dynamical aspects underlying these features and the ligand specificity of the signal transduction from the heme sensor domain, we used femtosecond spectroscopy to study ligand dynamics in the heme domains of the oxygen sensors FixL from *Bradyrhizobium japonicum* (FixLH) and Dos from *Escherichia coli* (DosH). The heme coordination with different ligands and the corresponding ground-state heme spectra of FixLH are similar to myoglobin (Mb). After photodissociation, the excited-state properties and ligand-rebinding kinetics are qualitatively similar for FixLH and Mb for CO and NO as ligands. In contrast to Mb, the transient spectra of FixLH after photodissociation of ligands are distorted compared with the ground-state difference spectra, indicating differences in the heme environment with respect to the unliganded state. This distortion is particularly marked for O_2. Strikingly, heme–O_2 recombination occurs with efficiency unprecedented for heme proteins, in ≈5 ps for ≈90% of the dissociated O_2. For DosH–O_2, which shows 60% sequence similarity to FixLH, but where signal detection and transmission presumably are quite different, a similarly fast recombination was found with an even higher yield. Altogether these results indicate that in these sensors the heme pocket acts as a ligand-specific trap. The general implications for the functioning of heme-based ligand sensors are discussed in the light of recent studies on heme-based NO and CO sensors.

Heme-based sensors carry out crucial roles in biological signaling in prokaryotic and eukaryotic organisms by responding to the gaseous ligands nitric oxide (NO), carbon monoxide (CO), and oxygen (O_2). Binding of these physiological messenger molecules initiates chemistry that eventually results in the organism's response to changes in ligand availability. Apart from the best-studied NO-activated mammalian enzyme guanylate cyclase (GC), bacterial sensors of CO [CooA from *Rhodospirillum rubrum* (1, 2)] and O_2 [FixL in nitrogen-fixing bacteria (3) and Dos in *Escherichia coli* (4)] have been discovered in recent years. In these regulatory systems, the ligand-specific binding to a heme domain leads to either activation or inhibition of a regulated (catalytic) domain. Thus, a local perturbation is transduced over a long distance within the protein. Structural and spectroscopic studies indicate that the mechanisms of this transduction vary considerably within these systems, already at the level of the heme pocket. In CooA and Dos, the sensed ligand, CO or O_2, respectively, replaces one of the two protein residues bound to the (six-coordinate) heme. In GC, the unliganded heme is five-coordinate, and NO binding to the heme leads to dissociation of the proximal histidine. In FixL, binding of O_2 induces a spin change of the heme (five- to six-coordinate; ref. 5).

The molecular mechanism and the origin of ligand specificity of the signal transduction of the heme-based sensors are open questions. One way to address these issues is to study the effect of photodissociation of ligands from the heme, thus triggering the inverse of the ligand-binding reaction. Recent studies on GC (6) and CooA (7) have revealed extremely fast geminate recombination of a large fraction of dissociated NO and CO, respectively. Here we study photodissociation and rebinding of O_2 from the heme sensor domain of FixL in comparison with other ligands and with O_2 in the heme domain of Dos. We report that, in FixL, O_2 rebinds to the heme even faster than NO, an unprecedented feature for heme proteins, indicating that very fast rebinding of the sensor-specific physiological ligand to the heme is a general feature of heme-based sensors. Moreover, spectroscopic evidence is obtained for ligand-specific alterations of the heme pocket.

FixL, a rhizobial oxygen-sensor protein (for reviews see refs. 8–10), contains a heme sensor domain and a histidine kinase domain (3). The kinase activity strongly diminishes after binding of molecular oxygen [and to a much lesser extent of other diatomic ligands (11)] to the heme, and therewith the expression of genes involved in nitrogen fixation. As in the oxygen-storage protein myoglobin (Mb), the unliganded and oxygenated form of the heme are (high-spin) five-coordinate and (low-spin) six-coordinate, respectively (5), and the corresponding absorption spectra (as well as those for the NO and CO adducts) also are very similar to those of Mb (Fig. 1). Structural studies indicate similarities in the heme geometry of the oxycomplexes of both proteins (12), and also the bond strength between the heme iron and O_2 appears similar (13). However, the ligand-binding properties are very different (8), and whereas the oxygen dissociation rate is similar, in particular the oxygen affinity and oxygen-binding rates are much lower in FixL (14), possibly adapting its sensitivity to changes in the environmental oxygen concentration. Crystal structures have been obtained for the heme domains of FixL (FixLH) from *Bradyrhizobium japonicum* (12, 15) and *Rhizobium meliloti* (16). Based on these structures, for *B. japonicum* FixL the mechanism of signal transduction has been suggested to involve the heme propionates and two arginine residues, one of which is hydrogen-bonded to heme-bound oxygen (12); for *R. meliloti* FixL, a somewhat different mechanism has been proposed (16). In this work we will show that whereas the two stable (oxy and deoxy) states of FixLH may show similarities with the Mb "model" system, the intermediates are very different and may provide keys for understanding the regulatory mechanism of this oxygen sensor at the level of the heme sensor domain.

Materials and Methods

Bacterial Strains and Growth Conditions. *B. japonicum* wild-type strain was obtained from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH DSM no. 30131 (American Type Culture Collection 10324) and grown aerobically at 30°C in peptone/salts/yeast extract (PSY) medium (17). All *E. coli* strains were grown in LB medium (18) at 37°C.

DNA Manipulations. Isolation of chromosomal DNA from *B. japonicum* was performed as described (19). Chromosomal DNA from *E. coli* HB101 was isolated following standard protocols. To amplify

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: GC, guanylate cyclase; Mb, myoglobin; DAS, decay-associated spectra.

*To whom reprint requests should be addressed. E-mail: Marten.Vos@polytechnique.fr.

BIOPHYSICS

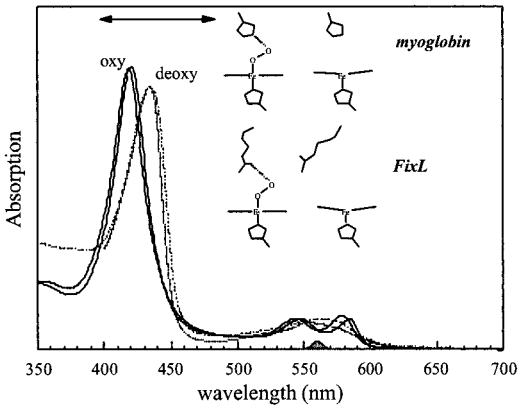


Fig. 1. Ground-state absorption spectra of the oxy (solid line) and deoxy (dashed line) forms of FixLH (thick lines) compared with the corresponding spectra for horse-heart Mb (thin lines). The represented cartoons of the heme environments are based on the crystal structures. The spectra are normalized to the same concentration. The spectral profile of the pump pulse and the probe region in the transient absorption experiments are indicated by the shaded area at the bottom and the two-sided arrow, respectively.

the gene fragment between codons 142–270, encoding the FixL heme domain (FixLH), two oligonucleotide primers were designed (forward, 5′-GCC ATG GAG ACC CAC CTC CGC TCG-3′, and reverse, 5′-CAG GCG CGT CGA CAG GAA CTG CAA-3′), introducing an *Nco*I and a *Sal*I site at the 5′ and 3′ ends, respectively. The amplified product was cloned into the expression vector pET-28a+ (Novagen) as an *Nco*I–*Sal*I fragment. The DNA fragment corresponding to codons 1–152 from *E. coli* yddU (renamed *dos*; ref. 4), coding for the oxygen-sensing PAS domain (DosH), was amplified by using the primers 5′-ATG AAG CTA ACC GAT GCG GAT A-3′ (forward) and 5′-C GAC CGA CCG GTG ATT GTC CTC-3′ (reverse) and cloned into a pBAD TOPO TA cloning vector (Invitrogen) under control of an arabinose-inducible promoter.

Gene Expression and Protein Purification. Expression of *fixlH* was induced by the addition of 0.4 mM isopropyl β-D-thiogalactoside to BL21 DE3 cultures in the exponential growth phase. After 16 h of induction at 37°C, the cells were harvested at 4°C. Expression of *dosH* was induced by adding 0.2% arabinose to exponential TOP10 cultures, and cells were harvested after 5 h of induction at 37°C. Both proteins were purified following instructions of the Xpress System protein purification (Invitrogen) on a nickel-resin column, washed, and stored in 50 mM Tris·HCl, pH 7.4. The sizes of purified FixLH and DosH were verified on SDS/PAGE, and protein concentrations were measured by using the BCA protein assay (Pierce).

Sample Preparation. For the spectroscopic measurements, samples were prepared to a heme concentration of ≈60 μM in gas-tight optical cells with an optical path length of 1 mm. For FixLH, the degassed as-prepared (ferric) sample was reduced with 1 mM sodium dithionite to obtain the reduced nonliganded form (deoxy). For the carbonmonoxy form, deoxy FixLH was equilibrated with 1 atm (1 atm = 101.3 kPa) CO. To obtain the oxy and nitrosyl forms, ferric–FixLH was reduced in ≈10-min time with 10 mM sodium ascorbate and subsequently equilibrated with 1 atm O_2 or 0.01 atm NO, respectively.

Analysis of the second derivative of the absorption spectrum indicated that the thus-reduced sample was in the O_2-bound form, ≈95% in air and ≈99% in 1 atm O_2, corresponding to a K_d of ≈0.015 mM, which is somewhat lower than that reported previously for the full-length protein (14).† In a similar way, >99% of the NO-bound form was found to be in the six-coordinated form. This contrasts with the mixtures of five- and six-coordinate forms reported for the dithionite-reduced NO-bound form of *R. meliloti* FixL (20, 21) but is in agreement with a very recent characterization of *B. japonicum* FixL–NO (22).

To obtain oxy–DosH, as-prepared DosH was degassed, reduced with 25 mM DTT, and subsequently equilibrated with 1 atm O_2. Horse-heart Mb was purchased from Sigma and prepared at a concentration of ≈100 μM in 50 mM Tris buffer, pH 7.4. The reduced unliganded and liganded forms were prepared in a similar way as for FixLH.

Spectroscopy. For all samples, ground-state spectra, recorded with a Shimadzu UV-Vis 1601 spectrophotometer, were unchanged after the femtosecond experiments. Multicolor femtosecond absorption spectroscopy (23) was performed at a repetition rate of 30 Hz by using pump pulses centered at 563 nm (30 fs, full width at half-maximum) and compressed white-light continuum probe pulses. All experiments were performed at room temperature. It was verified that for MbCO, MbNO, and MbO_2 the photodissociation spectra were similar to the steady-state difference spectra.

Global exponential fitting of the data in terms of decay-associated spectra (DAS) was performed with a procedure described previously (24). To avoid artifacts due to the chirp in the probe pulse, this analysis was performed over a limited wavelength region and started at $t \approx 500$ fs. Therefore the very fast phases, of a few hundred femtoseconds or less, although within the time resolution of the instrument, were not recovered by this analysis.

Results

Unliganded Species. As a control, transient spectroscopy was performed on unliganded FixLH in two redox forms (data not shown). Photoexcitation of ferric FixLH resulted in a transient bleaching of the ground state Soret band and an induced absorption on the red side, which decays with time constants of ≈0.5 ps (major component) and ≈5 ps. After 20 ps the ground state is recovered completely. This response, presumably reflecting formation of excited states and their decay, is similar to that found in other oxidized heme proteins (cf. ref. 25) and is consistent with ferric FixLH being five-coordinate unliganded (14, 26). Transient spectra of unliganded ferrous FixLH are similar to those of reduced unliganded Mb (27) and GC (6) and mainly reflect the heme photophysics, which can be understood in the framework of two excited states cascading back to the ground state (28, 29).

FixLH–CO. As in all other heme proteins studied by flash photolysis, photoexcitation of CO-liganded FixLH leads to dissociation of CO from the heme. A small spectral evolution is observed with a time constant of ≈200 fs (not shown), presumably reflecting excited-state decay as in MbCO (28). Virtually no further spectral changes are observed up to our longest delay time of 4 ns (Fig. 2), showing that recombination does not occur on this time scale. The transient spectra have the same general shape as the equilibrium difference spectrum but, in contrast to MbCO, are somewhat distorted in that the relative amplitude of the induced absorption is ≈30% smaller. This distortion is not observed in the bimolecular recombination phases on the millisecond time scale (30). The origin of this distortion will be discussed later.

FixLH–NO. Photodissociation of NO from FixLH leads to geminate recombination of the FixLH–NO pair in a multiphasic way on the picosecond time scale (Fig. 3). After 1 ns ≈95% of the initial (≈1-ps) signal has decayed; no significant further spectral evolution was observed up to 4 ns (not shown). Analysis of the transient

†Millisecond ligand-binding studies indicate that this lower K_d is predominantly the result of a higher k_{on} (L. Kiger, M. C. Marden, U.L., and M.H.V., unpublished results).

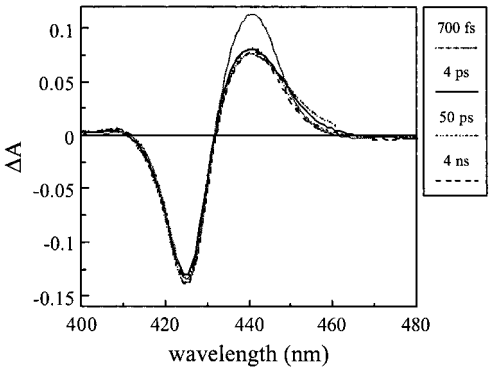


Fig. 2. Transient absorption spectra of FixLH–CO at various delay times. The solid gray line represents the shape of the steady-state unliganded minus CO-liganded difference spectrum.

spectra in terms of a multiexponential decay model yields, apart from a small ≈400-fs phase assigned to excited-state decay (cf. ref. 28), picosecond decay phases of 5.3, 20, and 220 ps as well as an asymptotic phase (>4 ns). The spectral characteristics of the last three decay phases are very similar, and these phases can be assigned to recombination of NO with ground-state heme. The bleaching part of the transient spectrum associated with the 5.3-ps decay (5.3-ps DAS) is very similar to that of the other phases; the induced absorption part is slightly more extended to the red side (not shown). As after NO dissociation from heme proteins, red-absorbing (≈450 nm) heme excited states with a lifetime of a few picoseconds have been observed (28), which indicates that at least part of the NO recombination in FixLH corresponding to this decay component occurs with the heme in the excited state. Overall, the geminate recombination of NO with heme is highly multiphasic, similar to what has been observed in other heme proteins (31–35) [with the notable exception of the NO receptor GC (6)], and often is interpreted in terms of relaxation of the protein on the time scale of the recombination.

Fig. 3 *Inset* shows that the kinetics are qualitatively similar to those observed in wild-type Mb, with the fastest decay phases having a somewhat higher relative amplitude. However, in contrast to Mb (MbNO, data not shown), the shape of the transient spectra differs considerably from the equilibrium difference spectrum in that the amplitude of the induced absorption is ≈2 times lower (as shown for the 10-ps transient spectrum in Fig. 3). This effect is

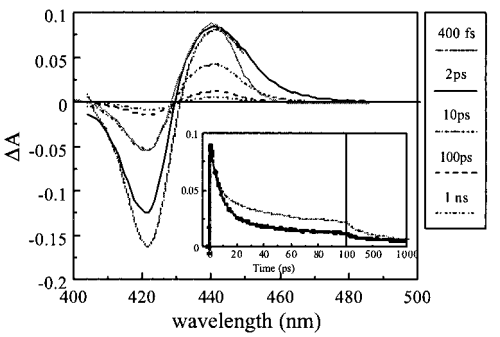


Fig. 3. Recombination of NO with FixLH. Transient absorption spectra at various delay times are shown. The solid gray line represents the steady-state unliganded minus NO-liganded difference spectrum, normalized on the bleaching part of the 10-ps transient spectrum. (*Inset*) Kinetics at 440 nm. The solid lines represent a fit with decay phases of 5.3 (62%), 20 (24%), and 220 ps (8%) and a constant (6%). The dashed line represents the recombination of NO with Mb (data taken from ref. 35). Note the different time scales.

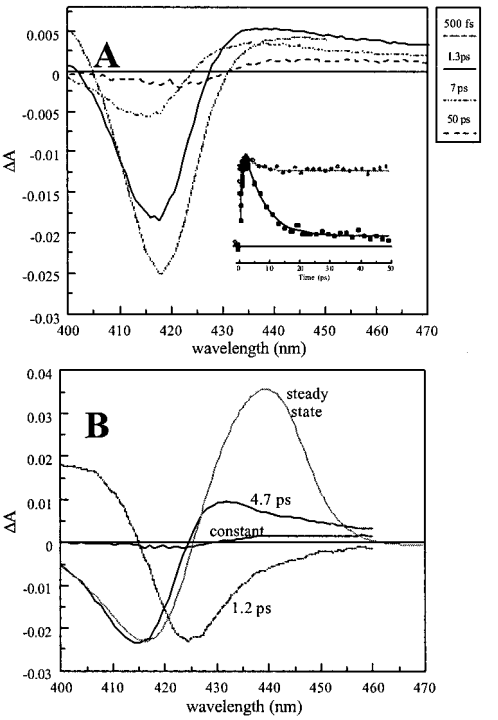


Fig. 4. Recombination of O_2 with FixLH. (*A*) Transient absorption spectra at various delay times. (*Inset*) Kinetics (>200 fs) at 433 nm (the dashed line represents a fit of the kinetics for MbO_2 at the same wavelength). (*B*) DAS (dashed lines) of the decay components > 1 ps. The solid gray line represents the steady-state unliganded minus O_2-liganded difference spectrum, normalized on the bleaching part of the 4.7-ps component.

qualitatively similar to the effect observed after CO dissociation but is much stronger for the case of NO dissociation (see *Discussion*).

FixLH–O_2. Measurements with oxy–FixL are potentially complicated by the fact that equilibration with air leads to incomplete oxygen binding to FixL (14). To minimize this effect, the samples were equilibrated with 1 atm O_2. In this case, only ≈1% of the oxygenated sample is unliganded (see *Materials and Methods*).

Fig. 4*A* shows the transient spectra observed after excitation of oxygenated FixLH. The spectra are characterized by a strong initial bleaching around 420 nm and a much weaker induced absorption to the red. The amplitude of the spectra strongly diminishes on the picosecond time scale and remains unchanged from ≈20 ps to >1 ns.

In a global analysis three main phases with a time constant > 1 ps were found (Fig. 4*B*).‡ The 1.2-ps phase presumably reflects excited-state decay. Consistently, considerable induced absorption decaying on this time scale was observed around 470 nm (not shown; cf. ref. 28). The other decay phase is the 4.7-ps phase and can be attributed to recombination of photodissociated O_2 with the heme. The 4.7-ps DAS-induced absorption maximum appears more to the blue than the steady-state difference spectrum. Because it is expected to be more red-shifted for an excited state (see NO results above and ref. 28), this indicates that most recombination occurs with the heme in the ground state. Decay phases on a similar time scale after excitation of oxy hemes have been observed in Mb and hemoglobin (28, 34), but these (ascribed at least in part to heme excited states) have a much lower relative amplitude (compare Fig.

‡A somewhat better fit was obtained with an additional decay phase, where the 4.7-ps phase was separated in two phases, with best fits for the time constants of ≈4-ps phase and (smaller phase) 7 ps. The closeness of the two time constants implies significant uncertainty in the fit. For simplicity we treat these phases here as a single one.

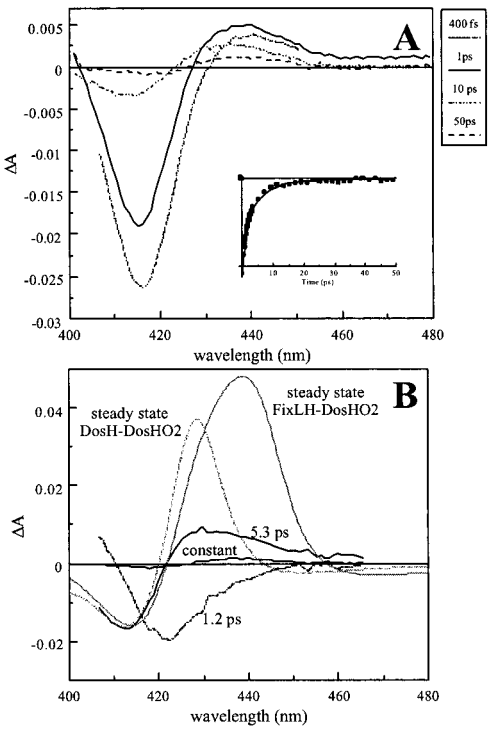


Fig. 5. Recombination of O_2 with DosH. (*A*) Transient absorption spectra at various delay times. (*Inset*) Kinetics (>200 fs) at 415 nm. (*B*) DAS (black lines) of the decay components > 1 ps. The solid gray lines represent the steady-state DosH unliganded minus DosH O_2-liganded (dashed) and FixLH unliganded minus DosH O_2-liganded normalized at ≈415 nm with the 5.3-ps component DAS.

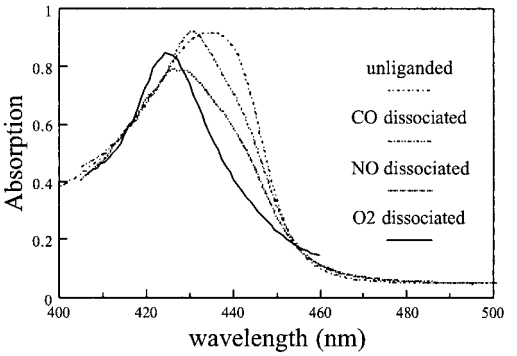


Fig. 6. Absolute absorption spectra of the dissociated species of FixLH, obtained by normalizing the bleaching part of the DAS of the recombination phases (nondecaying, 20-ps, and 4.7-ps phase for CO, NO, and O_2, respectively) on those of the equilibrium difference spectra and adding the DAS to the corresponding absolute spectrum of the liganded form.

4*A Inset*) than in FixLH, where they extend to ≈90% of the signal, as estimated from the ratio of the (integrated) DAS spectra of the 4.5-ps phase and the constant phase.

As for CO and NO, for O_2 the amplitude of the induced absorption part of the DAS of the component ascribed to heme–ligand recombination is low compared with the steady-state spectrum. The relative decrease is ≈3–4-fold, and the effect thus seems stronger in the order CO < NO < O_2. The remaining low-amplitude signal (constant DAS) has a shape that differs both from the 4.7-ps recombination phase and the steady-state difference spectrum in that the bleaching is more to the red (the induced absorption maximum is at ≈440 nm, as in the steady-state difference spectrum). We note that such distortion is not observed for Mb (data not shown) but that a small distortion is observed for the allosteric protein hemoglobin (28).

DosH–O_2. To investigate whether the observed ligand-rebinding properties are specific for oxygen sensors, similar experiments were performed on DosH (Fig. 5), which binds O_2 stronger than FixL (4). The spectral evolution is qualitatively similar for DosH and FixLH (Figs. 4 and 5). In particular, there is a strong 5.3-ps recombination component with a relatively weak induced absorption lobe (see below) and a constant phase with red-shifted characteristics with respect to both the 4.5-ps recombination phase and the steady-state difference spectra. The relative amplitude of the constant phase is very small (3–5% of the 5.3-ps phase; for FixLH, ≈10% for the corresponding amplitude), showing that the oxygen-escape probability from the heme domain is very small. The spectra do not change significantly between 50 ps and 1 ns (not shown).

In the unliganded form of DosH, the heme is six-coordinate; the sixth (oxygen-binding) position is occupied by an internal ligand, which has been shown to be a methionine (35). Therefore, the steady-state difference spectrum (Fig. 5*B*, dashed gray line) differs from that of FixL. At short times after O_2 dissociation, the heme presumably is five-coordinate, and therefore comparison of the early transient spectra with a five-coordinate unliganded minus O_2-liganded spectrum seems more appropriate. Such a spectrum is constructed (Fig. 5*B*, solid gray line) by using the ground-state unliganded FixLH spectrum as a model for the five-coordinate product and published extinction coefficients for unliganded FixL and DosH-O_2 (4, 14). Using this model, the 5.3-ps DAS appears very different from the expected steady-state difference spectrum and qualitatively similar to the transient spectra for FixLH–O_2 (Fig. 4). Similar experiments performed with unliganded and CO- and NO-liganded DosH will be published elsewhere.

Discussion

The present studies on ultrafast ligand dynamics in the heme domains of two oxygen sensors have resulted in two main findings. First, dissociation of oxygen in these proteins leads to heme–O_2 recombination described by a very fast (≈5-ps) and nearly complete phase, on a time scale where no long-range transmission can take place. The recombination with O_2 is much more efficient than heme–NO recombination in the same protein and unprecedented for heme proteins. A near-zero yield of O_2 dissociation from a heme protein has only been observed in the high oxygen-affinity quinol oxidase *bd* (25), but in this case it was ascribed to a low yield of photodissociation rather than a high rate of recombination. Thus, it would seem that in FixL, once oxygen is bound, its probability to escape from the heme pocket is very low.

Second, the spectra obtained preceding recombination are perturbed with respect to the ground-state spectra for all studied ligands and in a particularly strong way for O_2. This observation suggests that intermediate conformations in the switching pathway are generated in this way and that femtosecond techniques can be used to transiently obtain sizeable populations of these intermediates. In the following we will discuss the implications of these findings in more detail.

Significance of Transient Spectra. For all three ligands tested, CO, NO, and O_2, the transient spectra on the picosecond and nanosecond time scale differ from the steady-state (unliganded minus liganded) difference spectra. This difference implies that on this time scale, the heme and its environment have not relaxed yet to the equilibrium unliganded conformation. Because the ligands presumably have not left the protein on this time scale, this might be explained by an influence of the dissociated ligand on the heme environment. However, two arguments indicate that this is not the case. First, the multiphasic dynamics of NO rebinding can be

Table 1. Picosecond decay phases of geminate recombination of three ligand sensors and Mb with different ligands

	CO		NO		O_2	
	Decay, ps	Asymptote	Decay, ps	Asymptote	Decay, ps	Asymptote
CooA*	78 (0.6) 386 (0.3)	0.1	—	—	—	—
Guanylate cyclase†	(0.0)	1.0	7.5 (0.97)	0.03	—	—
FixLH‡	(0.0)	1.0	5.3 (0.62) 20 (0.24) 220 (0.08)	0.06	4.7 (0.90)	0.10
DosH‡	—	—	—	—	5.3 (0.96)	0.04
Mb‡§	(0.0)	1.0	5 (0.53) 50 (0.22) 500 (0.21)	0.04	6.5 (0.15)	0.85

For each ligand, the first column gives the decay phases using (multi)exponential fits with the corresponding relative amplitudes in parentheses, and the second column gives the relative amplitude of the remaining phase.
*Ref. 7.
†Ref. 6.
‡This work.
§Refs. 34 and 36.

understood as a progressive relaxation of the heme–NO interaction (23, 28, 36). The fact that the shape of the transient spectra does not change for the different recombination phases (Fig. 3) indicates that, at least for NO, the position of the dissociated ligand does not influence the heme spectrum strongly. Second, in the oxygen-storage protein Mb the transient spectra on the picosecond time scale are much more similar to the steady-state difference spectra for MbCO (6, 28, 37), MbNO, and MbO_2 (36), whereas, at least for CO dissociation, the ligand is located close to the heme up to the nanosecond time scale (38). By contrast, significant spectral perturbations have been observed after CO and O_2 dissociation from hemoglobin (28), which were interpreted in terms of allosteric interactions between the heme and the protein backbone. In view of these comparisons, and in particular because the spectral distortion is strongest for the physiological effector O_2, we suggest that these distortions reflect an intermediate where, after ligand dissociation, the heme configuration is restrained initially by the long-distance interactions associated with ligand sensing.

Using resonance Raman spectroscopy with nanosecond pulses, Rodgers *et al.* have attributed differences between the unliganded and CO-photodissociated forms of *R. meliloti* FixL to an intermediate after CO dissociation (39). As in our work, this intermediate also showed somewhat different characteristics, because the deoxy species and in particular the Fe–His bond was found to be shorter [a correlation between Fe–His bond length and kinase activity has been suggested (16)]. The observation of a CO-dissociated intermediate species (39) is consistent with the lack of recombination of CO with the heme on the time scale up to a few nanoseconds that we observe (Fig. 2). Our transient absorption spectra of FixLH–CO presumably correspond to the same intermediate, and our time resolution also permits observation of the corresponding intermediates for NO and O_2 dissociation, which, in view of the fast recombination processes, are hardly accessible on the nanosecond time scale.

To characterize these intermediate states, we have attempted to construct their absolute absorption spectra in the Soret region (Fig. 6) for normalization, making use of the fact that the bleaching lobes of the transient spectra overlap well with those of the equilibrium spectra. With respect to the equilibrium nonliganded spectrum (maximum 435 nm), the intermediate spectra, with maxima at 431 (CO), 427 (NO), and 424 nm (O_2) all are shifted in the direction of the initial bound form. As noted above, the deviation is strongest for O_2, the physiological ligand. Comparison of the structures of the O_2 and NO-bound forms of *B. japonicum* FixLH (ref. 12; a structure for the CO-bound form is not available) may help to understand this feature. The (heme-bound) O_2 is stabilized on the distal side by a hydrogen bond to Arg-220, whereas this residue is turned away from the heme pocket when NO is bound [and presumably in the reduced unliganded form, which is available only for *R. meliloti* FixLH (16)]. This hydrogen bond may keep O_2 close to the heme after dissociation, thus limiting heme conformational changes associated with the spin change and, in addition, favoring the recombination of oxygen with the heme, which proceeds with unprecedented efficiency (see below). Whereas the signal mechanism may be somewhat different for *B. japonicum* FixL and *R. meliloti* FixL (16), our observations on *B. japonicum* FixLH are in general agreement with the modeling result on the deoxy–*R. meliloti* FixLH structure, indicating that O_2 cannot be accommodated in the heme pocket without serious conformational changes in the protein (16).

The above reasoning may explain the strong spectral effect on O_2 as compared with NO and may be relevant for the sensing mechanism. However, we note that in MbO_2, where severe spectral distortions are not observed in the time-resolved spectra, O_2 is stabilized also by a hydrogen bond (40, 41) to a distal histidine. Therefore, and because distortions in FixLH are observed also for the other ligands, additional constraints on the heme, not present in Mb, must be present after dissociation of all three ligands. These constraints may be imposed by the propionates, which have been proposed to play an important role in the signal-transduction mechanism (12, 16, 39). From the changes in the Soret band alone one cannot directly deduce the associated structural changes, but our results demonstrate that they are present on the picosecond time scale for all ligands and suggest strongly that they are much stronger for O_2, and to a lesser extent for NO, than for CO. Structural characterization of these intermediates will be addressed by vibrational spectroscopic studies with picosecond time resolution.

We note that similar perturbations were observed for the DosH–O_2 complex. This indicates that, whereas the signal-transduction pathway has been proposed to be very different in Dos (4) and involves a distal methionine, constraints on the heme also play a regulatory role in the primary signal-transduction interactions.

Fast Geminate Recombination and Sensors. Geminate recombination of ligands has now been studied for heme-based sensors specific for three different physiological ligands: NO [mammalian GC (6)], CO

[CooA from *R. rubrum* (7)], and O_2 (FixL and Dos, present work). The suggested mechanisms for signal transduction from the ligand-binding site to the regulated domain vary strongly between the different sensor proteins (see the introduction). Table 1 summarizes the main picosecond kinetic phases for these studies and compares them with Mb. A striking feature is that for all sensors, the rates and yields of geminate recombination are particularly high for the physiological ligand. In these sensors, the geminate recombination takes place from a heme environment very different from the nonliganded state. Thus it seems that as a general feature, the "off" (ligand-bound) configuration favors fast recombination once the iron–ligand bond is broken.

On the other hand, the overall ligand-binding rates k_{on} are low for FixL and Dos and presumably also for CooA,[§] giving rise to a relatively low affinity. Thus, for these heme sensors, a picture emerges where a high barrier of ligand binding to the heme in the "on" (unliganded) state is combined with a high initial barrier of ligand escape after dissociation from the off state. For those dissociated ligands that have overcome this initial escape barrier (≈10% for FixLH), the recombination probability is low (we observed no further rebinding up to the nanosecond time scale), suggesting that the binding barrier determining the low k_{on} is in place and that some conformational change in the heme pocket toward the on state already occurs on the picosecond time scale. Our observation of different transient spectral shapes associated with the ≈5-ps recombination phase and the remaining phase is in agreement with this suggestion. These features are summarized in Fig. 7 for FixL. Altogether, it appears that in these sensor proteins, the heme pocket acts as a bi-stable switch that is protected from rapid fluctuations in both the on and off states.

The above general reasoning has many points in common for the environmental ligand-concentration sensors FixL and Dos (O_2) and CooA (CO). The NO receptor GC also displays fast and efficient rebinding of NO, but the NO binding rate (k_{on}) is very high (43),

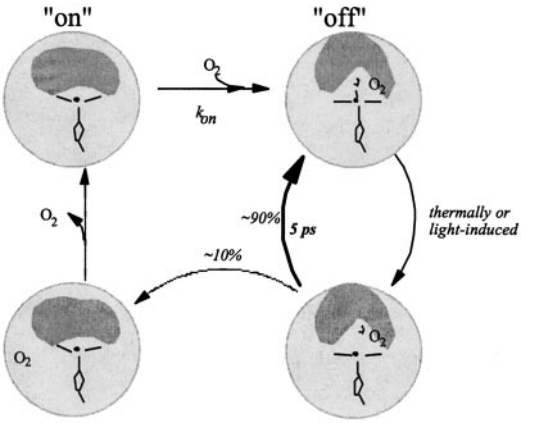


Fig. 7. Schematic view of O_2 binding and dissociation in FixL. The hatched circle represents the protein, and the inner gray area represents the heme environment involved in signal transduction. The right-hand conformations correspond to the off state, and the left-hand conformations correspond to the on state. There is a high barrier for ligand binding to the heme in the on state and a high initial barrier for ligand escape after dissociation from the off state, a feature that seems common for heme-based sensors.

and in the absence of external effectors, the k_{off} is very low (6, 44). This finding is in agreement with the fact that NO is a locally produced messenger molecule that is highly reactive in solution, thus requiring a very high-affinity receptor.

Outlook. The possibility to synchronize ligand dissociation events by photolysis on a femtosecond time scale makes ultrafast spectroscopy a unique tool to study the ligand on → off regulation in heme-based sensors. The low yield of photodissociation of O_2 from FixLH and DosH after a few picoseconds will present a major challenge for attempts to resolve the dynamics of the signal through the heme domain by using time resolved vibrational spectroscopy methods. Therefore, such studies will have to be combined with those using other ligands and with the full-length catalytic domain containing protein, which may exert strain on the heme domain.

[§]The k_{on} for CO binding to CooA has been measured only by determining the bimolecular recombination after flash photolysis under conditions where the heme remained five-coordinated and was found to be in the range of 1–30 × 10^6 M^{-1}·s^{-1} (42). Presumably, the binding rate will be much lower when the heme is six-coordinate, as in equilibrium nonliganded CooA.

1. Aano, S., Nakajima, H., Saito, K. & Okada, M. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228,** 752–756.
2. Shelver, D., Kerby, R. L., He, Y. & Roberts, G. P. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94,** 11216–11220.
3. Gilles-Gonzales, M. A., Ditta, G. S. & Helinski, D. R. (1991) *Nature (London)* **350,** 170–172.
4. Delgado-Nixon, V. M., Gonzales, G. & Gilles-Gonzales, M. A. (2000) *Biochemistry* **39,** 2685–2691.
5. Gilles-Gonzales, M. A., Gonzales, G. & Perutz, M. F. (1995) *Biochemistry* **34,** 232–236.
6. Négrerie, M., Bouzhir-Sima, L., Martin, J.-L. & Liebl, U. (2001) *J. Biol. Chem.* **276,** 46815–46821.
7. Kumazaki, S., Nakajima, H., Sakaguchi, T., Nakagawa, E., Shinahara, H., Yoshihara, K. & Aano, S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 38378–38383.
8. Perutz, M. F., Paoli, M. & Lesk, A. M. (1999) *Chem. Biol.* **6,** R291–R297.
9. Rodgers, K. R. (1999) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3,** 158–167.
10. Pellequer, J.-L., Brudler, R. & Getzoff, E. D. (1999) *Curr. Biol.* **9,** R416–R418.
11. Tuckerman, J. R., Gonzales, G., Dioum, E. M. & Gilles-Gonzales, M. A. (2002) *Biochemistry* **41,** 6170–6177.
12. Gong, W., Hao, B. & Chan, M. K. (2000) *Biochemistry* **39,** 3955–3962.
13. Tamura, K., Nakamura, H., Tanaka, Y., Oue, S., Tsukamoto, K., Nomura, M., Tsuchiya, T., Adachi, S., Takahashi, S., Iizuka, T. & Shiro, Y. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118,** 9434–9435.
14. Gilles-Gonzales, M. A., Gonzales, G., Perutz, M. F., Kiger, L., Marden, M. C. & Poyart, C. (1994) *Biochemistry* **33,** 8067–8073.
15. Gong, W., Hao, B., Mansy, S. S., Gonzales, G., Gilles-Gonzales, M. A. & Chan, M. K. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95,** 15177–15182.
16. Miyatake, H., Mukai, M., Park, S.-Y., Adachi, S., Tamura, K., Nakamura, H., Nakamura, K., Tsuchiya, T., Iizuka, T. & Shiro, Y. (2000) *J. Mol. Biol.* **301,** 415–431.
17. Regensburger, B. & Hennecke, H. (1983) *Arch. Microbiol.* **135,** 103–109.
18. Miller, J. H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics* (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY).
19. Hahn, M. & Hennecke, H. (1984) *Mol. Gen. Genet* **193,** 46–52.
20. Lukat-Rodgers, G. S. & Rodgers, K. R. (1997) *Biochemistry* **36,** 4178–4187.
21. Rodgers, K. R., Lukat-Rodgers, G. S. & Tang, L. (2000) *J. Biol. Inorg. Chem.* **5,** 642–654.
22. Tomita, T., Gonzales, G., Chang, A. L., Ikeda-Saito, M. & Gilles-Gonzales, M. A. (2002) *Biochemistry* **41,** 4819–4826.
23. Martin, J.-L. & Vos, M. H. (1994) *Methods Enzymol.* **232,** 416–430.
24. Liebl, U., Lambry, J.-C., Leibl, W., Breton, J., Martin, J.-L. & Vos, M. H. (1996) *Biochemistry* **35,** 9925–9934.
25. Borisov, V. B., Liebl, U., Rappaport, F., Martin, J.-L., Zhang, J., Gennis, R. B., Konstantinov, A. A. & Vos, M. H. (2002) *Biochemistry* **41,** 1654–1662.
26. Winkler, W. C., Gonzales, G., Wittenberg, J. B., Hille, R., Dakappagari, N., Jacob, A., Gonzales, L. A. & Gilles-Gonzales, M. A. (1996) *Chem. Biol.* **3,** 841–850.
27. Vos, M. H., Lambry, J.-C. & Martin, J.-L. (2000) *J. Chin. Chem. Soc. (Taipei)* **47,** 765–768.
28. Petrich, J. W., Poyart, C. & Martin, J.-L. (1988) *Biochemistry* **27,** 4049–4060.
29. Franzen, S., Kiger, L., Poyart, C. & Martin, J.-L. (2001) *Biophys. J.* **80,** 2372–2385.
30. Rodgers, K. R., Tang, L., Lukat-Rodgers, G. S. & Wengenack, N. L. (2001) *Biochemistry* **40,** 12932–12942.
31. Petrich, J. W., Lambry, J.-C., Kuczera, K., Karplus, M., Poyart, C. & Martin, J.-L. (1991) *Biochemistry* **30,** 3975–3978.
32. Petrich, J. W., Lambry, J.-C., Balasubramanian, S., Lambright, D. G., Boxer, S. G. & Martin, J.-L. (1994) *Biochemistry* **238,** 437–444.
33. Carlson, M. L., Regan, R., Elber, R., Li, H., Phillips, G. N., Jr., Olson, J. S. & Gibson, Q. H. (1994) *Biochemistry* **33,** 10597–10606.
34. Walda, K. N., Liu, X. Y., Sharma, V. S. & Magde, D. (1994) *Biochemistry* **33,** 2198–2209.
35. Gonzalez, G., Dioum, E. M., Bertolucci, C. M., Tomita, T., Ikeda-Saito, M., Cheesman, M. R., Watmough, N. J. & Gilles-Gonzalez, M. A. (2002) *Biochemistry* **41,** 8414–8421.
36. Négrerie, M., Berka, V., Vos, M. H., Liebl, U., Lambry, J.-C., Tsai, A.-L. & Martin, J.-L. (1999) *J. Biol. Chem.* **274,** 24694–24702.
37. Reynolds, A. H. & Rentzepis, P. M. (1982) *Biophys. J.* **38,** 15–18.
38. Šrajer, V., Teng, T., Ursby, T., Pradervand, C., Ren, Z., Adachi, S., Schildkamp, W., Bourgeois, D., Wulff, M. & Moffat, K. (1996) *Science* **274,** 1726–1729.
39. Rodgers, K. R., Lukat-Rodgers, G. S. & Tang, L. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121,** 11241–11242.
40. Phillips, S. E. V. (1980) *J. Mol. Biol.* **42,** 531–554.
41. Springer, B. A., Sligar, S. G., Olson, J. S. & Phillips, G. N., Jr. (1994) *Chem. Rev.* **94,** 699–714.
42. Uchida, T., Ishikawa, H., Takahashi, S., Ishimori, K., Morishima, I., Ohkubo, K., Nakajima, H. & Aano, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **32,** 19988–19992.
43. Zhao, Y., Brandish, P. E., Ballou, D. P. & Marletta, M. A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96,** 14753–14758.
44. Brandish, P. E., Buechler, W. & Marletta, M. A. (1998) *Biochemistry* **37,** 16989–16907.

2.Article II

Ligand Binding Dynamics to the Heme Domain of the OxygenSensor Dos from *Escherichia coli*

Ursula Liebl, Latifa Bouzhir-Sima, Laurent Kiger, Michael C. Marden, Jean-Christophe Lambry, Michel Négrerie, and Marten H. Vos

***Biochemistry* 2003, 42: 6527-6535**

Ligand Binding Dynamics to the Heme Domain of the Oxygen Sensor Dos from *Escherichia coli*

Ursula Liebl,[‡] Latifa Bouzhir-Sima,[‡] Laurent Kiger,[§] Michael C. Marden,[§] Jean-Christophe Lambry,[‡] Michel Négrerie,[‡] and Marten H. Vos*[,‡]

Laboratory for Optical Biosciences, INSERM U451, CNRS UMR 7645, Ecole Polytechnique-ENSTA, 91128 Palaiseau Cedex, France, and INSERM U473, 84 rue de General Leclerc, 94276 Le Kremlin Bicètre Cedex, France

Received December 13, 2002; Revised Manuscript Received March 13, 2003

ABSTRACT: In the heme-based oxygen sensor Dos from *Escherichia coli*, one of the axial ligands (Met 95) of a six-coordinate heme can be replaced by external ligands such as O_2, NO, and CO, which causes a switch in phosphodiesterase activity. To gain insight into the bidirectional switching mechanism, we have studied the interaction of ligands with the sensor domain DosH by flash photolysis experiments with femtosecond time resolution. The internal ligand can be photodissociated from the ferrous heme and recombines with time constants of 7 and 35 ps. This is somewhat slower than recombination of the external ligands NO, with which picosecond rebinding occurs with unprecedented efficiency (>99%) with a predominant phase of ∼5 ps, and O_2 (97% in 5 ps, Liebl, U., Bouzhir-Sima, L., Négrerie, M., Martin, J.-L., and Vos, M. H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99*, 12771−12776). Dissociated CO displays geminate rebinding in 1.5 ns with a very high yield (60%). Together these results indicate that the heme environment provides a very tight pocket for external ligands, presumably preventing frequent switching events. Additional CO dissociation and rebinding experiments on a longer time scale reveal that (a) Met 95 binding, in 100 μs, occurs in competition with bimolecular CO binding, and (b) subsequent replacement of Met 95 by CO on the millisecond time scale occurs faster than in rapid-mixing experiments, suggesting a slow further relaxation. A minimal ligand binding model is proposed that suggests that Met 95 displacement from the heme is facilitated by the presence of an external ligand in the heme environment. Furthermore, the orders of magnitude difference between Met 95 binding after dissociation of internal and external ligands, as well as the spectral characteristics of photodissociation intermediates, indicate substantial rearrangement of the heme environment associated with ligand sensing. Further remarkable observations include evidence for stable (>4 ns) photooxidation of six-coordinate ferrous heme, with a quantum yield of 4−8%.

Sensors of gaseous ligands initiate cascades of regulatory events involved in adaptation to changes in the environmental gas concentration. In recent years, a class of heme sensors has been characterized in which binding to and dissociation of small ligands, essentially carbon monoxide (CO) and oxygen (O_2), trigger molecular switches that eventually lead to modification of gene expression levels. The best-studied example is the rhizobial oxygen sensor FixL, which consists of a heme-binding PAS domain FixLH, and a histidine kinase domain (*1*−*5*). The activity of the latter domain is inhibited by binding of O_2 (and to a lesser extent CO and NO (*6*)) to the PAS domain. Here the heme is five-coordinate in the unliganded state, with histidine as the sole axial ligand, and six-coordinate when external ligands are bound (*1*, *7*−*11*). These features are the same as in the oxygen-storage protein myoglobin, but the ligand-binding properties of the two proteins are quite different. For instance, in FixL the O_2 affinity is much lower (*7*) and the exchange between protein-bound and solvent O_2 is much slower than in myoglobin, making it function as a "bistable switch" (*12*) in agreement with its function as a sensor.

Recently, Delgado-Nixon and co-workers (*13*) reported the characterization of DosH, a heme-binding PAS protein from *Escherichia coli* that has 60% sequence homology with FixLH, but is associated with a phosphodiesterase rather than a kinase regulatory domain. The functional role of this protein was also proposed to be oxygen sensing (*13*). Interestingly, despite the strong homology between FixLH and DosH, the heme coordination was found to be different. In all steady-state forms, the heme is six-coordinate, like in the CO-sensor protein CooA from *Rhodospirillum rubrum* (*14*, *15*) and a number of recently discovered hemoglobins with mostly yet uncertain function (*16*−*18*). For DosH, in the absence of external ligands, a methionine (Met 95) was proposed (*13*), and subsequently shown (*19*, *20*), to act as a second axial ligand. Thus, molecular oxygen must displace Met 95, and the transfer of the sensing perturbation is presumably different from that in FixL. Very recently, further spectroscopic and biochemical characterization studies of the Dos heme domain as well as the whole protein have been reported (*19*−*22*). In particular, in the full-length protein, apart from O_2, the activity of the regulatory domain was found to be

* Corresponding author. Phone: 33 1 69334777. Fax: 33 1 69333017. E-mail: Marten.Vos@polytechnique.fr.
‡ INSERM U451, CNRS UMR 7645, Ecole Polytechnique-ENSTA.
§ INSERM U473.

10.1021/bi027359f CCC: $25.00 © 2003 American Chemical Society
Published on Web 05/08/2003

influenced to a certain extent by CO and NO, and strongly by the oxidation state of the heme, which led to the suggestion that Dos might act as a redox sensor (*22*). The determination of a crystal structure of the heme domain is underway (*23*).

To understand the functioning of the sensing process, i.e., the pathway by which the perturbation induced by association or dissociation of oxygen is transferred within the heme domain, and the way different ligands are discriminated, intermediates in this process must be characterized. A powerful way to achieve this in heme proteins is to use time-resolved studies, in which the ligand dissociation reaction is synchronized by photodissociation from the heme. Using femtosecond absorption spectroscopy, we have indeed reported spectral evidence for intermediate heme-environment conformations after dissociation of ligands, and in particular O_2 from FixLH (*12*). In addition, the kinetics for CO and NO were myoglobin-like, but for O_2 extremely fast (~5 ps) and efficient (90%) rebinding was observed, which led us to propose that the heme environment acts as a ligand-specific trap. Even more efficient heme−O_2 recombination was observed for DosH (*12*). Here we report femtosecond to nanosecond spectroscopic studies of dissociation and rebinding of the external ligands CO and NO, and the internal ligand Met 95, with DosH. Evidence for a very closed heme pocket was found from the relatively pronounced geminate recombination for CO and NO. The study was complemented with measurement of bimolecular binding of CO on a longer time scale. The ensemble of results, including in certain aspects unusual properties, is discussed in the context of the function of the protein.

MATERIALS AND METHODS

The heme-containing Dos PAS domain from *E. coli* was expressed and purified as described (*12*). All samples were prepared in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4. For the ultrafast measurements, gastight optical cells with an optical path length of 1 mm were used, and the protein concentration was adjusted to ~60 μM. The degassed as-prepared (ferric) sample was reduced with excess sodium dithionite to obtain the reduced nonliganded form (deoxy). To obtain the carbonmonoxy form, the deoxy form was equilibrated with 1 atm CO. To obtain the nitrosyl form, ferric DosH was reduced with 25 mM dithiothreitol and subsequently equilibrated with 0.1 atm NO. The reduction and ligandation of the different forms were monitored by the visible absorption spectrum, using a Shimadzu UV−Vis 1601 spectrophotometer.

Multicolor femtosecond absorption spectroscopy, using 30-fs pump pulses centered at 563 nm and white light continuum probe pulses, and data analysis in terms of decay associated spectra (DAS) were performed as described (*12*). The laser repetition rate was 30 Hz. The beams were focused to ~50 μm (illumination volume ~2 nL) and the sample was continuously moved perpendicular to the beams to ensure sample renewal between shots. The pulse energy was adapted to excite ~20% of the illumination volume. All experiments were carried out at room temperature.

CO bimolecular recombination kinetics in the micro- and millisecond time range were measured at a detection wavelength of 436 nm, after flash photolysis with 10 ns YAG laser pulses of 160 mJ at 532 nm (Quantel, France). For these measurements, degassed dithionite-reduced samples were equilibrated under CO at various concentrations in 1- or 4-mm optical cells. For each curve, at least 10 measurements were averaged, with at least 4 s between photolysis pulses to allow sample recovery.

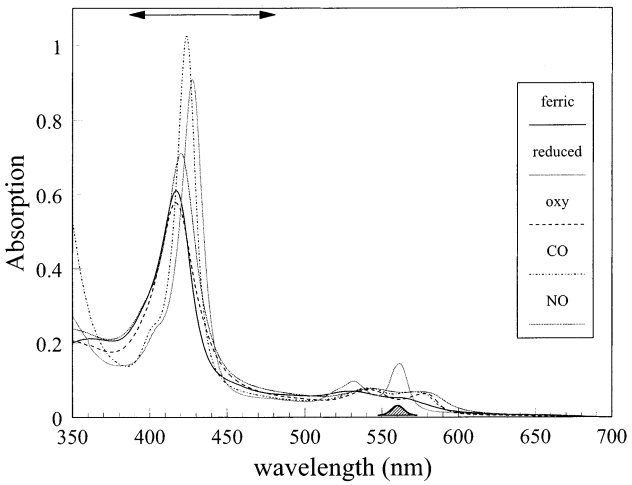


FIGURE 1: Ground-state absorption spectra of the different forms of DosH used in this study. The spectra are normalized to the same concentration. The spectral profile of the pump pulse and the probe region in the transient absorption experiments are indicated by the shaded area at the bottom and the bisided arrow, respectively.

The family of normalized curves was fitted together, with the same microscopic rate constants k_{CO}, k_{-CO}, k_M, and k_{-M} and ratio for differential extinction coefficients of the different transient species involved, to a model taking into account competitive binding of internal and external ligands (see Appendix). The fit function was calculated by numerical integration (MicroMath Scientist, Salt Lake City, UT) of equation (A2), under the conditions [Fe] = 1, [FeCO] = [FeMet95] = 0 at $t = 0$, and weighting the resulting population dynamics with the corresponding extinction coefficients.

RESULTS AND INTERPRETATION

Steady-state absorption spectra for the different ligation and redox states of DosH used in this study are shown in Figure 1, along with the spectrum of oxy-DosH (*12*). The spectra are very similar to those published previously (*13*, *22*) and reflect that for all states the steady-state configuration of the heme is six-coordinate (*20*, *21*). Thus, five-coordinate spectra for the heme in DosH are not directly available. In the following, transient spectra obtained after photodissociation of ligands will be presented and discussed. As a model for five-coordinate spectra, the ferric and ferrous unliganded spectra of FixLH (*7*, *12*) will be used to generate "steady-state" difference spectra for comparison. The Soret band of deoxy FixLH is very close to that of the DosH Met95 → Ile mutant (*1*, *19*), and similarly the generated FixLH unliganded *minus* DosH CO-liganded difference spectrum (see Figure 4 below) is very similar to the published M95I DosH deoxy *minus* CO-liganded spectrum (*19*), indicating that this approach is reasonable. The time-resolved measurements consist of excitation of the heme in its lowest lying transition (α band) and probing the excited state and ligand rebinding kinetics in the Soret band (Figure 1).

Ferric DosH. Figure 2A shows transient spectra at various delay times after excitation of ferric DosH. At short delay

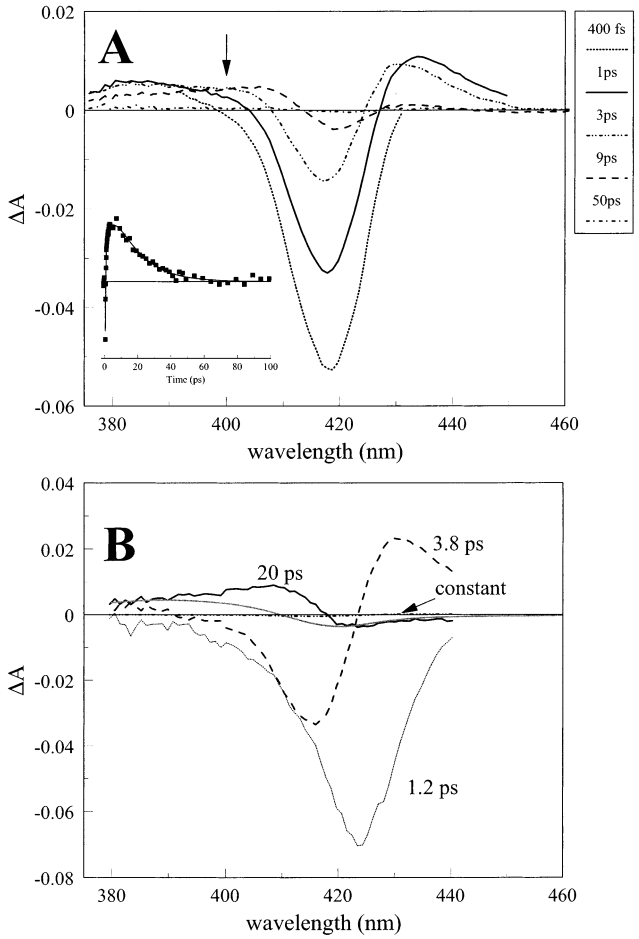


FIGURE 2: Photophysics and ligand rebinding in ferric DosH. (A) Transient absorption spectra at various delay times. (B) Decay-associated spectra of the decay components >1 ps. The solid gray line represents the steady-state FixLH minus DosH difference spectrum for the respective ferric forms, normalized on the bleaching part of the 20-ps DAS. Inset in A: kinetics at 400 nm (t > 400 fs).

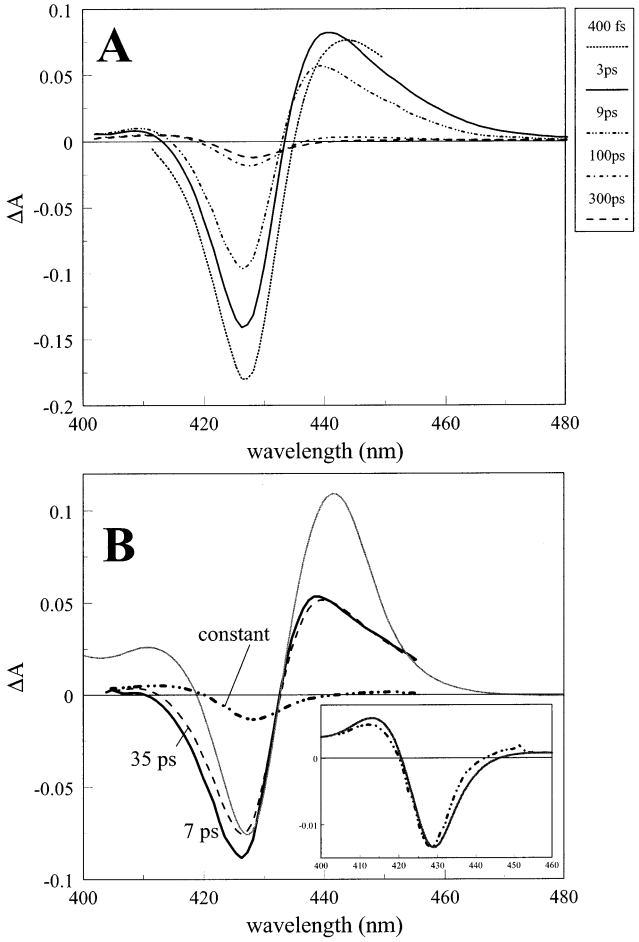


FIGURE 3: Photophysics and ligand rebinding in reduced DosH. (A) Transient absorption spectra at various delay times. (B) Decay-associated spectra of the decay components >3 ps. The solid gray line represents the steady-state FixLH minus DosH difference spectrum, for the respective reduced unliganded forms, normalized on the bleaching part of the 35-ps DAS. Inset: comparison of the constant phase (dash−dotted line) with the steady-state DosH oxidized minus reduced-unliganded spectrum (grey solid line), normalized at the bleaching part.

times, the spectra are dominated by the bleaching of the ground-state Soret band at ~418 nm and increased absorption at both the red and blue side of this band. The major part of the bleaching, and the red-side increased absorption, decay in a few picoseconds (see Figure 2B for an analysis in terms of DAS). Therefore, they can be ascribed to decaying excited states (cf. refs *12* and *24*).

The remaining spectrum (9-ps spectrum in Figure 2A) is characterized by a small bleaching around 420 nm and a broad increased absorption at the blue side, extending to below 380 nm. This spectrum decays to 0 with a time constant of 20 ps (Figure 2B). The characteristics of this phase are not indicative of excited states, which invariably display red induced absorption and decay faster (*25*). As the Soret absorption of five-coordinated ferric forms is at higher energy than the six-coordinated forms (*26*), a blue-shifted spectrum is consistent with dissociation of an axial ligand from the heme. Therefore, we suggest that the bond between the heme and Met 95 is dissociated in a fraction of the excited hemes. The 20-ps DAS is indeed roughly similar in shape to the steady-state five (FixLH) minus six (DosH)-coordinated difference spectrum (Figure 2B). The overall blue shift appears less extensive, however, possibly indicating a loosening rather than dissociation of the bond, or otherwise incomplete heme relaxation after dissociation. The disrupted bond is reestablished with a time constant of 20 ps.

Deoxy-DosH. Excitation of ferrous deoxy-DosH leads to spectral changes that are dominated by a strong red shift on the time scale up to ~100 ps (Figure 3A). Global analysis reveals several decay phases on the subpicosecond (not shown) and picosecond time scale (Figure 3B). The faster decay phases, with time constants of ~0.55 and ~2.3 ps (not shown), presumably reflect excited-state decay (*27*, *28*). The (red-shift) shape of the transient spectra remaining after the decay of these phases indicates the dissociation of an internal ligand from the heme. Indeed, the DAS of the picosecond decay phases (see below) shows resemblance with the steady-state FixLH (five-coordinate) minus DosH spectrum (Figure 3B). Therefore, these decay phases should reflect rebinding of the dissociated sixth ligand Met 95. The shape of the DAS is somewhat perturbed with respect to the model steady-state difference spectra; in particular, the induced absorption is relatively weak. This feature is also observed upon the dissociation of external ligands (see below and Discussion).

Using a multiexponential decay model, we found decay phases with time constants of 7 and 35 ps and very similar

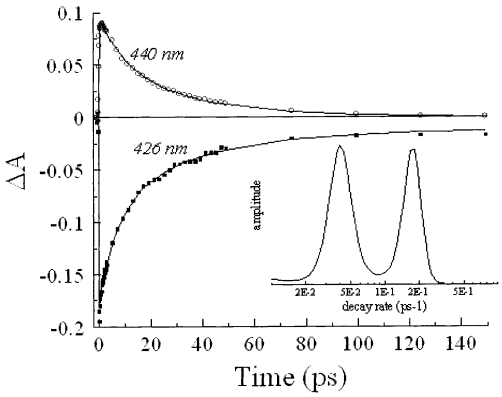


FIGURE 4: Transient kinetics of reduced DosH at 426 nm (lower trace) and 440 nm (upper trace). Inset: rate distribution obtained from a maximum entropy analysis of the 426-nm kinetics.

spectral properties (Figures 3B and 4), strongly indicating that they reflect the same process (i.e., methionine rebinding to heme). To discriminate between true biexponential decay and a distribution of decay rates, we also performed a kinetic analysis with a maximum entropy method (*29*) and found two clearly distinct rates (inset Figure 4). This strongly suggests that recombination occurs from two distinct conformations of the heme environment.

Intriguingly, after these decay phases, the ensemble of proteins has not returned to the initial six-coordinate state, as would be expected after recombination with an internal ligand. A small but significant spectral change persists (300-ps spectrum in Figure 3A) and does not decay within 4 ns (data not shown). This change has spectral characteristics that are very different from those of the picosecond decay phases: it consists of a *blue* shift rather than a red shift, implying that it does not reflect five-coordinate heme. Moreover, it cannot reflect a thermally excited heme, since (a) this would give rise to a red shift, and (b) the Soret band is known to be relatively temperature insensitive (*27*, *30*). The most likely candidate for a blue-shifted heme is ferric heme. The inset in Figure 3B shows that the long-lived spectral component corresponds remarkably well to a steady-state oxidized *minus* reduced difference spectrum of (six-coordinate) DosH. Therefore, we assign this feature to photooxidation of the heme. Assuming the 7- and 35-ps phases together represent 100% recombination of the methionine, and using the steady-state reduced-unliganded FixLH *minus* DosH and DosH oxidized *minus* reduced spectra as model spectra, we estimate that the quantum yield of the heme oxidation is 4−8% (depending on the normalization of the FixLH minus DosH spectrum and the DAS of the 7- and 35-ps phases). It remains to be determined whether intraprotein charge recombination occurs on a time scale >4 ns. We note that our experimental conditions (sample renewal between shots, low excitation energy, and excess reductant) prevent net photooxidation of the sample.

DosH−NO. As with other ligation states, excitation of DosH−NO leads to spectral changes on the time scale of ~1 ps that can be ascribed to excited state dynamics. On the time scale >3 ps the shape of the spectra does not change (Figure 5) and presumably reflects NO-dissociated heme. Comparison with the steady-state difference spectra indicates that the heme is five-coordinate, rather than six-coordinate, but the transient spectra are perturbed somewhat with respect

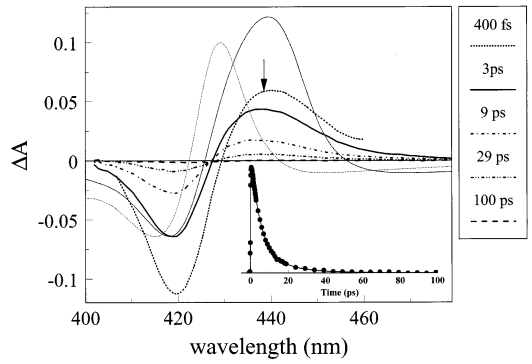


FIGURE 5: Ligand rebinding of NO with DosH. Transient absorption spectra at various delay times are shown. The gray lines represent the steady-state DosH unliganded minus DosH NO-liganded (dashed) and FixLH unliganded minus DosH NO-liganded (solid) spectra normalized on the bleaching part of the 3-ps transient spectrum. Inset: kinetics at the induced aborption maximum (438 nm).

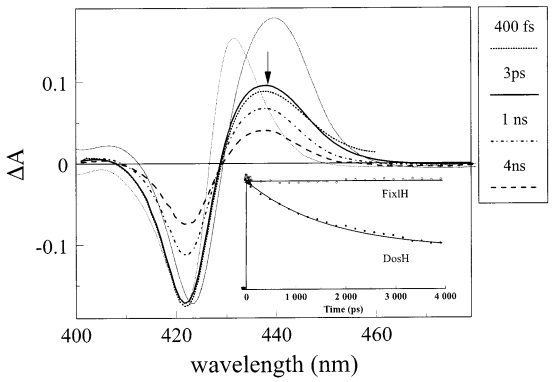


FIGURE 6: Ligand rebinding of CO with DosH. Transient absorption spectra at various delay times are shown. The gray lines represent the steady-state DosH unliganded minus DosH CO-liganded (dashed) and FixLH unliganded minus DosH CO-liganded (solid) spectra normalized on the bleaching part of the 3-ps transient spectrum. Inset: kinetics at the induced absorption maximum (438 nm) compared to the corresponding kinetics of FixLH−CO (439 nm).

to the "model" steady-state FixLH unliganded minus DosH NO-liganded difference spectrum, as observed previously, in a stronger way, for O_2 dissociation from DosH (*12*).

In DosH, NO rebinds to the heme in an extremely fast and efficient way (Figure 5, inset). As in most ligand-binding heme proteins (*12*, *31*−*34*), the recombination of NO with the heme was found to be nonexponential. Global analysis in terms of a multiexponential decay model resulted in time constants of 5 ps (85%) and 20 ps (15%) with very similar spectral characteristics (not shown), whereas the overall decay amounts to >99%. Thus, rebinding of NO occurs significantly faster than rebinding of the internal ligand methionine (see above). Also, the efficiency of NO rebinding on the picosecond time scale is higher than that reported for all other heme proteins, including the NO receptor guanylate cyclase (97% of monoexponential rebinding in 7.5 ps) (*35*).

DosH−CO. Transient spectra after dissociation of CO from DosH are shown in Figure 6. Small spectral evolutions take place on the time scale of a few picoseconds and less; these are presumably related to excited-state dynamics (*27*). The transient spectra on the picosecond time scale indicate formation of CO-dissociated heme. As with the NO-bound and deoxy transient spectra, the transient spectra are perturbed somewhat with respect to the "model" steady-state

Table 1: Decay Phases of Geminate and Internal Ligand Recombination of Different Redox and Ligation Forms of DosH[a]

	decay phase	rel. ampl.	assignment
ferric	20 ps		rebinding of a fraction of dissociated Met 95
deoxy	7 ps	0.53	rebinding of dissociated Met 95
	35 ps	0.47	
	>4 ns		partial heme oxidation
CO	1.5 ns	0.60	geminate recombination
	>4 ns	0.40	CO escape from protein
NO	5 ps	0.85	geminate recombination
	20 ps	0.15	
	>4 ns	0	
O_2[b]	5.3 ps	0.96	geminate recombination
	>4 ns	0.04	O_2 escape from protein

[a] Asymptotic phases in the ultrafast experiments are indicated as ">4 ns". [b] Ref *12*.

FixLH unliganded *minus* DosH CO-liganded difference spectrum (see Discussion).

No significant further spectral evolution takes place on the time scale up to a few hundred picoseconds, but on the nanosecond time scale substantial decrease of the signal is observed. This contrasts with the situation in most other heme proteins, and in particular in FixLH, where geminate rebinding of CO usually does not or hardly occur. Our data can be fit with a single-exponential decay with a time constant of 1.5 ns and amplitude of ~60% (the remaining 40% decays on a time scale beyond the temporal window of the pump−probe apparatus, see below). The *shape* of the transient spectrum does not change up to 4 ns, which implies that the coordinating of the CO-dissociated hemes does not change up to this time, consistent with nanosecond resonance Raman data (*20*).

In recent transient resonance Raman data on DosH, no indication for CO rebinding was found up to 1 ns (*20*). We are able to assess significant decay on this time scale (Figure 5, inset) due to the longer time window and possibly the higher signal-to-noise ratio allowed with transient absorption measurements. Our finding of 60% geminate recombination of CO with the heme implies that the *quantum yield* of CO diffusion out of the protein upon photodissociation does not exceed 40%. We note that multiple excitations within a flash longer than the 1.5 ns recombination time allow higher yields *per flash*. Indeed, Gonzalez and co-workers (*19*), using intense 6-ns flashes, reported as much as 80% CO dissociation on the microsecond time scale.

The ensemble of picosecond−nanosecond kinetic data on ligand rebinding in DosH is summarized in Table 1.

Microsecond Spectroscopy of DosH−CO. The heme rebinding kinetics upon photodissociation of CO from DosH on a longer time scale, monitored at 436 nm, are shown in Figure 7. They exhibit a typical biphasic pattern, with the rates of the fast (~100 μs) and the slow (millisecond) phases depending moderately and strongly, respectively, on the CO concentration. The relative amplitude of the fast phase increases with increasing CO concentration. Therefore, we assign this phase to competitive binding of the internal (Met 95) and external (CO) ligands; the overall rate involving the sum of the ligand association rates. This assignment differs somewhat from that of Gonzalez and co-workers (*19*), based on similar experiments on a more limited time window. They

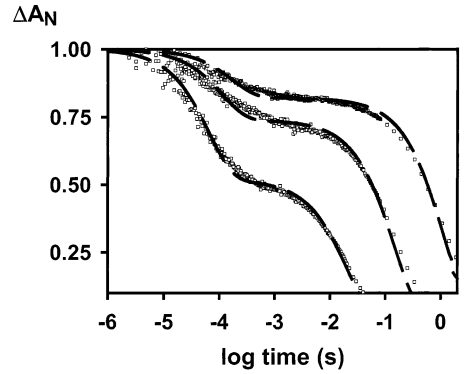


FIGURE 7: Normalized transient absorption after CO dissociation from DosH on the microsecond to second time scale, monitored at $\lambda = 436$ nm. The CO concentration in the measuring solution was 10 μM (upper), 100 μM (middle), and 1 mM (lower). Note that for hexacoordinate globins, the observed external ligand affinity K_{CO} at equilibrium depends on the competition with the internal ligand and therefore $K_{CO}(M^{-1}) = (k_{CO}/k_{-CO})/(1 + k_M/k_{-M})$.

attributed a phase of ~80 μs only to binding of the internal ligand, as the amplitude was reported to be independent of the CO concentration at the detection wavelength of 425 nm. The proximity of this wavelength to the isosbestic point between CO and methionine binding to the heme (*19*) and the fact that the slower, millisecond phase, was not recorded in these experiments presumably have prevented the assessment of a dependence of the amplitude of this phase, as clearly observed in the present work.

The millisecond phase, which is strongly CO concentration-dependent, is assigned to replacement of methionine by CO as the sixth heme ligand. The family of curves could be reasonably fitted together with the same rate constants k_{CO}, k_M, and k_{-M} (see Appendix, for low values of k_{-CO}, the fit is independent of this parameter) using the model, and the kinetic parameters of Figure 8A. The best simulation gives a value of 0.77 ± 0.05 for the ratio $\alpha_{436} = (\epsilon_{FeMet95} - \epsilon_{FeCO})/(\epsilon_{Fe} - \epsilon_{FeCO})$ of the extinction coefficients ϵ at 436 nm for the involved difference spectra. When comparing this value to that expected from the difference between the steady-state spectrum of reduced unliganded of FixLH (as a model spectrum for the pentacoordinate unliganded form ϵ_{Fe}) and DosH−CO, we find a value of $\alpha_{436} = 0.42$. However, using the unliganded minus CO-liganded difference spectrum that we observe at 4 ns (Figure 6), we find a value of $\alpha_{436} = 0.72$. This latter value is much closer to the value found from fitting the microsecond and millisecond data, therefore strongly indicating that the heme environment has not evolved to an equilibrium pentacoordinate conformation close to that of FixLH (and to that of the M95I mutant of DosH, which has a very similar spectrum (*1*, *19*)) on the microsecond time scale. Consistent with these findings, we could also reasonably simulate the transient spectra on the 50 μs to 1 ms time scale reported by Gonzalez and co-workers (*19*) with the static CO and deoxy spectra of *DosH* and the 4-ns pentacoordinate spectrum extracted from our fast kinetics (not shown).

The analysis yields a value of 1.0×10^4 s^{-1} for the intrinsic rate constant of Met 95 binding to CO-dissociated heme. This value is slightly lower than the value of 1.2×10^4 s^{-1} reported previously (*19*), due to the now assessed competition with CO binding, as discussed above. An important point is that this process is about 7 orders of magnitude slower than

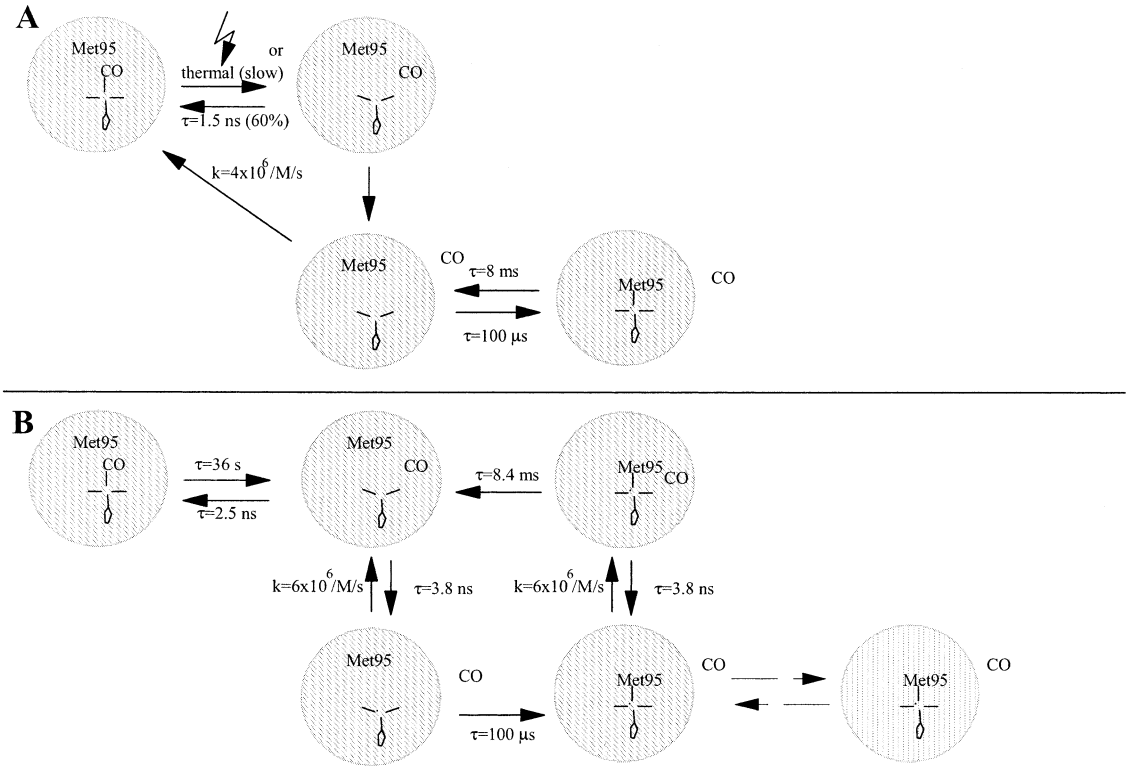


FIGURE 8: Schemes for CO and Met 95 binding with DosH. The protein moiety is represented by the hatched circles. (A) Summary of experimentally observed rate constants obtained from the ensemble of our CO-flash photolysis experiments. (B) Proposed scheme of microscopic rate constants consistent with the ensemble of our data. As discussed in the text, we propose that displacement of Met 95 from its heme-bound position occurs efficiently only in the presence of the (CO) external ligand near the heme pocket. The differently hatched protein representation at the lower right reflects a relaxed heme environment, invoked to explain the difference in bimolecular binding rates obtained with mixing experiments and with flash photolysis experiments.

Met 95 rebinding after Met 95 photodissociation (Figure 3), indicating substantial structural rearrangements in the heme pocket upon replacement of Met 95 by an external ligand (see Discussion).

Using flash photolysis, the bimolecular CO binding rate to hexacoordinated DosH is calculated to be $(k_{-M}/k_M)k_{CO} = 48 \times 10^3\ M^{-1}\ s^{-1}$. Interestingly, this is substantially higher than the values reported by single-wavelength stopped flow ($1.1 \times 10^3\ M^{-1}\ s^{-1}$ (*13*)). In addition, by rapid mixing experiments using a diode-array spectrophotometer (data not shown), we observed 3 times slower kinetics than the rate of binding predicted by the microscopic constants measured by flash photolysis on the same sample. This difference in flash photolysis and mixing-type experiments may indicate an additional slow protein relaxation after ligand release. This transition is tentatively indicated with dashed arrows in Figure 8B.

DISCUSSION

Our present results on the heme domain DosH complement our previous report including the DosH−O_2 complex (*12*) and have resulted in the assessment of a number of unusual properties of ligand dynamics. Some of these properties are clearly different from those previously assessed in the sensor domain FixLH (*12*).

Transient Spectra and Heme Coordination. For all external ligands studied (CO, NO, and O_2 (*12*)), dissociation of the six-coordinate ferrous heme initially leads to a spectrum that is consistent with a five-coordinate heme. Coordination with Met 95 was not observed before rebinding with the dissociated ligand on the picosecond time scale for NO and O_2 and, for CO, before the microsecond time scale ((*19*), see below). By contrast, dissociated Met 95 rebinds over 6 orders of magnitude faster (at slowest in ~35 ps, Figures 3 and 4), clearly implying the presence of intermediate conformation(s) in the heme environment after dissociation of CO and before formation of a near-equilibrium heme environment (see below). The presence of such intermediates can also be inferred from the transient *spectra* reported for CO and NO dissociation. These spectra, while inconsistent with a six-coordinate transient heme configuration, were found to be significantly disturbed with respect to the expected steady-state five-coordinate spectra, in a similar way as we previously observed for dissociation of ligands from FixLH (*12*). In particular, the reconstructed absolute spectra for the ligand-dissociated intermediates were found to be blue-shifted with respect to the "model" five-coordinate spectrum of FixLH in the order CO−NO−O_2 in a similar way as previously found for FixLH (not shown, cf. Figure 6 in ref *12*). The similarity with the transient spectra for FixLH suggests that similar structural elements in the heme pocket are involved, and that the (Dos-specific) Met 95 is far enough displaced from the heme not to strongly influence the heme spectrum in these ligand-dissociated intermediates. This observation is in general agreement with the much slower rebinding of Met 95 after dissociation of the external ligand (see below).

We note that qualitatively similar results of nonrebinding of the internal sixth ligand after dissociation of the external ligand CO were reported for the CO-sensor CooA (although a detailed spectral comparison was not made) (*28*), suggest-

ing that the presence of such intermediates in the heme environment is a universal feature for heme-based sensors.

Dynamics of External Ligands. The dynamics of geminate rebinding of the external ligands CO and NO was found to be more efficient than in FixLH. NO, which is known to have a very high affinity for heme, rebinds with time constants (5 and 20 ps) similar to those found for other heme proteins, including myoglobin (*31, 36*), guanylate cyclase (*35*), and FixLH (*12*). However, the yield of rebinding, >99%, is the highest known for the picosecond time scale, and indicates that NO essentially cannot escape from the heme pocket. CO does not rebind on the picosecond time scale, but shows a strong (60%) geminate recombination phase of 1.5 ns. After that in the CO-sensor protein CooA (*28*, *37*), this rebinding represents the most pronounced CO geminate recombination known in a monoheme protein. With the previously reported high yield of O_2 recombination (Table 1, (*12*)), the ensemble of data indicate that the heme pocket of DosH constitutes an extremely closed shelter for ligands, favoring the rebinding of ligands to the heme in a stronger fashion than for the homologous FixLH heme domain. These differences presumably are related to the observed lower ligand off-rates for DosH with respect to FixLH (*13*). The differences suggest that the heme pocket is not only modified with respect to FixLH in the deoxy, six-coordinate heme-ligation state (*19*), but also when the heme coordinates external ligands. The molecular origin of these differences remains to be explored by spectroscopic studies of mutants. Apart from Met 95 (Ile in FixLH), one might speculate that the replacement of Leu 236 in FixLH to Phe 113 in DosH, as deduced from the sequence alignment of ref *19*, induces steric modifications in the heme pocket.

CO Rebinding. Our studies on CO dissociation and rebinding cover a time span from femtoseconds to seconds, and include geminate rebinding, internal ligand binding, and ligand replacement phases. The ensemble of the results allows elaborating a minimal scheme of microscopic rates associated with these processes (Figure 8B). Briefly, dissociated CO rebinds to heme (2.5 ns) or diffuses out of the protein (3.8 ns). We cannot exclude that additional geminate rebinding occurs on a time scale of $\sim 10^{-7}$ s, but the high microsecond photodissociation yield suggests that such rebinding would not be substantial. Met 95 binds to the heme in 100 μs, at high CO concentration in competition with CO diffusion into the protein (6×10^6 M^{-1} s^{-1}) and subsequent binding to the heme. We suppose that the kinetics of CO moving in to and out of the protein are similar whether Met 95 is bound to the heme or not, but that Met 95 can only be detached sufficiently long to allow CO binding when CO is present near the heme. The latter proposal is inspired by the observed very fast rebinding of dissociated Met 95 in the absence of external ligands (Figure 3), and suggests that the presence of CO (or O_2) near the heme acts as a molecular "wedge" to displace Met 95. The time constant of dissociation of CO from the heme (36 s) is derived from the reported k_{off} of 0.011 s^{-1} (*13*) (combining our kinetic data with affinity measurements (not shown) we found a similar value) and the geminate recombination yield.

The difference in bimolecular CO binding to penta- and hexa- (Met 95) coordinate DosH indicate that in equilibrium, and in the absence of external ligands, >98% of the reduced hemes are hexacoordinate, in general agreement with characterizations by Raman spectroscopy (*20*, *21*). Finally, as indicated in Results, a further relaxation phase (depicted by a change in hatching of the protein moiety in Figure 8B) may take place on a longer time scale. Further studies on the heme domain as well as on the holoprotein should provide more insight into this putative transition and its possible functional role.

More generally, the scheme of Figure 8 may be useful to discuss the ensemble of ligand dynamics in hexacoordinate ligand-binding heme proteins and help to characterize their complex bimolecular ligand-binding properties (*16*, *38*, *39*). We note that the ensemble of kinetic phases observed in DosH is not necessarily always retrieved by flash photolysis experiments. For instance, in the bacterial CO-sensor CooA, the only other hexacoordinate heme protein for which both geminate and bimolecular ligand binding dynamics are presently available, internal ligand binding does not occur prior to CO rebinding (*40*).

Dissociation and Rebinding of the Intrinsic Sixth Axial Ligand. We have obtained strong indications that, in DosH, the bond of the ferric heme with the intrinsic sixth axial ligand, Met 95, is broken or at least weakened, in a fraction of the excited proteins (Figure 2). Whereas photodissociation of intrinsic axial ligands from ferrous hemes has been reported before (see below), this is to our best knowledge the first instance of such a process in a ferric heme. The bond is reestablished in ~20 ps, a similar time scale as rebinding of Met 95 upon dissociation from ferric heme (see below), which may suggest that the rebinding speed is not determined by electronic interactions, but rather by steric interactions.

Photodissociation of Met 95 was also observed from the ferrous heme (Figure 3); judging from comparison with the early transient spectra of CO and NO dissociation with near-unity quantum yield. Transient spectra have been interpreted in terms of dissociation of internal axial ligands from reduced heme previously, notably for the CO-sensor CooA (*28*), where the axial ligand is now known to be a proline (*41*), and for cytochrome *c* (*42*, *43*), where heme axial coordination is similar (His-Met) to DosH.[1] In both CooA and cytochrome *c* the dissociated ligand has been reported to rebind with a time constant of ~7 ps. In DosH, we found clear evidence for two distinct, but spectrally very similar, rebinding phases with roughly equal amplitudes (Figures 3 and 4) and time constants of 7 and 35 ps. This indicates that rebinding occurs from two conformations, presumably differing in methionine position or orientation, but with similar constraints on the heme. These conformations may be populated (a) sequentially in time, i.e., photodissociation initially leads to one dissociated-methionine conformation which decays, in 7 ps, in parallel back to a six-coordinate heme conformation and to a second dissociated-methionine conformation, which itself recombines in 35 ps or (b) in parallel, possibly reflecting two different conformations present already in the initial six-coordinate state. At present, we cannot discriminate between these two schemes. The assessment of different methionine-dissociated conformations close to the bound configuration

[1] The photon energies used in the cytochrome *c* studies (excitation in the blue and near-UV) were substantially higher than in our present study, where the excess energy was minimized by exciting in the lowest-lying optical transition of the heme, near 563 nm.

may be relevant for future determination of the way oxygen replaces methionine as a ligand. In this context, it is interesting to note that the rebinding of dissociated methionine occurs on a slower time scale than the rebinding of the dissociated external ligands O_2 (*12*) (and also NO). This suggests that upon (thermal) dissociation of methionine, O_2, once present near the heme pocket, could efficiently compete for binding to the heme. The presence of two distinct methionine-dissociated conformations could indicate a specific pathway for its motion away from the heme to accommodate an external ligand. Molecular dynamics studies on the basis of the forthcoming crystal structure (*23*) may help to clarify these issues.

The identified short-lived six-coordinate methionine-dissociated conformations of the heme pocket must be different from the configuration(s) obtained after dissociation of external ligands, where methionine binding to the heme does not occur on the picosecond time scale. Clearly, the presence of the external ligand near the heme prohibits methionine to approach the heme, but even after diffusion of dissociated CO out of the heme pocket methionine binding takes as long as ~100 μs. Altogether, the kinetic studies convey that major structural rearrangements, with multiple intermediate configurations, occur in the heme environment during the exchange of methionine and external ligands.

During none of the observed intermediates, including that on the microsecond time scale after CO dissociation but prior to methionine binding, the heme spectrum is close to that of the five-coordinate FixLH spectrum. This suggests that a FixL-like heme environment is never adopted. This observation is in general agreement with the assessment that in DosH for Met 95 to approach the heme iron, the heme domain must be substantially distorted with respect to FixLH (*19*), and indicates that this distortion influences the heme configuration even when Met 95 is not ligated to the heme. In the same line, using molecular dynamics methods, we have attempted to construct a model of the DosH structure using the crystal structure of FixLH (*8*) as a template. Whereas the general PAS domain structure is well conserved with this approach, complications arise when modeling the distal heme environment due to the substantial rearrangements imposed by the introduction of a bond between the heme iron and the methionine sulfur atoms.

Electron Transfer. Our data show a quite unexpected feature in the relatively stable (>4 ns) reduction of the ferrous heme upon excitation of the reduced deoxy protein (Figure 3). We are not aware of any other example of direct photooxidation of hemes in a heme protein. The low quantum yield (4−8%) of the process prevents us from establishing whether oxidation occurs directly from the excited state or after recombination of the dissociated methionine. The corresponding electron acceptor has not been identified; one might speculate on the possibility that the electron initially resides on the dissociated methionine and can be transferred to a subsequent electron acceptor prior to rebinding. Whatever the mechanism, our observation is interesting in light of the recently reported and possibly physiologically relevant inactivation of the Dos regulatory domain by ferric heme in the heme domain (*22*). Combining these observations indicates that optical spectroscopic techniques may also be used to study the molecular mechanism of this inactivation, and, in extremis, might even imply that Dos can act as a light sensor.

Concluding Remarks. We have presented a survey of the dynamics of intrinsic and three different external ligands after dissociation from DosH. We provided evidence for several intermediates which can be significantly populated by flash photolysis and for which it will be useful to further determine the characteristics using time-resolved vibrational techniques. A common feature emerging from the ensemble of data on DosH is that recombination with external ligands occurs with a very high speed and yield (for NO even 100%), indicating a very confined heme pocket. In another heme-based sensor where the sensed ligand replaces an internal heme axial ligand, CooA, a similar feature was observed (at least with the physiological ligand CO) (*28*). Thus, it would appear that highly efficient recombination of external ligands is a general feature for ligand-binding six-coordinate proteins, an issue that can be addressed by ultrafast studies on other six-coordinate proteins (*16*−*18*). These studies may also help to characterize the complex bimolecular ligand-binding properties in these proteins (*38*, *39*).

The phosphodiesterase activity of reduced Dos is inhibited by O_2, but, presumably to a lesser extent, also by CO and NO (*22*). The relatively high yield of CO dissociation on the time scale beyond picoseconds may make the CO-bound form of Dos the best adapted model to study the molecular mechanism of the *release* of the inhibition. With this prospect, we have developed a minimal CO binding scheme from the ensemble of data available on the femtosecond to second time scale. However, the heme-based sensors can be regarded as bistable switches (*12*), and the mechanisms of the transitions in both directions are physiologically relevant. Our results indicate that, in Dos, the regulatory mechanism may also be tackled starting from the other position of the switch, as at least the early intermediates of the *onset* of inhibition may be populated by dissociation of the internal methionine ligand.

APPENDIX

The microsecond/millisecond data are analyzed in terms of a model involving three ligation states of the heme, the CO-bound hexacoordinate state FeCO, the pentacoordinate state Fe and the Met95-bound hexacoordinate state FeMet95. This is a simplified scheme of that presented in Figure 8A, excluding the (faster) geminate phases,

$$\mathrm{FeCO} \underset{k_{\mathrm{CO}}}{\overset{k_{-\mathrm{CO}}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{Fe} \underset{k_{-\mathrm{M}}}{\overset{k_{\mathrm{M}}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{FeMet95} \qquad \text{(A1)}$$

in which k_{CO} and $k_{-\mathrm{CO}}$ are the bimolecular rate of CO binding to the pentacoordinate heme, iron and the (thermal) CO dissociation rate, respectively, and k_{M} and $k_{-\mathrm{M}}$ are the rates for Met 95 binding and dissociation, respectively. The corresponding set of coupled differential equations reads:

$$\frac{d[\mathrm{FeCO}]}{dt} = k_{\mathrm{CO}}[\mathrm{Fe}][\mathrm{CO}] - k_{-\mathrm{CO}}[\mathrm{FeCO}] \qquad \text{(A2a)}$$

$$\frac{d[\mathrm{Fe}]}{dt} = -k_{\mathrm{CO}}[\mathrm{Fe}][\mathrm{CO}] + k_{-\mathrm{CO}}[\mathrm{FeCO}] - k_{\mathrm{M}}[\mathrm{Fe}] + k_{-\mathrm{M}}[\mathrm{FeMet95}] \qquad \text{(A2b)}$$

$$\frac{d[\mathrm{FeMet95}]}{dt} = -k_{-\mathrm{M}}[\mathrm{FeMet95}] + k_{\mathrm{M}}[\mathrm{Fe}] \qquad \text{(A2c)}$$

Note that the solvent CO concentration [CO] is usually the equilibrium value $[CO]_{eq}$ depending on the gas partial pressure and solubility coefficient; however, at low CO levels one must take into account the CO photodissociated from the protein which varies in time and depends on the fraction (f) of protein bound with CO:

$$[CO] = [CO]_{eq} + [protein]\,(1 - f[FeCO]) \quad \text{(A3)}$$

For constant CO concentrations, solving the set of equations (A2) yields biexponential kinetics for the population dynamics of the three species. For $k_{-CO} \ll k_M$, $k_{-M}k_{CO}[CO]$, as is the case in DosH (see Discussion), the two observed rates k_1 and k_2 read:

$$k_{1,2} = k_M + k_{-M} + k_{CO}[CO] \pm \sqrt{(k_M + k_{-M} + k_{CO}[CO])^2 - 4(k_{-M}k_{CO}[CO])}/2 \quad \text{(A4)}$$

It is straightforward to show that for the conditions [Fe] = 1, [FeCO] = [FeMet95] = 0 at $t = 0$, and with extinction coefficients ϵ_{FeCO}, ϵ_{Fe}, and $\epsilon_{FeMet95}$ for the three different species, the overall transient absorption kinetics are of the form:

$$\Delta A(t) \sim \frac{1}{k_1 - k_2}(((\epsilon_{Fe} - \epsilon_{FeCO})(k_1 - k_{-M}) - (\epsilon_{FeMet95} - \epsilon_{FeCO})k_M)e^{-k_1 t} + (\epsilon_{Fe} - \epsilon_{FeCO})(k_{-M} - k_2) + (\epsilon_{FeMet95} - \epsilon_{FeCO})k_M)e^{-k_2 t}) \quad \text{(A5)}$$

REFERENCES

1. Gilles-Gonzalez, M. A., Ditta, G. S., and Helinski, D. R. (1991) *Nature 350*, 170−172.
2. Perutz, M. F., Paoli, M., and Lesk, A. M. (1999) *Chem. Biol. 6*, R291−R297.
3. Rodgers, K. R. (1999) *Curr. Opin. Chem. Biol. 3*, 158−167.
4. Pellequer, J.-L., Brudler, R., and Getzoff, E. D. (1999) *Curr. Biol. 9*, R416−R418.
5. Gilles-Gonzalez, M. A. (2001) *IUBMB Life 51*, 165−173.
6. Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Dioum, E. M., and Gilles-Gonzalez, M. A. (2002) *Biochemistry 41*, 6170−6177.
7. Gilles-Gonzalez, M. A., Gonzalez, G., Perutz, M. F., Kiger, L., Marden, M. C., and Poyart, C. (1994) *Biochemistry 33*, 8067−8073.
8. Gong, W., Hao, B., Mansy, S. S., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M. A., and Chan, M. K. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95*, 15177−15182.
9. Gong, W., Hao, B., and Chan, M. K. (2000) *Biochemistry 39*, 3955−3962.
10. Miyatake, H., Mukai, M., Park, S.-Y., Adachi, S., Tamura, K., Nakamura, H., Nakamura, K., Tsuchiya, T., Iizuka, T., and Shiro, Y. (2000) *J. Mol. Biol. 301*, 415−431.
11. Hao, B., Isaza, C., Arndt, J., Soltis, M., and Chan, M. K. (2002) *Biochemistry 41*, 12952−12958.
12. Liebl, U., Bouzhir-Sima, L., Négrerie, M., Martin, J.-L., and Vos, M. H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99*, 12771−12776.
13. Delgado-Nixon, V. M., Gonzalez, G., and Gilles-Gonzalez, M. A. (2000) *Biochemistry 39*, 2685−2691.
14. Aano, S., Nakajima, H., Saito, K., and Okada, M. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Comm. 228*, 752−756.
15. Shelver, D., Kerby, R. L., He, Y., and Roberts, G. P. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94*, 11216−11220.
16. Dewilde, S., Kiger, L., Burmester, T., Hankeln, T., Baudin-Creuza, V., Aerts, T., Marden, M. C., Caubergs, R., and Moens, L. (2001) *J. Biol. Chem. 276*, 38949−38955.
17. Trent, J. T., III., and Hargrove, M. S. (2002) *J. Biol. Chem. 277*, 19538−19545.
18. Hankeln, T., Jaenicke, V., Kiger, L., Dewilde, S., Ungerechts, G., Schmidt, M., Urban, J., Marden, M. C., Moens, L., and Burmester, T. (2002) *J. Biol. Chem. 277*, 29012−29017.
19. Gonzalez, G., Dioum, E. M., Bertolucci, C. M., Tomita, T., Ikeda-Saito, M., Cheesman, M. R., Watmough, N. J., and Gilles-Gonzalez, M. A. (2002) *Biochemistry 41*, 8414−8421.
20. Sato, A., Sasakura, Y., Sugiyama, S., Sagami, I., Shimizu, T., Mizutani, Y., and Kitagawa, T. (2002) *J. Biol. Chem. 277*, 32650−32658.
21. Tomita, T., Gonzalez, G., Chang, A. L., Ikeda-Saito, M., and Gilles-Gonzalez, M. A. (2002) *Biochemistry 41*, 4819−4826.
22. Sasakura, Y., Hirata, S., Sugiyama, S., Suzuki, S., Taguchi, S., Watanabe, M., Matsui, T., Sagami, I., and Shimizu, T. (2002) *J. Biol. Chem. 277*, 23821−23827.
23. Park, H., Suquet, C., Savenkova, M. I., Satterlee, J. D., and Kang, C. H. (2002) *Acta Crystallogr. D58*, 1504−1506.
24. Borisov, V. B., Liebl, U., Rappaport, F., Martin, J.-L., Zhang, J., Gennis, R. B., Konstantinov, A. A., and Vos, M. H. (2002) *Biochemistry 41*, 1654−1662.
25. Martin, J.-L., and Vos, M. H. (1994) *Methods Enzymol. 232*, 416−430.
26. Wood, P. M. (1984) *Biochim. Biophys. Acta 768*, 293−317.
27. Petrich, J. W., Poyart, C., and Martin, J.-L. (1988) *Biochemistry 27*, 4049−4060.
28. Kumazaki, S., Nakajima, H., Sakaguchi, T., Nakagawa, E., Shinahara, H., Yoshihara, K., and Aano, S. (2000) *J. Biol. Chem. 275*, 38378−38383.
29. Steinbach, P. J., Ansari, A., Berendzen, J., Braunstein, D., Chu, K., Cowen, B. R., Ehrenstein, D., Frauenfelder, H., Johnson, J. B., Lamb, D. C., Luck, S., Mourant, J. R., Nienhaus, G. U., Ormos, P., Philipp, R., Xie, A., and Young, R. D. (1991) *Biochemistry 30*, 3988−4001.
30. Schomaker, K. T., Bangcharoenpaurpong, O., and Champion, P. M. (1984) *J. Chem. Phys. 80*, 4701−4717.
31. Petrich, J. W., Lambry, J.-C., Kuczera, K., Karplus, M., Poyart, C., and Martin, J.-L. (1991) *Biochemistry 30*, 3975−3978.
32. Petrich, J. W., Lambry, J.-C., Balasubramanian, S., Lambright, D. G., Boxer, S. G., and Martin, J.-L. (1994) *Biochemistry 238*, 437−444.
33. Carlson, M. L., Regan, R., Elber, R., Li, H., Phillips, G. N., Jr., Olson, J. S., and Gibson, Q. H. (1994) *Biochemistry 33*, 10597−10606.
34. Walda, K. N., Liu, X. Y., Sharma, V. S., and Magde, D. (1994) *Biochemistry 33*, 2198−2209.
35. Négrerie, M., Bouzhir-Sima, L., Martin, J.-L., and Liebl, U. (2001) *J. Biol. Chem. 276*, 46815−46821.
36. Négrerie, M., Berka, V., Vos, M. H., Liebl, U., Lambry, J.-C., Tsai, A.-L., and Martin, J.-L. (1999) *J. Biol. Chem. 274*, 24694−24702.
37. Rubtsov, I. V., Zhang, T., Nakajima, H., Aano, S., Rubtsov, G. I., Kumazaki, S., and Yoshihara, K. (2001) *J. Am. Chem. Soc. 123*, 10056−10062.
38. Kriegl, J. M., Bhattacharyya, A. J., Nienhaus, K., Deng, P., Minkow, O., and Nienhaus, G. U. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99*, 7992−7997.
39. Trent, J. T., III., Hvitved, A. N., and Hargrove, M. S. (2001) *Biochemistry 40*, 6155−6163.
40. Uchida, T., Ishikawa, H., Takahashi, S., Ishimori, K., Morishima, I., Ohkubo, K., Nakajima, H., and Aano, S. (1998) *J. Biol. Chem. 32*, 19988−19992.
41. Lanzilotta, W. N., Schuller, D. J., Thorsteinsson, M. V., Kerby, R. L., Roberts, G. P., and Poulos, T. L. (2000) *Nat. Struct. Biol. 7*, 876−880.
42. Jongeward, K. A., Magde, D., Taube, D. J., and Traylor, T. G. (1988) *J. Biol. Chem. 263*, 6027−6030.
43. Wang, W., Ye, X., Demidov, A. A., Rosca, F., Sjodin, T., Cao, W., Sheeran, M., and Champion, P. M. (2000) *J. Phys. Chem. B 104*, 10789−10801.

BI027359F

3.Article III

Role of Arginine 220 in the Oxygen Sensor FixL from *Bradyrhizobium japonicum*

Véronique Balland, Latifa Bouzhir-Sima, Laurent Kiger, Michael C. Marden, Marten H. Vos, Ursula Liebl, and Tony A. Mattioli

J.Biol.Chem. 2005, vol. 280, No. 15: 15279–15288

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 280, No. 15, Issue of April 15, pp. 15279–15288, 2005
Printed in U.S.A.
© 2005 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Role of Arginine 220 in the Oxygen Sensor FixL from *Bradyrhizobium japonicum**[S]

Received for publication, December 10, 2004, and in revised form, January 25, 2005
Published, JBC Papers in Press, February 11, 2005, DOI 10.1074/jbc.M413928200

Véronique Balland‡, Latifa Bouzhir-Sima§, Laurent Kiger¶, Michael C. Marden¶, Marten H. Vos§, Ursula Liebl§, and Tony A. Mattioli‡‖

From the ‡Laboratoire de Biophysique du Stress Oxydant, SBE/DBJC and CNRS URA 2096, CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France, the §Laboratoire d'Optique et Biosciences, INSERM U451, CNRS UMR 7645, Ecole Polytechnique-ENSTA, 91128 Palaiseau, France, and ¶INSERM Unité 473, 78, rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France

In the heme-based oxygen sensor protein FixL, conformational changes induced by oxygen binding to the heme sensor domain regulate the activity of a neighboring histidine kinase, eventually restricting expression of specific genes to hypoxic conditions. The conserved arginine 220 residue is suggested to play a key role in the signal transduction mechanism. To obtain detailed insights into the role of this residue, we replaced Arg^{220} by histidine (R220H), glutamine (R220Q), glutamate (R220E), and isoleucine (R220I) in the heme domain FixLH from *Bradyrhizobium japonicum*. These mutations resulted in dramatic changes in the O_2 affinity with K_d values in the order R220I < R220Q < wild type < R220H. For the R220H and R220Q mutants, residue 220 interacts with the bound O_2 or CO ligands, as seen by resonance Raman spectroscopy. For the oxy-adducts, this H-bond modifies the π acidity of the O_2 ligand, and its strength is correlated with the back-bonding-sensitive ν_4 frequency, the k_{off} value for O_2 dissociation, and heme core-size conformational changes. This effect is especially strong for the wild-type protein where Arg^{220} is, in addition, positively charged. These observations strongly suggest that neither strong ligand fixation nor the displacement of residue 220 into the heme distal pocket are solely responsible for the reported heme conformational changes associated with kinase activity regulation, but that a significant decrease of the heme π^* electron density because of strong back-bonding toward the oxygen ligand also plays a key role.

Oxygen regulates diverse processes essential to life and has recently been identified as an activity regulator ligand for several heme-based sensor proteins, with either histidine kinase activity as for FixL in *Rhizobia,* or phosphodiesterase activity as for *Ec*DOS[1] in *Escherichia coli* and PDEA1 in *Acetobacter* (1, 2, 3). Heme-based sensors carry out crucial roles in biological signaling in prokaryotic and eukaryotic organisms responding to various gaseous ligands such as dioxygen, nitric oxide (guanylate cyclase, Ref. 4), or carbon monoxide (CooA, a CO-sensing protein of *Rhodospirillum rubrum*, Refs. 5 and 6; NPAS2, Ref. 7). In these sensor proteins, the heme cofactor plays a central role not only in binding the respective effector molecules but also in regulating the associated enzymatic function via heme and protein conformational changes induced by ligand binding. The N-terminal segments of several of these proteins (FixL, *Ec*DOS, PDEA1, and NPAS2) consist of a heme sensor domain whose fold characterizes them as PAS domains. These domains are proposed to share a common conformational flexibility, potentially related to a mechanism for communicating ligand binding and signal transduction (8). PAS domains were also identified in several non-heme proteins involved in the mammalian oxygen-sensing pathway, as ARNT or HIF1-α, which play crucial roles in the cellular metabolic changes under hypoxic conditions (9).

The FixL/FixJ two-component regulatory system is part of the signaling cascade of *Bradyrhizobium japonicum* that enables this bacterium to adapt its respiratory energy metabolism to the microaerobic environment during root hair invasion and nodule formation (10). The FixL proteins have a histidine kinase domain, responsible for the phosphorylation of the transcription factor FixJ, and an oxygen-sensing heme domain (11). Similar to the oxygen storage protein myoglobin, the heme domain has a *b*-type heme as prosthetic group with a proximal histidine as axial ligand. Both the deoxy-Fe^{II} and Met-Fe^{III} forms are high spin and 5-coordinated (12). Upon oxygen fixation, the heme becomes low spin 6-coordinated, and the kinase activity strongly diminishes. Thus, a local perturbation at the heme domain is transduced over a relatively long distance within the protein. Diminished kinase activity has also been observed with low spin CO or NO adducts, but to a far lesser degree (13, 14). Therefore, it is not solely the spin change of the heme upon ligand binding that is responsible for the switching of the kinase activity.

Structural studies indicate similarities in the steady-state heme geometry of the oxy-complexes of FixLH and Mb proteins (15), as well as in the bond strength between the heme iron and O_2 (16). However, notable differences are observed, especially with regard to the dynamic aspects of the interaction with oxygen. Oxygen affinity is much lower in FixL (17), whereas oxygen geminate recombination after O_2 dissociation occurs with unprecedented efficiency and high yield (18). Thus, unlike myoglobin, there is substantial reorganization in the FixL heme pocket upon O_2 fixation that acts as an oxygen trap, a finding consistent with the x-ray crystallo-

* This work was supported in part by the Regional Council of the Ile-de-France (to T. A. M.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[S] The on-line version of this article (available at http://www.jbc.org) contains Supplemental Materials.

‖ To whom correspondence should be addressed: Service de Bioénergétique, Département de Biologie Joliot-Curie, CEA Saclay, F-91191, Gif-sur-Yvette Cedex, France. Tel.: 33-169-08-41-66; Fax: 33-169-08-87-17; E-mail: tony.mattioli@cea.fr.

[1] The abbreviations used are: *Ec*DOS, direct oxygen sensor from *E. coli*; *Bj, B. japonicum*; FixL*, soluble truncated FixL; FixLH, heme domain of FixL; FG loop, Thr^{209} to His^{220} in *Bj*FixLH; Hb, hemoglobin; HS, high spin; LS, low spin; Mb, myoglobin; RR, resonance Raman; *SW,* sperm whale; WT, wild type; FT-IR, Fourier transform infrared.

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/cgi/content/full/M413928200/DC1

Downloaded from www.jbc.org by on October 30, 2006

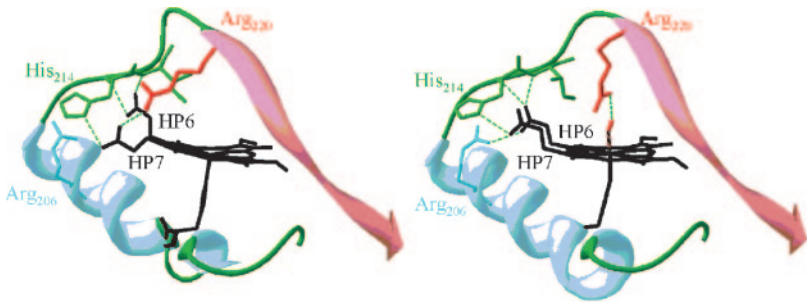


FIG. 1. **Crystallographic structures of the deoxy (*left*, PDB entry 1LSW, Ref. 20) and oxy (*right*, PDB entry 1DP6, Ref. 15) states of *Bj*FixLH.** Arg^{220} and β-sheets are in *red*, Arg^{206} and α-helix in *cyan*, His^{214} and Ile^{215} and loops are represented in *green*. The heme-propionate 6 and 7 are labeled *HP6* and *HP7*, respectively.

graphic structures of the heme domain obtained for *Bj*FixL (*Bj*FixLH) (15, 19, 20). Upon O_2 or CN^- binding, the FixL heme pocket structure is significantly modified, especially the position of the FG loop (Thr^{209} to Arg^{220}), and the spatial position of one arginine (Arg^{220}) moves from the propionate 7 group of the heme toward the oxygen ligand (Fig. 1). Based on these structures, the mechanism of primary signal transduction has been suggested to involve the heme propionates and two arginine residues (Arg^{206} and Arg^{220}). One model proposes that flattening of the heme plane upon ligand binding leads to a shift in the position of the heme propionates reducing the strength of the salt bridge between Arg^{220} and propionate 7 (15). As a result, the arginine at position 220 shifts into the distal pocket of FixL where a H-bond can be formed with the ligand (O_2, CN^-), leading to new polar interactions and eventually inducing the structural reorganization responsible for kinase inactivation (20). Movement in the FG loop is thus thought to be an important element of this structural reorganization responsible for kinase inactivation.

Recently, the three-dimensional crystallographic structure of the R220A mutant of *Bj*FixLH in its Fe^{III} state has been described (14). Inhibition of the histidine kinase activity was strongly affected by this mutation as reported for the cyanomet-FixL adduct, but it was not reported for the oxy form because binding of O_2 was very inefficient (K_d = 1500 μM^{-1}). According to the description of the Fe^{III} R220A mutant structure, the major structural modifications involved the heme planarity, the lengthening of the axial Fe^{III}-N_{His} bond, and the propionate 7 geometry.

Arg^{220} is a conserved residue among all known FixL proteins, and its equivalent is also found in the distal pocket of the *Ec*DOS sensor protein (Arg^{64}) (21). The x-ray structures of *Bj*FixLH as well as *Ec*DOSH point to the importance of this residue, which interacts with the bound O_2 ligand, but its exact role in the O_2 affinity and chemical details related to Fe-O_2 adduct stabilization are not clear. Here, we have constructed four site-directed mutants of *Bj*FixLH at position 220 to study the influence of Arg^{220} on the heme conformation and on the nature of O_2 binding. The point mutations were chosen in order to modify the electrostatic properties and H-bonding capabilities of residue 220, with minor steric modifications of the side chain. Therefore, Arg^{220} was substituted by Ile, Gln, His, and Glu. In this study we use resonance Raman spectroscopy to obtain detailed insight in the structural and electrostatic role of Arg^{220} in different ligation states. In particular, we focus on the oxy-Fe^{II}-O_2 and the Fe^{II}-CO states, because both species exhibit a low-spin 6-coordinated iron with two different heme pockets. The structural information obtained for these states, in terms of residue 220 interactions with bound ligand, can be related to the measured association and dissociation rates for O_2 and CO binding, providing new insights into the factors responsible of the structural reorganization in the FixL sensor and the related function.

MATERIALS AND METHODS

DNA Manipulations, Protein Expression, and Purification—A recombinant gene fragment, corresponding to the region between codons 142 and 270 and encoding the FixL heme domain in *B. japonicum,* was used as template for site-directed mutagenesis reactions. The substitutions R220H, R220Q, R220I, R220A[2] and R220E were introduced following the QuikChange site-directed mutagenesis protocol (Stratagene) by replacing the codon CGC by CAC, CAG, ATC, GCC[2] and GAG, respectively. All constructs were confirmed by DNA sequencing prior to further analyses. The final constructs, containing *fixLH* in the vector pET 28a were transformed into *Escherichia coli* strain BL21 DE3 for expression. Protein expression and purification were performed as described in Liebl *et al.* (18).

Sample Preparation—All protein samples were prepared in 50 mM Tris-HCl buffer at pH 7.4. The deoxy form of *Bj*FixLH was prepared by reduction in deoxygenated buffer, by addition of freshly prepared degassed sodium dithionite (200 μM final concentration) (Sigma) stock solution in deionized water. Except for the Met forms, all modifications of the sample atmosphere were prepared on a system equipped with a vacuum line. These samples were anaerobically sealed with gas-tight rubber septums and transferred, when required, using gas-tight syringes (Hamilton). The O_2 complexes were prepared by addition of an anaerobic sodium ascorbate (Fluka) solution, incubated for 5 min for WT, 15 min for R220Q and R220H, and 30 min for R220I, then flushed with 1 atm O_2 for 30 s. For the $^{18}O_2$ complexes, the flushing was done with $^{18}O_2$ (Eurisotop; 93.3% ^{18}O (atom percent)). The CO complexes were prepared by reduction with excess sodium ascorbate under 1 atm CO. Hydrogen/deuterium exchange experiments were performed by diluting a 50 μM protein sample into a D_2O (Sigma) Tris-DCl buffer solution (pD = 7.4) by a factor of 100. The solution was left for the exchange for 24 h at 4 °C and then concentrated to a final concentration of 30 μM.

UV-Visible Absorption Spectroscopy—Optical absorbance measurements were made using a UVIKON 922 (Kontron) spectrophotometer with a 70-μl airtight quartz cell (Hellma) with a pathlength of 1 cm. Protein concentration was 20 μM, and the measurements were performed at ambient temperature.

Ligand Association—The rates of association (k_{on}) of the FixL proteins with CO or O_2 (except for the oxy-adduct of the R220E mutant), were obtained after flash photolysis with a 10-ns 160-mJ pulse at 532 nm (Quantel YAG laser, France). The heme proteins (10 μM, in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at 25 °C in 4-mm cuvettes) were reduced with dithionite and equilibrated with CO to form the stable Fe^{II}-CO adduct. The samples were then flushed with air, 1 atm of O_2 or CO (1, 10, and 100%). A typical kinetic curve was obtained averaging a minimum of 5 measurements, with at least 5 s between photolysis pulses to allow sample recovery.

Ligand Dissociation—For all mutants, the rate of O_2 dissociation (k_{off}) was measured according to the method previously described (17, 22). The proteins were equilibrated with a mixture of O_2 and CO (final concentrations of 75 μM CO and 1.3 mM O_2). After photodissociation of the CO, O_2 may rebind to the exposed heme, followed by the replace-

[2] The R220A FixLH mutant has been constructed and characterized by UV-visible spectroscopy and only used for the ligand binding experiments. It was not initially the purpose of this work to study this mutant because we first selected the mutations that would least modify the size of the residue 220 side chain. We observed similar behavior for the R220A and R220E FixLH mutants, with low conversion to the oxy form and rapid degradation of this complex. Thus, the flash photolysis experiments were performed with the R220A mutant as described for the R220E mutant (see "Materials and Methods").

Downloaded from www.jbc.org by on October 30, 2006

ment of O_2 by CO. If the gas mixture contains nonsaturating amounts of O_2, the P_{50} can be estimated from the fraction that binds after photodissociation of the CO. For the R220E mutant, where autooxidation of the protein may be a problem, this method was used to estimate the k_{on} value for O_2 binding, because the heme was exposed to O_2 for less than 1 s.

FT-IR Spectroscopy—FT-IR spectra were recorded with an IFS 66 (Bruker) spectrometer equipped with a DTGS detector. ATR spectra were taken using a ZnSe reflection crystal (Pike Technologies). 10 μl of the sample solution (0.5 mM) was deposited on the crystal and dried by a gentle stream of nitrogen gas to avoid water contributions to the FT-IR spectra. Reported spectra were the result of the averaging of 10 single spectra recorded with 250 scans. Spectral resolution was 4 cm^{-1}. Baseline corrections were performed using GRAMS 32 software (Galactic Industries).

Resonance Raman Spectroscopy—Resonance Raman spectra were recorded using a modified single-stage spectrometer T64000 (Jobin-Yvon) equipped with a liquid nitrogen-cooled back-thinned CCD detector and 1800 grooves/mm holographic gratings. Samples for the resonance Raman measurements were prepared at a protein concentration of 20 μM. The excitation wavelength at 413.1 nm was provided by a Kr^+ ion laser (Spectra physics series 2000). A 90° scattering geometry was used and laser power at the sample was 5 milliwatt. Holographic notch filters (Kaiser) were placed at the entrance slits (100 μm) to reject stray light. For measurements of the CO derivatives, the laser power was decreased to ≤2 milliwatt to minimize photodissociation using neutral density filters. All spectra were recorded at room temperature using a spinning cell (diameter 2 mm) to prevent excessive photodissociation and avoid local thermal degradation of the protein during the measurements. To accurately determine isotope shifts, the monochromator was calibrated using the laser excitation wavelength and a saturated sulfate solution; spectra of samples to be directly compared were recorded the same day with no change in experimental geometry. Reported spectra were the result of the averaging of 200 single spectra each recorded with a CCD exposure time of 30 s. Spectral resolution was about 3 cm^{-1}. The band assignments are proposed by analogy with *SW* myoglobin and *Rm*FixL (23, 24).

Band-fitting analyses for the RR and FT-IR data were performed using the GRAMS 32 software. The central frequency values of spectral components in a complex cluster of bands were determined using second derivative and Fourier self-deconvolution. These frequency values and bandwidths of 15 cm^{-1} were used as input parameters for the reiterative band-fitting routine.

RESULTS

UV-Visible Spectroscopy

The UV-visible absorption spectra of the *Bj*FixLH and mutant proteins were recorded in the range 200–800 nm, and the results are summarized in Supplemental Data Table S1. All mutants were able to fully bind CO like the wild-type protein, and the UV-visible data are very similar to that of WT *Bj*FixLH. In contrast, dramatic differences were observed for the mutants in their ability to bind O_2. The formation of a stable Fe-O_2 adduct under similar conditions as WT (10 mM ascorbate, 1 atm O_2) was observed for the R220H, R220I, and R220Q substitutions, whereas the reaction of R220E with dioxygen did not allow formation of any stable adduct; the UV-visible absorption spectra are presented in Fig. 2. The spectrum of WT Fe-O_2 is taken as reference for 100% O_2 fixation (Fig. 2*A*) (18). For R220I and R220Q mutants, the spectra obtained appear as mixtures of Fe^{III}, Fe^{II}, and Fe^{II}-O_2 states, as indicated by shoulders at 395 nm (Fe^{III} species) and 440 nm (Fe^{II} species) for R220I. For each mutant, the contributions of the Fe^{II} deoxy or Fe^{III} Met states were subtracted in order to obtain a homogeneous Soret band similar to that of WT Fe^{II}-O_2. The resulting spectra are presented in Fig. 2, *B* and *C*, and data are reported in Supplemental Data Table S1. The amounts of the oxy form were estimated to be 50 and 80% for the R220I and R220Q mutants, respectively. For the R220H mutant, a 100% of O_2 fixation was observed under 1 atm O_2 as well as under air (20% O_2; data not shown). Thus, this mutant exhibits a higher affinity for O_2 than wild type, since wild type is unable to form 100% of the oxy form under air.

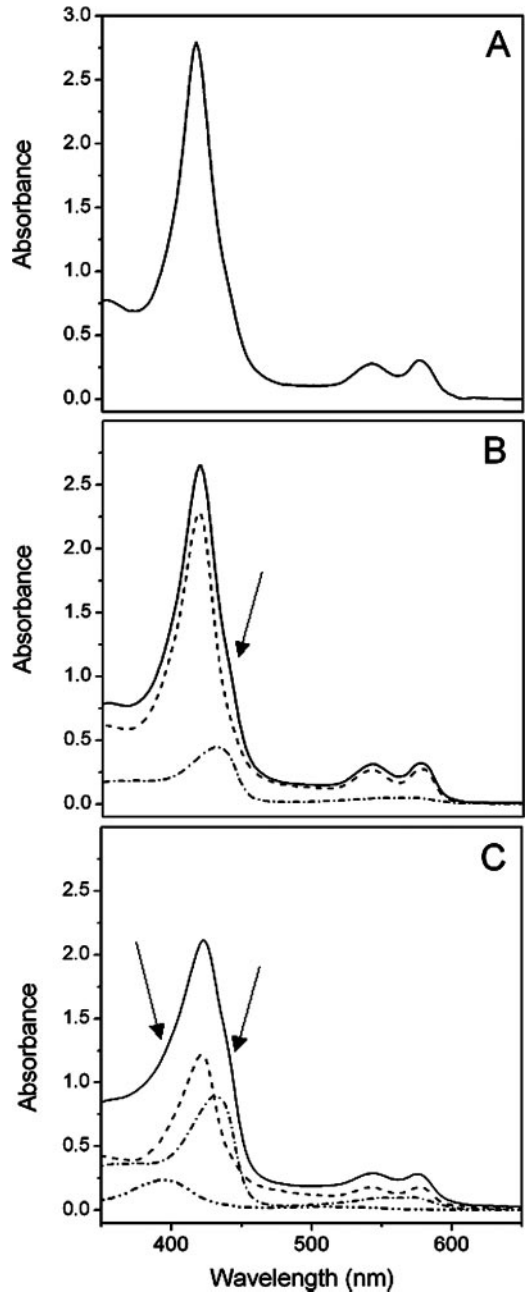


FIG. 2. **UV-visible absorption spectra of *Bj*FixL Fe^{II}-O_2 adducts recorded at ambient temperature for the WT FixL (*A*), the R220Q (*B*), and the R220I (*C*) mutants at pH 7.4.** *Solid line*, solutions after reduction by ascorbate exposed to 1 atm O_2, *arrows* indicate shoulders caused by Fe^{II} or Fe^{III} contributions, (–·–·–) Fe^{II} contribution, (–··–··–) Fe^{III} contribution, (– – – –) resulting Fe^{II}-O_2 spectra obtained by subtracting the Fe^{II} and Fe^{III} contributions. For R220Q, a contribution of 20% Fe^{II} deoxy was subtracted, and the resulting spectrum exhibits a Soret band at 419 nm with an absorbance value corresponding to 77% of that of WT Fe^{II}-O_2. For R220I, contributions of 40% Fe^{II} and 10% Fe^{III} were removed, and the resulting spectrum shows a Soret band at 421 nm with a Soret peak value corresponding to 46% of that of WT $Fe^{II}O_2$.

Oxygen and Carbon Monoxide Binding

FixL proteins have lower O_2 and CO affinities than most natural myoglobins, because of slow ligand association rates as reported in Table I (17). k_{on} values for O_2 binding were measured by flash photolysis of the oxy-adduct as described under "Materials and Methods" (see Supplemental Data Fig. S1). For the R220E mutant a mixed O_2/CO atmosphere experiment was performed (30 μM CO and 1.3 mM O_2); the first phase of the

Downloaded from www.jbc.org by on October 30, 2006

TABLE I
Kinetics and equilibrium constants for the reaction of ferrous BjFixL with O_2 and CO compared to those of other hemoproteins

Protein	O_2				CO k_{on}	Ref.
	P_{50}	K_d	k_{on}	k_{off}		
	mmHg	*μM*	*X 10^{-4} M^{-1}s^{-1}*	*s^{-1}*	*X 10^{-4} M^{-1}s^{-1}*	
*Bj*FixL	76	140	14.5	20	0.5	17, 27
*Bj*FixLH	18	33	30	10	1.6	This work
R220H *Bj*FixLH	5	9	130	12	11	This work
R220Q *Bj*FixLH	137	250	100	250	7	This work
R220I *Bj*FixLH	1030	1875	160	3000	13	This work
R220E *Bj*FixLH	1200	2140	70	1500	3.7	This work
R220A *Bj*FixL		1500	0.2–0.4	6	1.2	14
R220A *Bj*FixLH	700	1250	140	1750	4.9	This work
*Rm*FixLT	27	0.005	22	11	1.2	17
*Rm*FixL*	17	0.003	22	6.8	1.7	16, 28
*Ec*Dos		340	0.19	0.64	0.081	25
*Ec*DosH		20	3.1	0.61	0.78	25
		13	0.26	0.034	0.11	2
*SW*Mb	0.48	0.91	1700	15	51	26, 33
H64R *SW*Mb		1.1	7900	880	2600	26
H64Q *SW*Mb		5.5	2400	130	100	26
H64I *SW*Mb		7	9000	6400	800	26
H64A *SW*Mb		4.3	5300	2300	420	26
*Pc*Hb	0.45	0.84	3010	25.2	0.8	39
HemAT		0.72	3200	23	0.7	36

rebinding kinetics has a rate that is the sum of $k_{on\,(O2)}$ and $k_{off\,(O2)}$ (see Supplemental Data Fig. S2). After 4 ms, the rebinding reaction under 1 atm O_2 was almost complete, and the ΔA value corresponds to formation of 42% of the oxy-complex for the R220I mutant, 74% for the R220Q mutant, and 100% for the R220H mutant (Fig. 3). The experiment was also performed under air for the R220I mutant, leading to formation of only 10% of the oxy-complex. These results are in full agreement with the UV-visible results presented above.

The results obtained for the heme domain of the wild-type *Bj*FixL protein are compared with those obtained for the wild-type full-length protein (Table I) (17). Truncation of the kinase domain apparently results in the lowering of the $P_{50\,(O2)}$ value. The same observation has been previously made for the *Rm*FixL protein (17) and the *Ec*DOS sensor (25).

Upon mutation of Arg^{220}, the association rate of O_2 and CO are modified in a similar manner and k_{on} values for both ligands follow the order: WT < R220E < R220Q < R220H < R220I.

The k_{off} values for CO dissociation were calculated from experimentally determined K_{CO} and $k_{on\,(CO)}$ values. A consensus value for $k_{off\,(CO)}$ at 25 °C was about 0.06 ± 0.03 s^{-1}. The k_{off} values for O_2 dissociation given Table I were determined from mixed O_2/CO atmosphere (see "Materials and Methods"). Mutation of Arg^{220} strongly influences the k_{off} rates, which follows the order: R220I ~ R220E < R220Q < R220H ~ WT. k_{off} values are very similar for *SW* Mb and for the R220H *Bj*FixLH mutant (Table I). Replacement of the histidine residue in *SW* Mb and in the R220H *Bj*FixLH mutant by a glutamine or an isoleucine leads to an increase of the k_{off} value for both proteins by a factor of 10–20 or 200–400, respectively. For Mbs in general, increased k_{off} values have been associated with weakening of H-bonding to the bound O_2 molecule (26).

Finally, $P_{50\,(O2)}$ binding coefficient were calculated from the kinetic (on and off) rates and are reported in Table I. The values obtained for the R220I, Gln, and Glu mutants are higher than for the wild-type protein, indicating a lower affinity for dioxygen. This is mainly because of a large increase of the k_{off} value. In contrast, the R220H mutant exhibits a lower $P_{50\,(O2)}$ value, largely because of an increase of the k_{on} value with respect to WT.

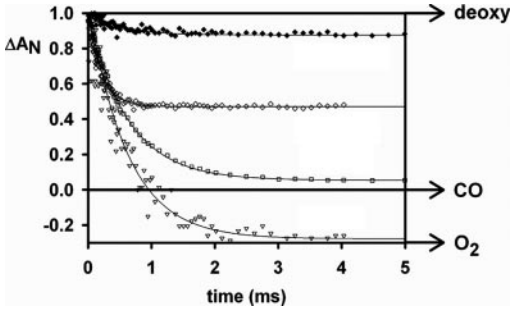


FIG. 3. **O_2 rebinding kinetics measured at pH 7.4 and 25 °C.** The change in absorbance was monitored at 436 nm, after flash photolysis of the CO-complex of the protein under 1 atm of O_2 or under air. R220I under air (◆), R220I under 1 atm O_2 (◇), R220Q under 1 atm O_2 (□), and R220H under 1 atm O_2 (▽). The R220H mutant is fully saturated under 1 atm O_2.

Raman Spectroscopy

Fe^{II}-CO Low Spin 6-Coordinated States—In the *Bj*FixLH ferrous state, CO is known to be a partial inhibitor of the phosphorylation activity of the kinase domain (14). The UV-visible absorption spectra of the Fe^{II}-CO adduct of WT *Bj*FixLH, and the mutants were almost identical (Supplemental Data Table S1). RR spectra of the Fe^{II}-CO adducts studied here (see Supplemental Data Fig. S3) all exhibit ν_2, ν_3, ν_4, and ν_{10} mode frequencies which clearly indicate that all are indeed in ferrous low spin 6-coordinated states (27). Remarkably, in the high frequency region of the RR spectra, no changes in frequency are observed for the core size sensitive (23) heme modes ν_2 and ν_3 for all mutants as compared with WT, which indicate no significant changes of the heme conformation or core size upon mutation. It is also noted that the oxidation state marker and back-bonding-sensitive ν_4 mode frequency is unaffected by the mutations. Even the CH_2 scissor mode and the $\delta_{C\beta CaCb}$ bending mode of the vinyl substituents, which serve as sensitive probes of the heme environment, observed at 1489 cm^{-1} and 414 cm^{-1} respectively, remain unaffected indicating no significant modification of the heme pocket upon mutation (23).

The Fe-CO moiety is characterized by the $\nu_{Fe\text{-}CO}$ stretching mode found at 500 cm^{-1} for the WT and by the $\nu_{C=O}$ mode seen at 1966 cm^{-1} (Fig. 4) (27). These RR frequencies are similar to those previously reported for *Bj*FixLH (28). They are also very

Downloaded from www.jbc.org by on October 30, 2006

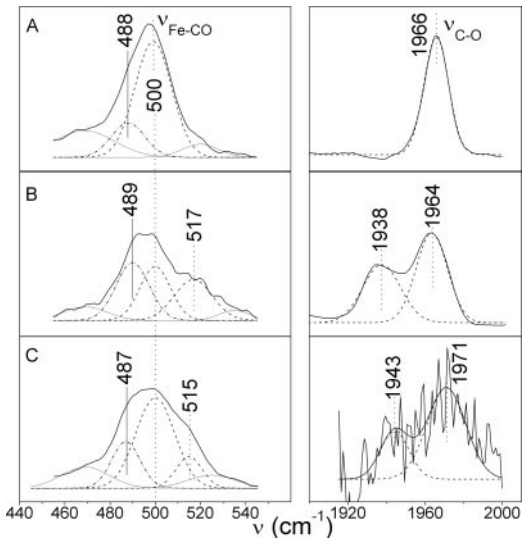


FIG. 4. **Vibrational spectra of the Fe^{II}-CO adduct for the WT protein and the R220H and R220Q mutants.** *A*, WT CO-FixLH; *B*, R220H CO-FixLH; *C*, R220Q CO-FixLH. The low frequency spectra (*left*) were recorded with a resonance Raman spectrometer, whereas the high frequency spectra (*right*) were recorded with a FT-IR spectrometer, except for the R220Q mutant, which was not enough concentrated to allow FT-IR measurements. RR spectra were recorded with λ = 413.1 nm. *Solid line* corresponds to the ν_{Fe-CO} stretching mode band simulation, whereas *dashed line* is attributed to porphyrin contributions at 500/490 cm^{-1} (see Fig. 6).

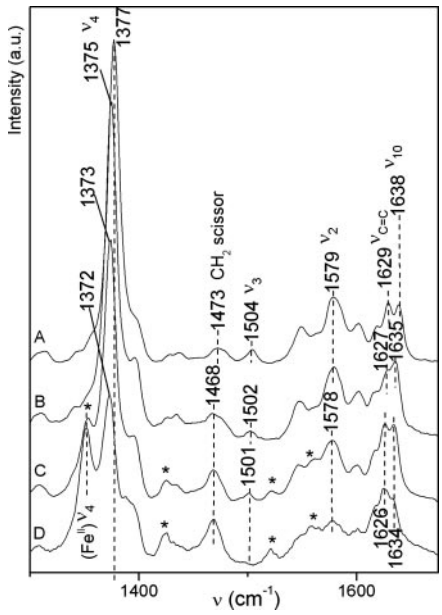


FIG. 5. **High frequency RR spectra (1300–1700 cm^{-1}) of the oxy-*Bj*FixLH forms recorded with λ = 413.1 nm at pH 7.4.** *Asterisk* indicates the Fe^{II} contribution. *A*, $^{16}O_2$ WT FixLH; *B*, $^{16}O_2$ R220H; *C*, $^{16}O_2$ R220Q; *D*, $^{16}O_2$ R220I.

similar to those of Mb at acidic pH values (29) that are reported to arise from an open heme pocket conformation in which CO has little electrostatic interaction with the surrounding amino acids. Thus, our observations indicate an open conformation and an absence of interaction between the CO ligand and the Arg^{220} in FixL, consistent with the x-ray structure of the Fe^{II}-CO adduct, which shows that the Arg^{220} remains outside of the heme distal pocket and pointing toward the heme propionate 7 group, as it does in the Fe^{II} and Fe^{III} states (20).

Lorentzian band fitting analysis (see "Materials and Methods") of the complex 500 cm^{-1} band in the RR spectrum of the WT *Bj*FixLH Fe^{II}-CO adduct (Fig. 4) reveals an intense component at 500 cm^{-1} and a less intense component at 488 cm^{-1}. The majority of the intensity of the 500 cm^{-1} component corresponds to the ν_{Fe-CO} stretching mode (28). We note that RR spectra of the 6-coordinated Fe^{II}-NO (Data not shown and Ref. 28) and Fe^{II}-O_2 adducts (Fig. 6, Ref. 24, 28, 33) all exhibit a weak 500/490 cm^{-1} band, which does not shift upon NO or O_2 isotopic editing. This weak 500/490 cm^{-1} porphyrin mode band is usually not clearly attributed but may be due to ν_{33} and/or γ_{12} modes (23). The 488 cm^{-1} component seen in the band-fitting analysis of the CO adducts is thus ascribed to this underlying weak 500/490 cm^{-1} band.

For both the R220I and R220E mutants, the ν_{Fe-CO} stretching mode frequency is observed at 494 cm^{-1}, a slightly lower frequency but still indicating an open conformation. Thus we conclude that no interaction is present between the CO ligand and Ile^{220} or Glu^{220}.

For the R220H and R220Q mutants, the ν_{Fe-CO} band clearly exhibits a shoulder around 515 cm^{-1} (see Supplemental Data Fig. S3). Both the ν_{Fe-CO} and the $\nu_{C=O}$ bands were analyzed using a Lorentzian band-fitting routine (Fig. 4). The $\nu_{C=O}$ band shows two major components, indicating two conformations for the Fe^{II}-CO adduct. The 1964 and 1971 cm^{-1} frequencies for the R220H and R220Q mutants respectively, are attributed to the open conformation also seen for the WT protein (1966 cm^{-1}). It is therefore associated with the 500 cm^{-1} ν_{Fe-O} band found in the low frequency area. The second contribution is found at 1938 and 1943 cm^{-1} for the R220H and R220Q mutants respectively, indicating a decrease in the C=O bond strength. They are attributed to a second closed conformation where the CO ligand is in interaction (*e.g.* via H-bonding from the protein to the CO ligand) reflecting more $Fe^{\delta+}=C=O^{\delta-}$ electronic character (27). The 1938 and 1943 cm^{-1} frequencies are correlated with the ν_{Fe-CO} components at 515 and 517 cm^{-1}, respectively.

For the closed Fe^{II}-CO conformations in the mutants, the frequencies observed are very similar to those reported for *SW* Mb ($\nu_{C=O}$ = 1947 cm^{-1}) and its H64Q mutant ($\nu_{C=O}$ = 1945 cm^{-1}) (30), and native Elephant Mb (ν_{Fe-CO} = 515 cm^{-1} and $\nu_{C=O}$ = 1984 cm^{-1}) where a Gln residue is present instead of the conserved His(E7) in the distal pocket (31). Thus, we propose that in the second closed conformation observed for the R220H and R220Q mutants of *Bj*FixLH, the CO ligand is interacting with either the His^{220} or the Gln^{220}, respectively. Because these two side chains are capable of donating H-bonds, the interaction is probably a H-bond

The propionate $\delta_{C\beta CcCd}$ bending mode is sensitive to H-bonding and upshifts in frequency when the propionate groups are engaged in such interactions (32). The RR band corresponding to this mode is seen at 385 cm^{-1} for the wild-type FixL protein, but is downshifted by 2 cm^{-1} in the Fe^{II}-CO adducts of all the mutants, reflecting a weakening or rupture in the H-bonding to the propionate 7 (see Supplemental Data Fig. S3). This is fully consistent with the crystallographic structures which indicate one H-bond between Arg^{220} and the propionate 7 group for the Fe^{II}-CO state in the WT protein (20). However, these H-bond ruptures in the mutant CO adducts did not significantly influence the heme conformation as indicated by lack of significant changes in the high frequency core size marker bands and the vinyl modes (see above and Supplemental Data Table S2).

Fe-O_2 States—The RR spectra of the oxygenated (1 atm of O_2 pressure) Fe^{II} *Bj*FixLH from WT, R220H, R220Q, and R220I are presented in Figs. 5 and 6. The high frequency spectra (Fig. 5, 1300–1700 cm^{-1}) of the R220Q and R220I mutants contain contributions from the Fe^{II} deoxy forms, consistent with the reduced affinity for O_2 of the R220Q and R220I mutants deduced from the UV-visible spectra. In the following, only

Downloaded from www.jbc.org by on October 30, 2006

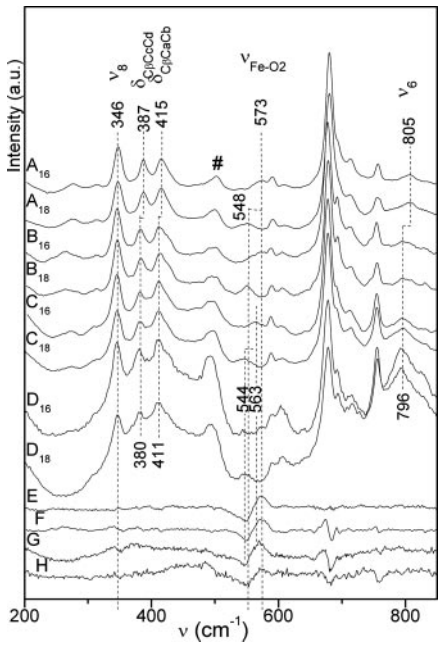


FIG. 6. **Low frequency RR spectra (200–850 cm^{-1}) of the oxy-*Bj*FixLH forms recorded with λ = 413.1 nm at pH 7.4.** #, porphyrin modes around 500/490 cm^{-1}. A_{16}, $^{16}O_2$ WT *Bj*FixLH; A_{18}, $^{18}O_2$ WT *Bj*FixLH, B_{16}, $^{16}O_2$ R220H; B_{18}, $^{18}O_2$ R220H; C_{16}, $^{16}O_2$ R220Q; C_{18}, $^{18}O_2$ R220Q; D_{16}, $^{16}O_2$ R220I; D_{18}, $^{18}O_2$ R220I; *E*, ($^{16}O_2$ − $^{18}O_2$) × 2 WT; *F*, ($^{16}O_2$ − $^{18}O_2$)*2 R220H; *G*, ($^{16}O_2$ − $^{18}O_2$) × 2 R220Q; *H*, ($^{16}O_2$ − $^{18}O_2$) × 2 R220I. For *spectra D*, Raman contributions from the quartz sampling tube are seen as very broad underlying bands centered at ~440 and 810 cm^{-1}.

the salient spectroscopic features of the Fe^{II}-O_2 adduct will be discussed; these are summarized in Supplemental Data Table 2.

An $^{18}O_2$-sensitive band at 573 cm^{-1} was observed in the low frequency WT *Bj*FixLH spectrum (Fig. 6) and attributed to the Fe-O_2 stretching mode, $\nu_{Fe\text{-}O2}$. This frequency is very similar to that reported in another *Bj*FixLH study (28) and to that observed for soluble truncated *Rm*FixL* (571 cm^{-1}) (16). For *SW* myoglobin, a band corresponding to $\nu_{Fe\text{-}O2}$ was seen at 571 cm^{-1} (33). For this latter protein, the terminal O atom of the oxygen ligand is known to be H-bonded to His^{64} and it has been reported that the Fe-O_2 frequency is not sensitive to H-bonding at the terminal O atom (33). When $^{18}O_2$ was used to form the oxy-*Bj*FixLH adduct, the $\nu_{Fe\text{-}O2}$ 573 cm^{-1} band downshifted by 25 cm^{-1} (Fig. 6). An inverse relationship is reported between the ^{18}O isotopic shift of the $\nu_{Fe\text{-}O2}$ modes and the Fe-O-O angle (34). The −25 cm^{-1} ^{18}O isotopic downshift value observed for WT FixLH is slightly smaller than the value for *SW* Mb (Table II) and consistent with a slightly larger Fe-O-O angle for oxy-*Bj*FixLH as seen in the crystallographic structures: 124° for *Bj*FixLH (15) compared with 115° for Mb (33). Consistent with other FixLH resonance Raman data, we were unable to observe a band attributable to the $\nu_{O\text{-}O}$ stretching mode using 413.1 or 406.7 nm excitation into the Soret absorption band (28). For the R220H and R220I mutants, the $\nu_{Fe\text{-}O2}$ mode is also observed at 573 cm^{-1} and the ^{18}O isotopic shift are −25 and −23 cm^{-1}, respectively. The latter value is very similar to that of WT *Bj*FixLH, implying little change in Fe-O-O geometry thus indicating no significant steric modifications upon mutation. The observations for the R220Q mutant are markedly different; the $\nu_{Fe\text{-}O2}$ mode is observed at a significantly lower frequency, 563 cm^{-1}, and the isotopic shift is only −19 cm^{-1}. Low $\nu_{Fe\text{-}O2}$ frequencies have also been previously reported in other heme proteins (Table II). In several hemoglobins, low $\nu_{Fe\text{-}O2}$ frequencies are related to strong H bonds especially with the oxygen atom bound to the iron atom (33, 35, 36). Low $\Delta\nu$ isotopic shifts have been previously related to geometric changes of the bound oxygen and an increase of the Fe-O-O angle (34). For example, *Ec*DOS exhibits a similar low 562 cm^{-1} band (Table II) and its low frequency was rationalized as resulting from a change in Fe-O-O angle induced by steric factors (28).

For our case, using a simple linear triatomic model (34), the −19 cm^{-1} ^{18}O isotopic downshift of the $\nu_{Fe\text{-}O2}$ mode we observe with the R220Q mutant corresponds to a Fe-O-O angle of 155° (37). This angle would thus correspond to a frequency of the $\nu_{Fe\text{-}O2}$ of about 523 cm^{-1}, which is even lower than the observed frequency of 563 cm^{-1}. Therefore it seems unlikely that the lowered $\nu_{Fe\text{-}O2}$ frequency observed for the R220Q mutant is caused by a dramatic change in angle and is more likely due to the presence of an H-bond to the iron-binding oxygen atom, most likely from the introduced amide side chain at position 220. It has been previously reported that the $\nu_{Fe\text{-}O2}$ mode is insensitive to H-bonding interactions at the terminal oxygen atom (29), however, downshifts of ~10 cm^{-1} for this mode have been reported for cases where H-bonds are present on the oxygen atom coordinating the iron atom (38, 39). The RR results for the R220Q mutant are indeed very similar to those reported for the heme-containing signal transducer protein (HemAT) oxygen sensor (Table II), a globin sensor protein where a H-bond to the oxygen atom binding the Fe^{II} atom is present (38). The sensitivity of the $\nu_{Fe\text{-}O2}$ mode to H/D exchange was also examined and compared with the results obtained for WT protein. In the WT protein, the $\nu_{Fe\text{-}O2}$ band downshifts by about 2 cm^{-1} upon hydrogen/deuterium exchange (data not shown). For the R220Q mutant, no downshift was observed indicating that the hydrogen donor does not have readily exchangeable protons. The $\nu_{Fe\text{-}O2}$ frequency as well as its H/D insensitivity are properties similar to those reported for *Pc*Hb, where a glutamine residue is interacting with the iron-bound oxygen atom (Table II) (39). We propose that in the R220Q mutant of *Bj*FixLH the glutamine 220 is H-bonded with the iron-bound oxygen atom (Fig. 7).

In the high frequency region (Fig. 6), the intense 1377 cm^{-1} band for WT exhibits the highest ν_4 frequency observed for the O_2 adducts. This band is seen to downshift by 2 cm^{-1} in the R220H mutant, 4 cm^{-1} in the R220Q and 5 cm^{-1} in R220I; for this latter mutant the ν_4 frequency (1372 cm^{-1}) is similar to that observed for all the mutant CO adducts (1371 cm^{-1}, see Supplemental Data Table S2). The ν_4 mode is predominantly pyrrole C_a-N stretching in character (27). Its frequency serves as an oxidation state marker and is only weakly sensitive to core size, however it is sensitive to the electronic effects of back-bonding from the Fe^{II} dπ orbitals (27). For π acid ligands such as O_2 (and CO and NO) bound to the heme Fe^{II} atom, electron withdrawal to the ligand π^* orbitals via back-bonding competes for back-bonding to the heme π^* orbitals; the ν_4 frequency increases as back-bonding to the π acid ligand increases. From the WT Fe^{II}-O_2 *Bj*FixLH crystal structure it is known that Arg^{220} is in H-bond interaction with the terminal oxygen atom of the O_2 ligand (15). The ν_4 frequency should reflect the strength of the interaction of the distal residue with the oxygen ligand; the greater this interaction, the greater the back-bonding to the O_2 ligand. The ν_4 frequencies observed for the *Bj*FixLH mutants follow the order R220I < R220Q < R220H < WT. The R220I mutant exhibits the lowest ν_4 frequency for the O_2 adducts and indicates the least degree of back-bonding consistent with the fact that the Ile side chain is incapable of donating a H-bond to the O_2 ligand. For the R220Q mutant, the H-bond interaction with the Fe-bound oxygen atom and Gln^{220} as seen in our RR experiments does not appear to strongly modify the back-bonding as its ν_4 frequency

Downloaded from www.jbc.org by on October 30, 2006

TABLE II
Observed Resonance Raman vibrational frequencies and Soret Absorption Bands for the oxy forms of BjFixL and myoglobin

Protein	λ_{Soret}	ν_4	$\nu_{Fe\text{-}O2}$	$\nu_{Fe\text{-}18O2}$	$\Delta\nu$	H-bond	Ref.
	nm	*cm^{-1}*	*cm^{-1}*	*cm^{-1}*	*cm^{-1}*		
*Bj*FixLH WT	419		569	547	−22		28
	417	1377	573	548	−25	O_T[a]-Arg^{220}	This work
R220H	417	1375	573	544	−25	O_T-His^{220}	This work
R220Q	419	1373	563	544	−19	O_B[b]-Gln^{220}	This work
R220I	421	1372	573	550	−23	None	This work
*Rm*FixL*	417	1376	571	550	−21	Nr[c]	16, 28
*Ec*DosH	417	-	562	538	−24	Nr	28
*SW*Mb WT	417	1377	571	544	−27	O_T-His^{64}(E7)	31, 33
H64L	-	-	570	543	−27	None	33
*Pc*Hb	415	1375	563	540	−23	O_B-Gln(E7) O_T-Tyr(B10)	39
HemAT	414	1372	560	-	-	O_B-X[d]	38

[a] O_T, terminal oxygen atom.
[b] O_B, Fe-bound oxygen atom.
[c] Nr, H-bond not reported.
[d] X, unidentified residue.

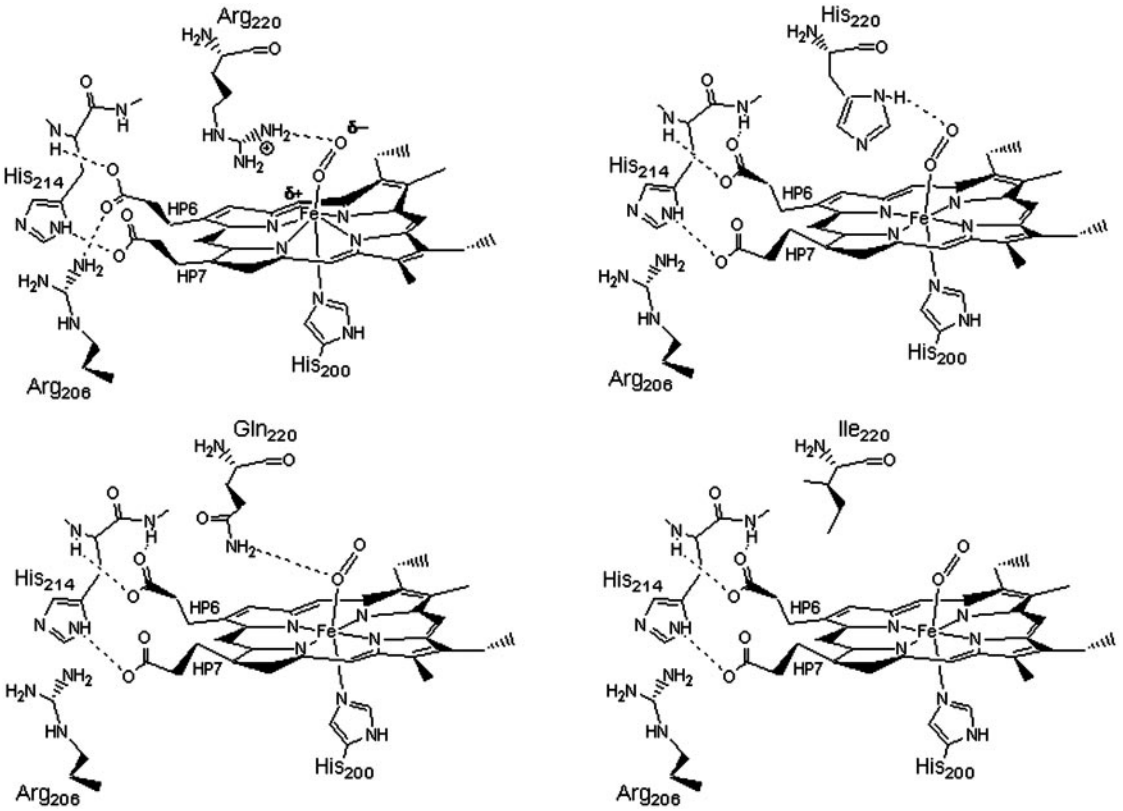


FIG. 7. **Important heme/O_2/protein interactions for the oxy-state of the WT protein and the R220H, R220Q, and R220I mutants based on the resonance Raman studies in this work.** Note the absence of the H-bond between Arg^{206} and propionate 6 in the mutants.

is comparable to that of the R220I mutant. For R220H, the $\nu_{Fe\text{-}O2}$ frequency is identical to those of WT and R220I and not sensitive to H-bond to the terminal oxygen atom (33). However, the ν_4 frequency of 1375 cm^{-1} indicates relatively greater back-bonding for the R220H mutant most likely because of the formation of a H-bond between the terminal oxygen atom and the His^{220}; this H-bonding situation is very similar for most of the myoglobin proteins (26). We notice that the ν_4 frequency is highest for the WT protein. This is fully consistent with formation of a H-bond between the terminal oxygen atom and Arg^{220} (15), and the increase in back-bonding compared with the R220H mutant can be ascribed to the positive charge of Arg^{220} in addition to the H-bond formed.

Changes in the core-size sensitive ν_3 and ν_{10} bands are also observed. This latter band is particularly sensitive to core-size changes; for WT, its frequency is so high that it is now well resolved from the $\nu_{C=C}$ vinyl stretching band (1629 cm^{-1}) and is clearly observed at 1638 cm^{-1}. The elevated frequencies observed for the dioxygen WT adduct are in line with a significantly decreased heme core-size as compared with the WT CO adduct. Thus, the WT *Bj*FixLH-O_2 adduct imparts special structural characteristics to the heme not observed for the other adducts CO and NO (data not shown). Upon Arg^{220} mutation, the ν_3 and ν_{10} bands downshift, although less for the R220H mutant than for the others, reflecting heme core size expansion of the O_2 adducts. Remarkably, these observations are in stark contrast to the insensitivity of these same bands for the mutant CO adducts

Downloaded from www.jbc.org by on October 30, 2006

(Supplemental Data Fig. S3). This clearly indicates a particular sensitivity of the heme-O_2 adduct structure toward the interaction of Arg^{220} with the O_2 ligand not seen for the other adducts. The intermediate frequencies reported for the R220H mutant indicate that the heme conformation is in between that of WT Fe^{II}-O_2 and that of the R220Q and R220I mutant adducts. We note that the ν_4 frequency discussed above is also somewhat sensitive to heme core size changes, although much less than the ν_3 and ν_{10} bands. Thus, the ν_3 and ν_{10} frequency shifts reported seem to reflect heme conformational changes such as increases in core-size and enhanced back-bonding to O_2 (as discussed below). The WT O_2 adduct exhibits the most back-bonding and the smallest core-size.

Moreover, one other band exhibits a very large downshift for the mutants: the pyrrole breathing mode ν_6 (805 to 796 cm^{-1}) (Fig. 6) (23). Its very high frequency in the WT oxy state indicates a peculiar heme conformation. The lower frequencies for those modes in the mutants are similar to those reported for the Fe^{II}-CO state (Supplemental Data Table S2) where the heme pocket reorganization related to the shift of the FG loop is not observed (20). Therefore, we propose that the ν_6 mode acts as marker bands for the unique heme conformation of the WT oxy-*Bj*FixLH form.

In both, the high and low frequency regions, modes involving the vinyl substituents are downshifted in the mutants, such as the $\nu_{C=C}$ mode (1629 to 1626 cm^{-1}) and the $\delta_{C\beta CaCb}$ mode (415 to 411 cm^{-1}). This suggests changes in the heme conformation or the heme position within the binding pocket between the WT and the mutants in the Fe^{II} oxy states. The $\delta_{C\beta CcCd}$ bending mode of the propionate groups is observed as a single prominent band at 387 cm^{-1}, a value similar to what was previously reported (384 cm^{-1}) (28). As for the Fe^{II}-CO forms, no splitting of this band is observed for the Fe^{II}-O_2 complexes. The same observation was made for *Rm*FixL* (16). The same mode is seen as a single band at 377 cm^{-1} for horse heart MbO_2 (40) and *Pc*HbO_2 (39) and at 378 cm^{-1} for *SW*MbO_2 (31) despite crystallographic structures, which indicate different H-bonding states for the propionate 6 and 7 groups for each protein. Thus our observation of a single band, despite different H-bonding patterns of the two propionate groups in *Bj*FixLH-O_2 as revealed by the crystal structure (15), is consistent with previous Raman observations for similar proteins. According to the FixL crystal structure, binding of O_2 results in the rupture of the Arg^{220}-propionate 7 H-bond and in the formation of a new H-bond between propionate 6 and Arg^{206}. Thus, the relatively high frequency of 387 cm^{-1} reflects that at least one propionate group is involved in a strong H-bond, most likely propionate 6. The sizeable downshift (7 cm^{-1}) of this band upon Arg^{220} replacement, suggests a breaking of this H-bond on the propionate 6 group in the mutants.

DISCUSSION

The data presented here clearly show that arginine 220 strongly influences the level of O_2 binding. For myoglobins, the k_{off} value is dependent on the oxy-complex structure and is lowered by H-bond formation between the bound oxygen molecule and residues in the distal pocket such that at position E7 (native histidine) (33). Mutation of His(E7) in *SW* myoglobin into leucine or other apolar residues not capable of H-bonding leads to a dramatic increase of the k_{off} value whereas the $\nu_{Fe\text{-}O2}$ frequencies are not shifted (26, 33). The k_{off} values (Table I) and the H-bonds to the O_2 ligand in the FixL Fe^{II}-O_2 adducts determined in this work (Table II) are fully consistent with the influence of H-bonding to the O_2 ligand in lowering the k_{off} values seen in the FixL mutants reported here.

For the wild-type *Bj*FixLH protein, the crystallographic structures obtained for the CO and O_2 adducts differ strongly. For the CO adduct, Arg^{220} is in H-bond interaction with the heme propionate 7 (20) and the histidine kinase remains mainly active (14). For the oxy-adduct however, Arg^{220} is pointing inside the heme distal pocket and H-bonded to the oxygen ligand (15). Our Raman results are fully consistent with these observations. Movement of the Arg^{220} together with strong exogenous ligand fixation has been proposed to induce the shift of the FG loop (14, 15, 20), resulting in the inactivation of the histidine kinase domain and structural modifications of the heme pocket responsible for the very high geminate recombination yield observed (18).

For the FixLH Fe^{II}-CO adducts, mutation of Arg^{220} resulted in the loss of the hydrogen bond between propionate 7 and residue 220, as shown in the RR spectra by the downshift of the propionate bending mode $\delta_{C\beta CcCd}$ (Supplemental Data Fig. S3). Moreover, with the histidine and glutamine mutants, our resonance Raman and FT-IR studies indicated a second closed conformation where residue 220 is interacting with the bound CO ligand indicating that residue 220 is pointing toward the heme pocket. Still, the heme conformations deduced from heme core size marker bands in RR appear to be very similar for the wild-type protein and all mutants studied here. Even the frequencies associated with the vinyl substituents (CH_2 scissor mode and $\delta_{C\beta CaCb}$), which are very sensitive to the heme pocket structure, are not influenced by the mutation. These results indicate that there is no correlation between the position of residue 220 inside or outside the heme distal pocket, and the heme core size changes. Thus, disruption of the H-bond between residue 220 and propionate 7 and movement of the Arg^{220} in the wild-type protein does not significantly alter heme conformation and distal pocket. These conclusions suggest that the movement of Arg^{220} into the distal pocket should not be solely responsible for the protein conformational changes associated with kinase deactivation.

For the FixL Fe^{II}-O_2 adducts, mutation of the Arg^{220} leads to a dramatic decrease in the oxygen affinity in all the mutants studied here, except R220H. Decrease of the oxygen affinity is mainly because of a large increase of the k_{off} values for O_2 dissociation. For the R220I mutant of the *Bj*FixLH protein, there is no observed interaction of Ile^{220} with the O_2 ligand, and the k_{off} value for O_2 is increased 300-fold to 3000 s^{-1}. For the R220Q mutant, the Gln^{220} residue is observed to be H-bonded to the Fe-bound oxygen atom of the dioxygen ligand in the oxy state (Fig. 7), as seen from our RR experiments (Fig. 6). This leads to a decrease of the k_{off} value for O_2 dissociation by a factor of 10 compared with the R220I mutant. For both R220I and R220Q mutants, the frequencies of the core-size sensitive modes, namely ν_3 and ν_{10} approach those observed for the CO adduct of *Bj*FixLH (Supplemental Data Table S2), which is known to be far less effective than O_2 in kinase inhibition in the full-length protein. This implies that the heme and/or protein conformational changes leading to kinase inactivity do not occur upon fixation of the O_2 effector molecule in the R220I and R220Q mutants, despite the fact that Gln^{220} is pointing inside the heme pocket and interacts with the bound O_2 molecule.

During the course of our work in this study, very different k_{on} and k_{off} values for O_2 binding and k_{on} for CO binding on the full-length R220A FixL mutant were reported by Dunham *et al.* (14) using different methodologies. These results are also shown in Table I for comparison. Therefore, we constructed the R220A *Bj*FixLH mutant.[2] For the *Bj*FixLH mutants R220I and R220A studied in our work, the k_{on} and k_{off} values are rather comparable and are fully self-consistent with the other mutants in our study. In particular, we obtain a high $k_{off\,(O2)}$ value consistent with the fact that the Ala side chain, like Ile, is not

Downloaded from www.jbc.org by on October 30, 2006

capable of donating a H-bond to the bound O_2 ligand. The histidine kinase domain is known to influence the binding properties of O_2 in the WT FixL and *Ec*DOS sensors (25); however this effect is not excessively large (compare the first two entries *Bj*FixL and *Bj*FixLH and compare *Ec*DOS with *Ec*DOSH in Table I). Thus, the large differences observed between the $k_{off\,(O2)}$ values for the R220A full-length (6 s^{-1}) and R220A FixLH (1750 s^{-1}) is unexpected and indeed interesting. The origin of this large discrepancy is unknown.

The R220H mutant represents an intermediate between the R220I and R220Q mutants and the WT protein, according to both the k_{off} value for O_2 dissociation and the Raman frequencies of the heme core size marker bands ν_3 and ν_{10}. As for myoglobin, the oxygen binding is stabilized via a H-bond with His^{220} for the FixL mutant studied here (Fig. 7). The ν_4 frequency indicates that this H-bond interaction is stronger than the one reported for the R220Q mutant, consistent with the large decrease of the $k_{off\,(O2)}$ value. The heme core size marker bands are also observed at higher frequencies than for the Ile and Gln mutants. Thus, the strongest interaction between residue 220 and O_2 induces conformational changes, although not for the propionate and vinyl substituents, indicating no major changes in the heme pocket structure. Finally, the structural modifications reported in the R220H mutant are not as important as in the WT protein. The results obtained for the R220H mutants are fully consistent with the conclusion drawn above for the R220Q mutant considering that neither fixation of a strong ligand nor movement of residue 220 by themselves trigger the heme conformational changes. Moreover, the results obtained indicate that formation of a strong hydrogen bond between residue 220 and the terminal oxygen atom is not responsible for the entire heme pocket conformational properties seen in the WT protein.

For the WT protein, the k_{off} value reported for O_2 dissociation is very similar to that reported for the R220H mutant, consistent with a strong hydrogen bond between Arg^{220} and O_2. However, the specific interaction of Arg^{220} with the oxygen ligand enhances the π-acidity of the O_2 ligand compared with the R220H mutant, through the double effect of an H-bond donated by Arg^{220} and the proximity of its positive charge leading to a high degree of back-bonding from iron to O_2 for WT and a very high frequency for the ν_4 mode. This results in a unique heme conformation of the WT oxy-FixLH state with a very small heme core size as indicated by the high frequencies reported for the ν_3 and ν_{10} modes. This probably implies a particular conformation of the heme, where the iron is slightly more out of plane toward O_2 (Fig. 7), together with a particular heme pocket structure as indicated by the very high frequencies reported for the propionate and vinyl bending modes. We especially inferred a strong hydrogen bond network around the propionates, probably because of the interaction of propionate 6 with Arg^{206} reported in the x-ray structure (15). All these structural changes result in the trapping of the O_2 molecule as deduced from geminate recombination experiments (18).

Functional Implications for the FixL-sensing Mechanism—An important new feature revealed in our work, that has implications for the conformational changes in FixL responsible for the functional kinase deactivation, is the observation of significant back-bonding to the oxygen and concomitant core-size changes in the heme.

Enhanced back-bonding toward O_2 should influence the strength of the Fe-His bond which is transaxial to the O_2 ligand, affecting the Fe-His distance. Indeed, for deoxyhemoglobin where the Fe-His stretching mode is easily observed in RR, an inverse linear correlation was observed between the ν_4 electron density marker mode and the Fe-His mode (41). The vibrational frequency and RR band corresponding to the Fe-His mode has not been clearly identified to date for 6-coordinated Fe^{II} hemes (27); however a candidate has been reported to be found at 271 cm^{-1} for oxymyoglobin (42). We have not identified the Fe-His stretching band in our RR spectra of the oxy-adducts.

The reduced core size in WT is not consistent with doming toward the distal side, but it is with the iron coming out of the heme plane toward O_2 (Fig. 7). This should have consequences for the Fe-His distance and geometry.

Given that the His ligand is part of the α-helix that is connected to the critical FG loop (19), the particular O_2 binding properties reported here may participate in signal transduction and ligand discrimination.

CONCLUSION

The results presented in this report clearly demonstrate the importance of the arginine 220 for the binding of O_2 and for ligand discrimination. Arg^{220} plays a crucial role in the signal transduction as discussed above because of its influence on the π acidity properties of O_2. We report a correlation between the heme conformational changes of the *Bj*FixLH protein and the interactions between the bound oxygen and the residue in position 220. Therefore, inhibition of the histidine kinase activity is expected to be lower for the mutants than the WT protein in general agreement with the findings by Dunham *et al.* (14). Our observations strongly suggest that neither fixation of a strong ligand nor displacement of the residue 220 inside the heme pocket are solely responsible for the structural reorganization of the heme. For FixL we propose that an important factor in ligand discrimination is the enhancement of the ligand π acidity by formation of a strong hydrogen-bonding network. The interaction between Arg^{220} and bound O_2 is especially effective because of the double affect of a strong H-bond and proximal positive charge. This leads to a small heme core size, and probably a more out of plane iron atom. These small conformational changes may not be detectable in the x-ray crystal structures. However, displacement of the iron may affect the proximal His^{200}, and therefore the helix containing both the His^{200} and Arg^{206} residues and thereby participate in the heme pocket reorganization responsible for signal transduction.

Acknowledgment—We thank Klara Hola (Ecole Polytechnique) for preparing the R220A FixLH protein.

REFERENCES

1. Gilles-Gonzalez, M-A., Ditta, G. S., and Helinski, D. R. (1991) *Nature* **350,** 170–172
2. Delgado-Nixon, V. M., Gonzalez, G., and Gilles-Gonzalez, M-A. (2000) *Biochemistry* **39,** 2685–2691
3. Chang, A. L., Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M., and Gilles-Gonzalez M-A. (2001) *Biochemistry* **40,** 3420–3426
4. Denninger, J. W., and Marletta, M. A. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1411,** 334–350
5. Aono, S., Nakajima, H., Saito, K., and Okada, M. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228,** 752–756
6. Shelver, D., Kerby, R. L., He, Y., and Roberts, G. P. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94,** 11216–11220
7. Dioum, E. M., Rutter, J., Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M-A., and McKnight, S. L. (2002) *Science* **298,** 2385–2387
8. Vreede, J., van der Horst, M. A., Hellingwerf, K. J., Crielaard, W., and van Aalten, D. M. F. (2003) *J. Biol. Chem.* **278,** 18434–18439
9. Safran, M., and Kaelin, W. M., Jr. (2003) *J. Clin. Investig.* **111,** 779–783
10. Sciotti, M-A., Chanfon, A., Hennecke, H., and Fischer, H-M. (2003) *J. Bacteriol.* **185,** 5639–5642
11. Nellen-Anthamatten, D., Rossi, P., Preisig, O., Kullik, I., Babst, M., Fischer, H. M., and Hennecke, H. (1998) *J. Bacteriol.* **180,** 5251–5255
12. Gilles-Gonzalez, M-A., Gonzalez, G., and Perutz, M. F. (1995) *Biochemistry* **34,** 232–236
13. Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Dioum, E. M., and Gilles-Gonzalez, M-A. (2002) *Biochemistry* **41,** 6170–6177
14. Dunham, C. M., Dioum, E. M., Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Scott, W. G., and Gilles-Gonzalez, M-A. (2003) *Biochemistry* **42,** 7701–7708
15. Gong, W., Hao, B., and Chan, M. K. (2000) *Biochemistry* **39,** 3955–3962
16. Tamura, K., Nakamura, H., Tanaka, Y., Oue, S., Tsukamoto, K., Nomura, M.,

Downloaded from www.jbc.org by on October 30, 2006

Tsuchiya, T., Adachi, S., Takahashi, S., Iizuka, T., and Shiro, Y. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118,** 9434–9435
17. Gilles-Gonzalez, M. A., Gonzalez, G., Perutz, M. F., Kiger, L., Marden, M. C., and Poyart, C. (1994) *Biochemistry* **33,** 8067–8073
18. Liebl, U., Bouzhir-Sima, L., Négrerie, M., Martin, J-L., and Vos, M. H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 12771–12776
19. Gong, W., Hao, B., Mansy, S. S., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M-A., and Chan, M. K. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95,** 15177–15182
20. Hao, B., Isaza, C., Arndt, J., Soltis, M., and Chan, M. K. (2002) *Biochemistry* **41,** 12952–12958
21. Park, H., Suquet, C., Satterlee, J. D., and Kang, C. (2004) *Biochemistry* **43,** 2738–2746
22. Uzan, J., Dewilde, S., Burmester, T., Hankeln, T., Moens, L., Hamdane, D., Marden, M. C., and Kiger, L. (2004) *Biophys. J.* **87,** 1196–1204
23. Hu, S., Smith, K. M., and Spiro, T. G. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118,** 12638–12646
24. Lukat-Rodgers, G. S., and Rodgers, K. R. (1997) *Biochemistry* **36,** 4178–4187
25. Taguchi, S., Matsui, T., Igarashi, J., Sasakura, Y., Araki, Y., Ito, O., Sugiyama, S., Sagami, I., and Shimizu, T. (2004) *J. Biol. Chem.* **279,** 3340–3347
26. Springer, B. A., Sligar, S. G., Olson, J. S., and Phillips, G. N., Jr. (1994) *Chem. Rev.* **94,** 699–714
27. Spiro, T. G., and Li, X-Y. (1988) in *Biological Applications of Raman Spectroscopy* (Spiro, T. G., ed) Vol. III, pp. 1–37, Wiley Interscience, NY
28. Tomita, T., Gonzalez, G., Chang, A. L., Ikeda-Saito, M., and Gilles-Gonzalez, M-A. (2002) *Biochemistry* **41,** 4819–4826
29. Ramdsen, J., and Spiro, T. G. (1989) *Biochemistry* **28,** 3125–3128
30. Li, T., Quillin, M. L., Phillips, G. N., and Olson, J. S. (1994) *Biochemistry* **33,** 1344–1446
31. Kerr, E. A., Yu, N-T., Bartinicki, D. E., and Mizukami, H. (1985) *J. Biol. Chem.* **260,** 8360–8365
32. Peterson, E. S., Friedman, J. M., Chien, E. Y. T., and Sligar, S. G. (1998) *Biochemistry* **37,** 12301–12319
33. Hirota, S., Li, T., Phillips, G. N., Olson, J. S., Mukai, M., and Kitagawa, T. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118,** 7845–7846
34. Takahashi, S., Ishikawa, K., Takeuchi, N., Ikeda-Saito, M., Yoshida, T., and Rousseau, D. L. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117,** 6002–6006
35. Couture, M., Yeh, S-R., Wittenberg, B. A., Wittenberg, J. B., Ouellet, Y., Rousseau, D. L., and Guertin, M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96,** 11223–11228
36. Das, T. K., Couture, M., Ouellet, Y., Guertin, M., and Rousseau, D. L. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98,** 479–484
37. Desbois, A., Momenteau, M., and Lutz, M. (1989) *Inorg. Chem.* **28,** 825–834
38. Aono, S., Kato, T., Matsuki, M., Nakajima, H., Ohta, T., Uchida, T., and Kitagawa, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 13528–13538
39. Das, T. K., Weber, R. E., Dewilde, S., Wittenberg, J. B., Wittenberg, B. A., Yamauchi, K., Van Hauwaert, M-L., Moens, L., and Rousseau, D. L. (2000) *Biochemistry* **39,** 14330–14340
40. Hirota, S., Ogura, T., Appelman, E. H., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., and Kitagawa, T. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116,** 10564–10570
41. Rousseau, D. L., and Ondrias, M. R. (1983) *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **12,** 357–380
42. Walters, M. A., and Spiro, T. G. (1982) *Biochemistry* **21,** 6989–6995

The Journal of Biological Chemistry
Downloaded from www.jbc.org by on October 30, 2006

4. Article IV

Functional Implications of the Propionate 7-Arginine 220 Interaction in the FixLH Oxygen Sensor from *Bradyrhizobium japonicum*

V. Balland, L. Bouzhir-Sima, E. Anxolabéhère-Mallart,A. Boussac, M. H. Vos, U. Liebl, and T. A. Mattioli

Biochemistry **2006, 45: 2072-2084**

Functional Implications of the Propionate 7−Arginine 220 Interaction in the FixLH Oxygen Sensor from *Bradyrhizobium japonicum*†

V. Balland,‡ L. Bouzhir-Sima,§ E. Anxolabéhère-Mallart,⊥ A. Boussac,‡ M. H. Vos,§ U. Liebl,§ and T. A. Mattioli*,‡

Laboratoire de Biophysique du Stress Oxydant, SBE/DBJC and CNRS URA 2096, CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France, Laboratoire d'Optique et Biosciences, INSERM U696, CNRS UMR 7645, Ecole Polytechnique-ENSTA, 91128 Palaiseau, France, and Laboratoire de Chimie Inorganique, UMR CNRS 8613, 91405 Orsay Cedex, France

Received August 25, 2005; Revised Manuscript Received December 19, 2005

ABSTRACT: *Bj*FixL from *Bradyrhizobium japonicum* is a heme-based oxygen sensor implicated in the signaling cascade that enables the bacterium to adapt to fluctuating oxygen levels. Signal transduction is initiated by the binding of O_2 to the heme domain of *Bj*FixL, resulting in protein conformational changes that are transmitted to a histidine kinase domain. We report structural changes of the heme and its binding pocket in the Fe^{II} deoxy and Fe^{III} met states of the wild-type *Bj*FixLH oxygen sensor domain and four mutants of the highly conserved residue arginine 220. UV−visible, electron paramagnetic resonance, and resonance Raman spectroscopies all showed that the heme iron of the R220H mutant is unexpectedly six-coordinated at physiological pH in the Fe^{III} state but undergoes pH- and redox-dependent coordination changes. This behavior is unprecedented for FixL proteins, but is reminiscent of another oxygen sensor from *E. coli*, *Ec*Dos. All mutants in their deoxy states are five-coordinated Fe^{II}, although we report rupture of the residue 220−propionate 7 interaction and structural modifications of the heme conformation as well as propionate geometry and flexibility. In this work, we conclude that part of the structural reorganization usually attributed to O_2 binding in the wild-type protein is in fact due to rupture of the Arg220−P7 interaction. Moreover, we correlate the structural modifications of the deoxy Fe^{II} states with k_{on} values and conclude that the Arg220−P7 interaction is responsible for the lower O_2 and CO k_{on} values reported for the wild-type protein.

Heme-based sensors are key regulators of adaptive responses to environmental fluctuations and control the activity of a neighboring domain (*1*, *2*). One class of sensor proteins contains the heme cofactor within a sensory PAS domain. PAS domains exhibit a conserved structural fold and are proposed to share a common conformational flexibility, potentially related to a mechanism for signal transduction (*3*).

The rhizobial FixL proteins are the best studied heme-PAS sensors and respond to fluctuating oxygen levels in the bacterial environment. FixL proteins possess a histidine kinase domain, responsible for the phosphorylation of a transcription factor FixJ, and a heme domain (FixLH[1]), where O_2 binding and initial oxygen sensing occur (*4*). The FixL sensor domains contain a *b*-type heme as a prosthetic group with a proximal histidine as axial ligand, and signal transduction is driven by structural modifications of the heme pocket upon ligand binding. More recently, other heme-PAS sensors were identified, such as NPAS2, sensing CO (*5*), *Ax*PDEA1, sensing O_2 (*6*), and *Ec*Dos, which seems to be sensitive to the O_2 level (*7*) and the redox state of the iron (*8*, *9*). The crystallographic data reported for the Fe^{II} and Fe^{III} states of *Ec*Dos indicate ligand switching upon oxidation, consistent with previous spectroscopic studies. Upon oxidation, two water molecules enter the heme pocket and replace the Met95 ligand, leading to a six-coordinated low-spin aquo−Fe^{III} complex (*8*).

Crystallographic structures of the deoxy (Fe^{2+}) and met (Fe^{3+}) redox states of FixL hemodomains indicate a highly hydrophobic heme pocket associated with a five-coordinated high-spin iron (*10*−*14*). The high degree of hydrophobicity of the heme pocket is due to the presence of a hydrophobic triad corresponding to residues Ile215/Leu236/Ile238 in *Bj*FixLH (*10*) (Figure 1) and Ile209/Leu230/Val232 in *Rm*FixL (*13*), whose side chains point toward the heme iron. Unlike myoglobin (*15*), no water molecule is reported in the

† T.A.M. gratefully acknowledges financial support from the Regional Council of the Ile-de-France for an equipment grant (S. E. S. A. M. E.).

* To whom correspondence should be addressed: Service de Bioénergétique, Département de Biologie Joliot-Curie, CEA Saclay, 91191, Gif-sur-Yvette Cedex, France. Phone: +33 169 08 41 66. Fax: +33 169 08 87 17. E-mail: tony.mattioli@cea.fr.

‡ Laboratoire de Biophysique du Stress Oxydant.

§ Laboratoire d'Optique et Biosciences.

⊥ Laboratoire de Chimie Inorganique.

[1] Abbreviations: *Ax*PDEA1, phosphodiesterase 1 from *Acetobacter xylinum*; *Bj*, *Bradyrhizobium japonicum*; 5c, five-coordinated; 6c, six-coordinated; *Ec*Dos, direct oxygen sensor from *E. coli*; EPR, electron paramagnetic resonance; FixL*, soluble truncated FixL; FixLH, hemodomain of FixL; FG loop, Thr209 to His220 in *Bj*FixLH; Hb, Hemoglobin; HI, hydrophobicity index; HS, high spin; LS, low spin; Mb, myoglobin; NHE, normal hydrogen electrode; NPAS2, neuronal PAS domain protein 2; P-6 and P-7, heme propionate 6 and 7, respectively; *Rm*, *Rhizobium meliloti*; RR, resonance Raman; *SW*, sperm whale; WT, wild type.

10.1021/bi051696h CCC: $33.50 © 2006 American Chemical Society
Published on Web 01/31/2006

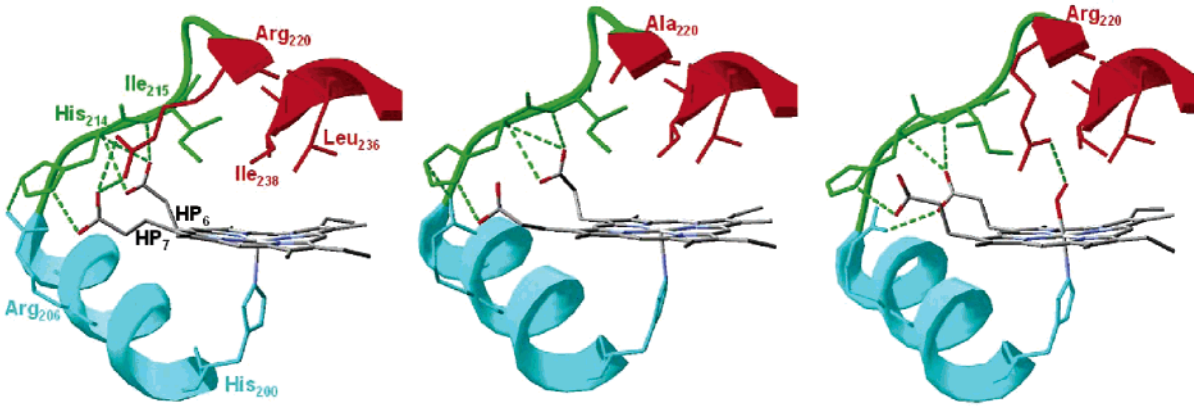


FIGURE 1: Crystallographic structures of the met wild-type (left, PDB entry 1DRM (*10*)), R220A met (middle, DB entry 1Y28 (*17*)), and oxy wild-type (right, PDB entry 1DP6 (*11*)) states of *Bj*FixLH. Arg220 (or Ala220), Leu236, Ile238, and G β-sheets are in red, Arg206 and F α-helix are in cyan, His214, Ile215, and FG loops are represented in green. The heme propionates 6 and 7 are labeled HP6 and HP7, respectively.

vicinity of the heme iron. Ile209 has been shown to be predominantly responsible for the high degree of hydrophobicity of the *Rm*FixL heme pocket and to prevent entrance of a water molecule into the distal pocket (*16*). In both the Fe^{II} and the Fe^{III} states of the wild-type FixL proteins, the conserved hydrophilic positively charged Arg220 (*Bj*FixL) or Arg214 (*Rm*FixL) is interacting with the solvent-exposed heme propionate 7 group and water molecules and is thus pointing away from the iron atom (*10*, *11*, *13*). *Bj*FixL Arg220 is proposed to be a key residue for signal transduction; however, this residue is not essential to maintain the heme pocket structure in the met state. Indeed, the X-ray structure of the Fe^{III} R220A mutant of *Bj*FixLH has been reported (*17*), in which no shift of the FG loop or of the Ile215/Leu236/Ile238 residues is observable as compared to the wild-type protein (Figure 1). This mutant exhibits fully active histidine kinase activity in both its Fe^{II} and Fe^{III} states.

O_2 is a potent inhibitor of FixL phosphorylation activity (*17*, *18*). Upon O_2 binding, structural changes in the FG loop ("FG loop switch") occur as deduced from X-ray crystallography (*11*). This stuctural change is somehow associated with enzymatic inhibition, presumably via structural changes at the kinase domain, through a mechanism not yet understood.

Upon diatomic ligand binding (O_2, CO, NO, or CN^-) to *Bj*FixLH, the heme becomes six-coordinated (6c) low-spin (LS) and the crystallographic structures exhibit one common feature, that is, the movement of the Ile238 side chain toward the heme vinyl substituents to decrease the steric constraints around the binding site (*11*, *12*). On the basis of a recent high-resolution structure of the Fe^{II}−CO state, it is also proposed that the Ile215 and Leu236 side chains are slightly displaced upon ligand fixation (*14*). These observations further support the early proposal of Perutz et al. (*19*) that conformational changes responsible for kinase inactivation are partially driven by steric hindrance between the heme ligand and the hydrophobic triad residues. Still, CO and NO are only weak inhibitors of the histidine kinase domain (*17*, *18*). In the particular case of strong histidine kinase inhibitors such as O_2, modifications of the heme pocket structure are noted (*11*, *12*), including a shift of the critical FG loop, together with a large displacement of Ile215 and Arg220, the latter being shifted toward the heme pocket where it interacts via hydrogen bonds with both the bound ligand and a surrounding water molecule (Figure 1) (*12*). This results in highly efficient O_2 geminate recombination (*20*) together with strong inhibition of the histidine kinase domain (*17*). Thus, positions of residues Ile215 and Arg220 are indicative for structural modifications of the FG loop and the heme pocket resulting in signal transduction and efficient histidine kinase inactivation. Recently, we demonstrated that both the movement of Arg220 inside the heme pocket and its influence on the π-acidity properties of O_2 play a crucial role in the structural reorganization of the heme pocket implied in signal transduction (*21*). These observations are consistent with the recent hypothesis of multicoordinate ligand-coupled signaling (*22*).

In the present article, we describe the structural modifications of *Bj*FixLH in the Fe^{II} deoxy and Fe^{III} met resting states resulting from mutation of Arg220. The point mutations were chosen to modify the electrostatic properties and H-bonding capabilities of the residue 220, with minor steric modifications of the side chain (e.g., Arg220 was substituted by His, Ile, Gln, and Glu). A resonance Raman characterization of the Fe^{II}−O_2 and Fe^{II}−CO states of the same series of mutants as well as the measured association and dissociation rates for O_2 and CO binding was recently reported by us (*21*). In the present article, resonance Raman spectroscopy, EPR, and spectroelectrochemical titrations were used to obtain further detailed insight in the structural and electrostatic role of Arg220 in both the deoxy Fe^{II} and met Fe^{III} redox states, linked to the association rate for O_2 and CO binding. Particuliar attention was accorded to the R220H mutant, which exhibits strong pH-dependent modification of its heme pocket structure in the met Fe^{III} state as compared to the wild-type protein. Together with previous results obtained for O_2 fixation, our data indicate that this mutant is oxygen- as well as redox-sensitive, properties that are proposed to play important roles in *Ec*Dos, another O_2 sensor (*7*−*9*).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Protein Expression and Purification. Wild-type and mutant protein overexpression in *E. coli* and purification were performed as previously described in Balland et al. (*21*).

Sample Preparation. All protein samples were prepared in 50 mM Tris buffer at pH 7.4 and in 50 mM acetate buffer at pH 4.40. The deoxy form of *Bj*FixLH was prepared by

reduction in deoxygenated buffer by addition of freshly prepared degassed sodium dithionite (200 μM final concentration) (Sigma) stock solution in 18 MΩ deionized water. These samples were conditioned under argon gas, anaerobically sealed with gastight rubber septums, and transferred, when required, using gastight syringes (Hamilton).

UV−Visible Absorption Spectroscopy. Optical absorbance measurements were made using a UVIKON 922 (Kontron) spectrophotometer with a 70-μL airtight quartz cell (Hellma) with a path length of 1 cm. The protein concentration was 20 μM, and the measurements were performed at ambient temperature. For the pH dependence analysis of the R220H mutant, 5 μL of a concentrated protein solution in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) was diluted into 100 μL of a 100 mM buffer solution at the required pH. Acetate buffer was used for pH in the range [3.8−5.0]. MES buffer was used for pH in the range [5.2−6.7]. Phosphate buffer was used for pH in the range [6.0−8.0]. Tris-HCl buffer was used for pH in the range [7.0−8.0]. At pH 3.8, we noticed in time an increase in the baseline of the UV−visible absorption spectra of the proteins, probably due to some denaturation of the protein. For the electrochemical, EPR, and RR spectroscopic measurements reported here, samples were never poised below pH 4.4, where we observed no indications of protein denaturation.

EPR Measurements. X-band EPR spectra were recorded using a standard ER 4102 (Bruker) X-band resonator with a Bruker ESP300 X-band spectrometer equipped with an Oxford Instruments cryostat (ESR 900). The samples were frozen at 198 K and degassed as previously described (*23*) and then transferred to a liquid nitrogen bath (77 K) before measurements were taken at 4 and 26 K. Determination of *g*-values was done using an ER032M gaussmeter (Bruker). Protein samples were 100 μL of a 100 μM solution. Concentrated protein solutions were obtained by using a 10 kDa cutoff Centricon membrane concentrator (Amicon). At pH 7.4, Tris-HCl buffer was not used because of its sensitive temperature dependence (*24*), and it was replaced by a 100 mM Hepes buffer at pH 7.45.

Spectroelectrochemical Titrations. The UV−visible optical absorption spectra during oxidation−reduction titrations were recorded using a Varian 5E spectrophotometer. The thin layer cell used for room-temperature UV−vis experiments was previously described (*25*). The optical path length of the cell was 0.5 mm. A gold mesh working electrode was immersed in the optical cell. A platinum wire and SCE electrodes were used as counter and reference electrodes, respectively. The potential was controlled by a potentiostat (EGG PAR M362), and the current at the counter electrode was measured. The following redox mediators (2 μM each) were added to the sample solution: phenazine methosulfate, gallocyanine, indigo trisulfonate, 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, anthraquinone 2-sulfonate, benzyl viologen, and methyl viologen. The FixLH solution (25 μM) containing the mediator dyes was degassed and flushed with argon prior to the measurements, and 100 μL of the solution was transferred into the optical cell. The upper reservoir section (7 mL) of the electrochemical cell was filled with a degassed buffer solution containing the mediator dyes at the same concentration. All potential values are given using NHE as reference.

During the electrochemical redox titrations, the electronic absorption spectra were measured after the current reached a value < 0.5 μA (10−15 min). The potential was varied from 250 to −150 mV vs NHE. The absorption spectrum at 250 mV was identical to that of ferric FixLH as isolated, exhibiting a Soret band maximum at 395 nm. A −150 mV potential was applied for 20 min before oxidative titration from −150 mV to 250 V. After the oxidative titration, the potential was swept negatively to re-reduced the protein. The data were analyzed using the Nernst equation (*26*): Fraction $Fe^{II} = \{\exp[(E_{1/2} - E_m)*nF/RT] + 1\}^{-1}$, where n is the number of electrons, E_m is the measured potential, and $E_{1/2}$ is the midpoint potential of interest ($F = 96493$ J·V^{-1}, $R = 8.31$ J·mol^{-1}·K^{-1}).

Resonance Raman Spectroscopy. Resonance Raman spectra were recorded as described previously (*24*) using a modified single-stage spectrometer T64000 (Jobin-Yvon) equipped with a liquid nitrogen-cooled back-thinned CCD detector and 1800 grooves/mm holographic gratings. Samples for the resonance Raman measurements were prepared at a protein concentration of 20 μM. Spectra were recorded at room temperature in a spinning cell (diameter 2 mm) to prevent photodissociation and avoid local thermal degradation of the protein during the measurements. In some cases, RR spectra were recorded at low temperature (15 K) using a circulating cold He gas cryostat (Janis Research, STVP-100) to compare with low temperature EPR measurements. To accurately determine small differences in RR band frequencies, the monochromator was calibrated using the laser excitation wavelength and a saturated sulfate solution and samples were recorded the same day without changing light excitation/collection geometry. Spectral frequencies are estimated to have reproducibilities of ±1 cm^{-1}. Reported spectra at 413.1 nm were the result of the averaging of, typically, 200 single spectra, each recorded with 30 s of CCD exposure time. Reported spectra at 441.6 nm were the result of the averaging of approximately 600 single spectra recorded with 5 s of exposure time. Spectral resolution was about 3 cm^{-1}. Baseline corrections were performed using GRAMS 32 software (Galactic Industries). The band assignments are proposed by analogy with myoglobin (*27*).

RESULTS

UV−Visible Spectroscopy. The UV−visible absorption spectra of the *Bj*FixLH wild-type and mutant proteins were recorded in the range 200−800 nm at pH 7.4; representative spectra are shown in Figure 2. For the Fe^{II} states (Table 2), the mutations did not significantly alter the observed Soret bands around 431 nm (Table 2), characteristic of five-coordinated high-spin (5c HS) heme b-type Fe^{II} states (*28*). For the Fe^{III} states (Table 1), the iron is 5c HS with a Soret band at 395 nm for the wild-type protein (Figure 2) as for the R220Q, R220I, and R220E mutants. However, for the R220H mutant in the Fe^{III} state at pH 7.4 (Figure 2), the Soret band maximum is shifted to 408 nm at the same pH conditions as WT and the other mutants; there are also spectral differences observed in the 500−550 nm region. These spectral differences are attributed to a six-coordination state for the high-spin Fe^{III} in the met R220H mutant. The observed Soret band maximum for the R220H mutant (408 nm) occurs at a wavelength similar to that of the 6c HS Fe^{III} states of *SW*Mb and of the I209H *Rm*FixL mutant (Table 1), which both have a water molecule coordinated to the Fe^{III}

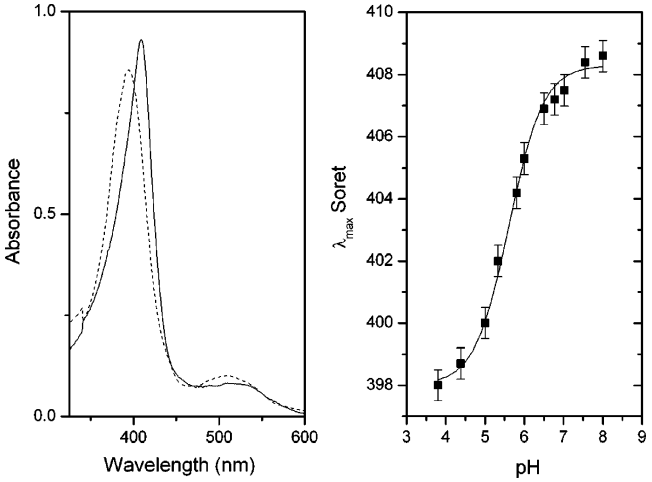


FIGURE 2: (Left) UV−visible spectra recorded at pH 7.4 for wild-type *Bj*FixLH (—) and the R220H mutant (− − −). (Right) pH titration of the R220H mutant obtained by UV−visible absorption. The solid line corresponds to the two-state Henderson−Hasselbach fit.

in the distal pocket (*29*, *30*). The pH dependence of the UV−visible spectrum from the R220H mutant was studied in the pH range 3.8−8.0. Upon acidification of the solution, the Soret band maximum progressively blue-shifted, down to 397 nm at pH 3.8. Thus, at pH 3.8 the R220H spectrum appears as that of WT protein pH 7.4 indicative of 5c HS Fe^{III}. This pH-dependent behavior implies that the sixth ligand on the R220H heme Fe^{III} center at pH 7.4 is displaced in acidic media. We analyzed the spectrophotometric titration curve using a simple two-state Henderson−Hasselbach plot (Figure 2) and found that a single protonatable group is involved with an apparent value of $pK_a = 5.7$.

EPR Measurements. The Fe^{III} met states of the *Bj*FixLH wild-type protein and mutants were studied by EPR spectroscopy to confirm the spin states of the iron. For the WT protein, the EPR spectrum indicates an $S = {}^5/_2$ high-spin Fe^{III} state with resonances at $g_1 = 6.16$, $g_2 = 5.51$, but g_3 is not clearly defined (Figure 3, Table 1). The percent rhombicity R for the wild-type *Bj*FixLH is 4.0 ($R = [\Delta g/16] \times 100$, where $\Delta g = |g_1 - g_2|$ (*31*)). These g and R values are similar to those reported for 5c HS Fe^{III} states for *Rm*FixL with $R = 2.5$ (*30*) and for the H64L mutant of *SW*Mb with $R = 3.4$ (Table 1) (*29*). For the R220I and Q mutants, the g values are very similar to those of the wild-type protein (Table 1), indicating that the Fe^{III} coordination geometry and immediate environment are not modified upon mutation.

For the R220H mutant, the EPR spectrum recorded at pH 7.45 exhibits a $g = 6$ signal with three components (Figure 3): a sharp $g = 5.88$ signal and two other resonances around $g = 6.30$ and $g = 5.30$. These features are very similar to those reported for the HS Fe^{III} state of the *SW*Mb H64Q mutant in Hepes buffer (Table 1) (*29*) where it had first been proposed that the three resonances were due to two species in solution, one being five-coordinated and a second being six-coordinated with a water ligand. However, a later high-resolution crystal structure of the H64Q mutant indicates a bound water molecule (*15*). Thus, for the *Bj*FixLH R220H mutant it is most likely that the EPR spectrum is reflecting two six-coordinated HS conformers of the protein, one axial corresponding to the $g = 5.88$ resonance and a second more rhombic with $R = 6.2$. This conclusion is fully consistent with the RR data obtained at 15 K and at room temperature which indicate the presence of only 6c HS heme Fe^{III} species (see below).

For the *Bj*FixLH R220H mutant here, the EPR spectrum is modified upon acidification of the solution. At pH 4.4, the spectrum exhibits two components corresponding to the following g values, $g_1 = 6.06$ and $g_2 = 5.54$ (g_3 is not detected) and $R = 3.25$, which are similar to those of the wild-type Fe^{III} *Bj*FixLH, implying a 5c HS Fe^{III} and thus the removal of the sixth Fe^{III} ligand in the R220H mutant upon acidification.

Electrochemical Redox Titrations. Figure 4B shows the oxidative redox titrations at pH 7.4 of the Fe^{II} deoxy *Bj*FixLH WT and the R220I, R220Q, and R220E mutants. Full oxidation−reduction reversibility without hystereses and well-defined isobestic points at 415 and 458 nm were observed in the UV−visible absorption spectra (Figure 4). The measured heme iron $E_{1/2}$ midpoint potential value for the wild-type *Bj*FixLH was 68 mV vs NHE. For the R220Q, R220I, and R220E mutants, $E_{1/2}$ values were found at 41, 38, and 24 mV, respectively (Table 1). Thus, replacement of the nearby positively charged arginine residue by the electrically neutral isoleucine or glutamine residues both lowered the $E_{1/2}$ potential of the heme iron by about 30 mV. The trend and magnitude of this effect is completely consistent with the removal of a positive charge in the vicinity of the heme group (*32*). For the R220E mutant, the $E_{1/2}$ potential value is found at 24 mV, about 50 mV lower than WT, and about 20 mV more negative than that seen for the mutants with electrically neutral amino acid residues at position 220. We argue that the additional lowering of the midpoint potential for the R220E mutant reflects a deprotonated negatively charged glutamate residue near the heme. This proposal is further supported by analysis of the Raman spectrum of the R220E mutant (see below).

The electrochemical titration of the R220H mutant is fully reversible at pH 7.4 with well-defined isobestic points at 419 and 462 nm. The measured heme iron $E_{1/2}$ midpoint potential value for this mutant is 40 mV vs NHE (see Supporting Information Figure S1), a value very similar to that reported for *SW* myoglobin (Table 1) that exhibits a six-coordinated Fe^{III} state and a five-coordinated Fe^{II} state (*33*). The reversibility of the redox titration is indicative of a rapid chemical equilibrium between the 5c and 6c redox states, and the 40 mV redox potential reported corresponds to the redox couple His−Fe^{III}−X/His−Fe^{II}, where X is the sixth ligand in the oxidized state. Therefore, this redox potential may not be directly compared to those reported for the wild-type protein and the other mutants as it does not implicate the same redox couple.

Resonance Raman Spectroscopy. Fe^{III} Met FixLH States. In the high-frequency region (Figure 5), the coordination/spin state-sensitive ν_2 and ν_3 and redox state ν_4 marker bands of the WT *Bj*FixLH met protein at pH 7.4 are observed at 1564, 1494, and 1373 cm^{-1}, respectively, clearly indicating a ferric 5c HS heme iron (*34*, *35*). The RR spectra are similar for the R220I, Q, and E mutants and indicate that the spin and coordination states of the iron do not change upon Arg220 replacement by these residues, consistent with the UV−visible absorption spectra (Table 1). However, the core-size-sensitive ν_3 and ν_2 modes downshift by 2 or 3 cm^{-1} in these mutants, indicating an expanded heme core size (*34*),

Table 1: Spectroscopic Properties of the Fe^{III} Met States for WT *Bj*FixLH and Mutants at Position 220

	ligation	λ_{Soret}	$E_{1/2}$	*g* values	ν_4	ν_3	ν_2	ref
*Bj*FixL	His/	395	−	−	1370	1493	1562	35
*Bj*FixLH WT	His/	395	68	6.16, 5.51	1373	1494	1564	this work
R220H pH 7.4	His/OH_2	408	40	6.30, 5.88, 5.30	1370	1478	1556	this work
R220H pH 4.4	His/	398	−	6.06, 5.54	1371	1492	1562	this work
R220Q	His/	395	39	6.20, 5.45	1370	1492	1561	this work
R220I	His/	395	42	6.20, 5.45	1370	1494	1563	this work
R220E	His/	396	24	−	1371	1493	1562	this work
*SW*Mb WT	His/OH_2	409	59	5.97[b]	1373	1485	1567	29, 33
H64Q	His/OH_2	409	−	6.29, 5.95, 5.53[b]	−	−	−	29
H64L	His/	395	84	6.09, 5.54, 2.0[b]	−	−	−	29, 33
*Rm*FixL WT	His/	397	−	6.16, 5.75	1371	1492	1562	30
I209H	His/OH_2	409	−	−	1370	1478	1554	16
I210H	His/His	414	−	−	1374	1505	1562	16
*Ec*DOS WT	His/OH_2	416	67	−	1372	1505	1577	7, 8, 35, 50

[a] λ values are given in nanometers. Potentials are given in mV versus NHE. Raman vibrational frequencies are given in cm^{-1}. [b] EPR values are taken from the measurements in the Hepes buffer at pH 7.

Table 2: Spectroscopic Properties of the Fe^{II} Deoxy States for WT *Bj*FixLH and Mutants at Position 220[a]

	λ_{Soret}	ν_{Fe-His}	ν_8	$I_{\nu 8}$[b]	P-6[c]	I_{P-6}[b]	P-7[d]	I_{P-7}[b]	ν_4	ν_3	ν_2	ref
*Bj*FixLH						−						
WT		218		−	nr[e]		nr	−	1353	1469	1555	35
WT	431	219	341	1.4	365 1His214 1Ile215	0.6	381 1Arg220 1His214	0.5	1354	1469	1555	this work
R220H	434	219	344	1.1	362	0.6	376	0.9	1352	1468	1554	this work
R220Q	432	217	341	1.2	363	0.6	378	0.7	1351	1467	1553	this work
R220I	432	216	344	0.8	363	0.5	376	0.9	1351	1467	1553	this work
R220E	432	217	341	1.4	362	0.6	376 (sh)	0.4	1352	1466	1553	this work
*SW*Mb												
WT	433	218	342	−	370[f] 1Arg45	−	370[f] 1Ser92 1His97	−	1357	1472	1564	27

[a] λ values are given in nanometers. Potentials are given in mV versus NHE. Raman vibrational frequencies are given in cm^{-1}. k_{on} values are given in 10^{-4} M^{-1} s^{-1}. [b] The band intensity is given relative to the ν_7 band at 675 cm^{-1} used to normalize the spectra. [c] $\delta_{C\beta CcCd}$ bending mode for the propionate 6 group. Residues listed are those donating H-bond to the carboxylate group according to the respective X-ray crystal structure. The number preceding the residue indicates the number of H-bonds donated by that residue. [d] $\delta_{C\beta CcCd}$ bending mode for the propionate 7 group. Same as footnote b. [e] nr − not reported. [f] Denotes the observation of only one band for the two propionate groups.

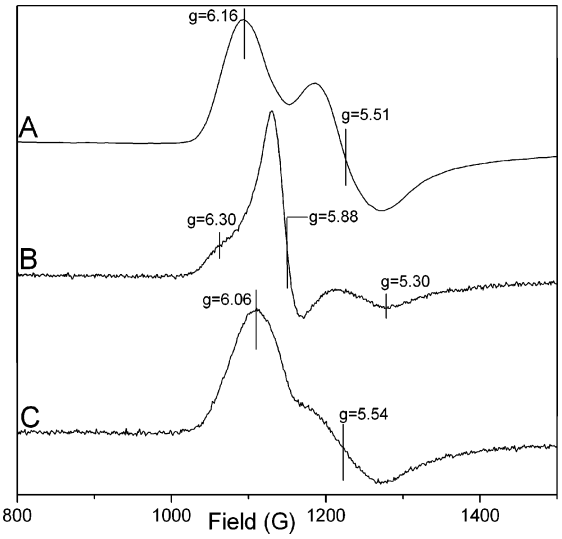


FIGURE 3: EPR spectra recorded for *Bj*FixLH WT pH 7.45 (A), R220H pH 7.45 (B), and R220H pH 4.4 (C). Sample concentration: 50 μM, temperature 15 K. Samples were prepared in a 100 mM Hepes buffer for pH 7.45, and a 100 mM acetate buffer for pH 4.4.

corresponding to flattening of the heme macrocycle, as was observed in the crystal structure of the *Bj*FixLH R220A in its Fe^{III} met state (*17*).

In stark contrast, the RR spectrum of the R220H mutant recorded at pH 7.4 shows major differences compared to those of WT and the other mutants (Figure 5). The ν_4 oxidation marker band is downshifted to 1370 cm^{-1} but still clearly indicates an Fe^{III} redox state. The ν_2 and ν_3 spin state and coordination marker bands have also significantly downshifted from 1564 to 1556 cm^{-1} and from 1494 to 1478 cm^{-1}, respectively. These values clearly indicate that in the R220H mutant at pH 7.4, the Fe^{III} center is six-coordinated HS (*36*), which is further supported by the ν_{38} mode ($C_\beta-C_\beta$ stretch) frequency at 1509 cm^{-1}, downshifted by 15 cm^{-1} as compared to WT protein (1524 cm^{-1}). These frequencies are characteristic of a 6c HS Fe^{III} ion and similar to those of *Rm*FixL I209H mutant (ν_3 = 1478 cm^{-1}, ν_{38} = 1510 cm^{-1}, ν_2 = 1554 cm^{-1}) (*16*) and most myoglobins (Table 1) (*37*), where a water molecule, exerting a weak ligand field, is coordinated to the heme iron. These RR conclusions of a 6c HS Fe^{III} state for the R220H mutant are consistent with the UV−visible and EPR results reported in Table 1. Because the EPR spectra were recorded at liquid helium temperatures, we also recorded the RR spectrum of the R220H as a function of temperature down to 15 K; the RR data still indicated that the 6c HS ferric state did not change (data not shown). Upon acidification of the R220H solution, the RR spectrum changes, and at pH 4.4, it is similar to that of

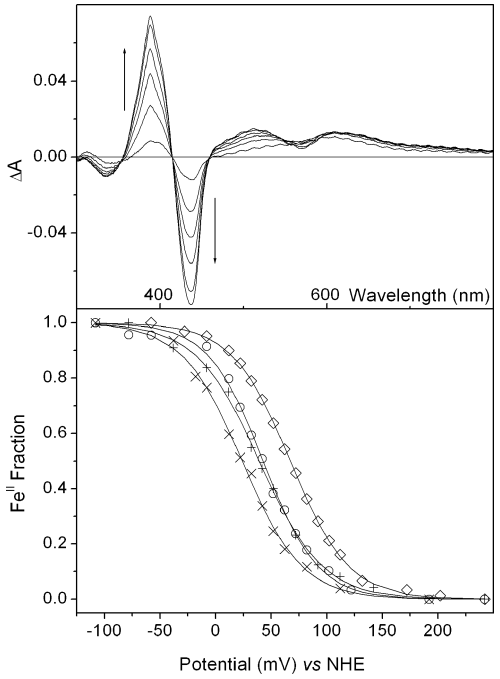


FIGURE 4: (Top) UV−visible spectral changes recorded during oxidative titration at pH 7.4 for WT *Bj*FixLH compared to that of the Fe^{II} deoxy species. (Bottom) Oxidative titration at pH 7.4 for WT (◇), R220Q (○), R220I (+), and R220E (×). Solid lines are the fitted Nernst curves. When the data sets were fit allowing $E_{1/2}$ and n to vary, values of $n = 0.90-1.03$ were obtained.

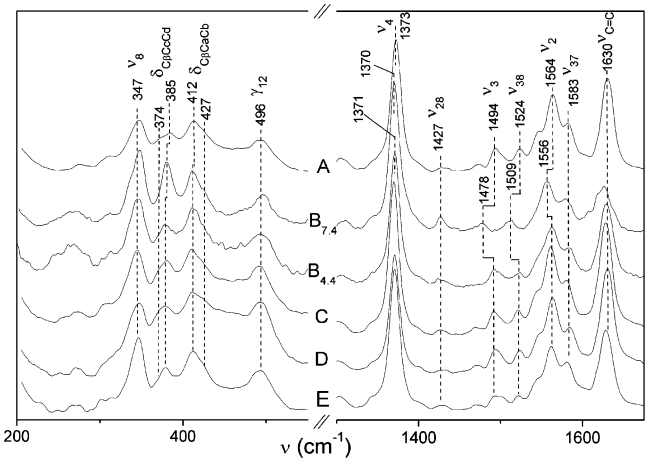


FIGURE 5: RR spectra of the met-FixL forms recorded with $\lambda = 413.1$ nm. (A) WT FixLH pH 7.4; ($B_{7.6}$) R220H pH 7.4; ($B_{4.4}$) R220H pH 4.4; (C) R220Q pH 7.4; (D) R220I pH 7.6; (E) R220E pH 7.4.

the other R220 mutants at pH 7.4, with ν_2 and ν_3 frequencies characteristic of a five-coordinated high-spin Fe^{III} state (Figure 5; Table 1).

The modes of the propionate and vinyl substituents are sensitive probes for the orientation and position of the porphyrin in the heme pocket and their interactions with the surrounding residues (*38*, *39*). The vinyl stretching mode $\nu_{C=C}$ is observed as one intense RR band at 1630 cm^{-1} for WT Fe^{III} *Bj*FixLH, and in the low-frequency region one intense band at 412 cm^{-1} and a shoulder around 427 cm^{-1} are attributed to the vinyl bending modes $\delta_{C\beta CcCd}$ (Figure 5) (*27*). Both the $\nu_{C=C}$ and $\delta_{C\beta CcCd}$ frequencies are conserved upon mutation of Arg220 to Ile, Gln, and Glu, indicating that the position of the heme in the heme pocket is not affected by

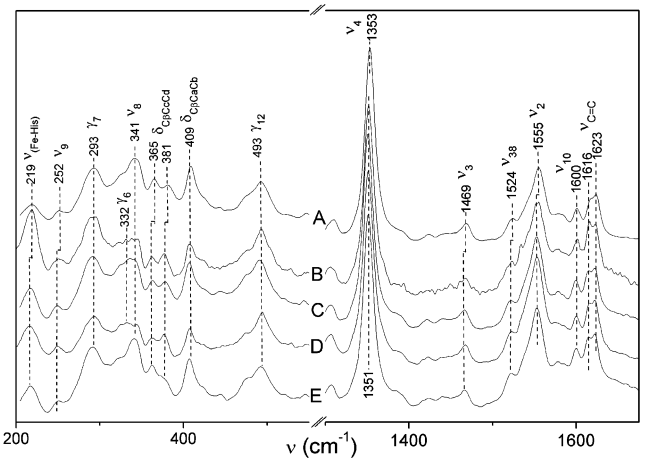


FIGURE 6: RR spectra of the deoxy-FixL forms recorded with $\lambda = 441.6$ nm at pH 7.4. (A) WT FixLH; (B) R220H; (C) R220Q; (D) R220I; (E) R220E. High-frequency spectra were normalized versus ν_4 band intensity. low-frequency spectra were normalized versus the ν_7 band intensity (at 675 cm^{-1}).

the mutation. In the low-frequency area, two propionate bending modes $\delta_{C\beta CcCd}$ are observed at 385 and 374 cm^{-1} for the WT *Bj*FixLH protein. Such a splitting of the propionate bending modes has been reported for some met hemoglobins (*37*). According to the met-*Bj*FixLH X-ray structure, propionate 7 is hydrogen-bonded to both Arg220 and His214, whereas propionate 6 is hydrogen-bonded to protein backbone carbonyl (Figure 1) (*11*). On the basis of the X-ray crystallographic structure of wild-type FixLH and the R220A mutant (*11*, *17*), we may assign these two bands to each propionate group based on their expected H-bonding patterns deduced from the structures. Upon mutation of Arg220, one propionate bending mode at 385 cm^{-1} is observed to downshift by 5 cm^{-1}, indicating weakening of the H-bond to the propionate group (*41*). This observation is fully consistent with the removal of Arg220 since two H-bonds between the propionate 7 group and the Arg220 are proposed in the WT met-*Bj*FixLH structure (*11*). Thus, for the WT Fe^{III} met-*Bj*FixLH protein, the 385 cm^{-1} $\delta_{C\beta CcCd}$ mode can be attributed to propionate 7 and the 374 cm^{-1} band to the propionate 6 group.

Fe^{II} Deoxy FixLH States. Porphyrin Modes. The ν_3 (1467−1469 cm^{-1}) and the ν_4 (1351−1353 cm^{-1}) frequencies in the resonance Raman spectrum of WT deoxy-*Bj*FixLH and all four mutant proteins (Figure 6) clearly indicate the heme iron for wild type and the mutants to be all in a ferrous 5c HS state (*34*, *35*), consistent with their UV−visible absorption spectra (Table 2). We note that the R220H mutant RR spectra did not change with pH and therefore did not undergo iron coordination changes as seen in the Fe^{III} state. For all four mutants, the ν_2 and ν_3 frequencies are slightly downshifted (ca. 2 cm^{-1}) compared to WT *Bj*FixLH, in a manner very similar to that observed for the Fe^{III} met states (Figure 5), again indicating heme flattening and a more expanded heme core size. These observations suggest that the changes in heme planarity, related to removal of the native of Arg 220 residue, are similar to those reported in the X-ray structure of the R220A met Fe^{III} form (*17*) and that they can be extrapolated to the deoxy-Fe^{II} form. Thus, it appears that the removal of Arg220 results in a general flattening of the heme of FixL in both its Fe^{III} and Fe^{II} redox states,

independent of the oxidation state of the heme iron in its high-spin five-coordinated state.

Vinyl Modes. The vinyl $\nu_{C=C}$ stretching mode in the RR spectrum of the WT protein is split, exhibiting two components at 1616 and 1623 cm^{-1} and indicating slightly different environments or geometries for the two vinyl substituents with respect to the heme plane (*38*), while the vinyl $\delta_{C\beta CaCb}$ bending modes are observed as a single band at 409 cm^{-1}. The vibrational frequencies of both modes are not influenced by the mutation, similar to what was observed in the RR spectra of the corresponding Fe^{III} met states (Figure 5). These observations indicate that the heme pocket environment near the vinyl groups remains unchanged upon mutation of Arg220.

Propionate Mode. For the wild-type protein, the propionate $\delta_{C\beta CcCd}$ bending mode band is split, as was seen for the corresponding Fe^{III} met state, with two bands at 365 and 381 cm^{-1}. A similar splitting was also reported for the Fe^{II} deoxy RR spectrum of *Rm*FixL (*16*, *40*) but was not discussed. Both bands are modified upon mutation of Arg220 although not in the same manner. The 365 cm^{-1} band is slightly downshifted to 363 cm^{-1} for all mutants, and its relative intensity appears not to alter (Table 2). In contrast, the 381 cm^{-1} band not only downshifts in frequency upon mutation (by 3 cm^{-1} for R220Q, and 5 cm^{-1} for R220H, R220I, and R220E), but also changes in relative intensity (Table 2). As discussed above, we can assign the propionate RR bands on the basis of the X-ray crystal structures of *Bj*FixLH (*11*). The band at 365 cm^{-1} shows only minor frequency changes upon mutation and is therefore attributed to the propionate 6 group, which is not expected to be in interaction with R220 according to the crystal structure (*12*). The other band at 381 cm^{-1} is attributed to the propionate 7 group which is H-bonded to R220 in the Fe^{II} deoxy state (*12*) and is thus expected to exhibit the most dramatic changes in vibrational frequency upon substitution of the Arg 220 residue which severs this H-bond (Table 2). For all four mutants, the downshifts of the $\delta_{C\beta CcCd}$ bands are correlated with decrease of the ν_9 band frequency from 252 cm^{-1} in the wild-type protein to 249 cm^{-1}, which can be ascribed to a weakening or loss of H-bonding to the propionate groups (*39*). Thus, the observed downshift of the propionate 7 $\delta_{C\beta CcCd}$ frequency (at 381 cm^{-1} for WT, Figure 5) is consistent with a loss of H-bonding to this group upon mutation. The similar frequencies of the $\delta_{C\beta CcCd}$ bending mode for the four mutants indicate that none of the genetically introduced residues donates additional H-bonds to the propionate 7 group. Evidently, only arginine is capable of H-bonding to the propionate groups, which is important to ensure its complete displacement away from the heme Fe oxygen binding site.

The $\delta_{C\beta CcCd}$ mode band intensity is related to the coupling between the Soret transition and the propionate 7 group geometry with the heme plane (*41*); the more the propionate group is in-plane, the more its corresponding RR band will be resonantly enhanced. Compared to that of the wild-type protein, the propionate 7 bending mode intensity is slightly increased in the R220Q mutant and sizeably increased in both the R220H and R220I mutants (Table 2). This indicates that the propionate 7 geometry is modified upon R220 mutation, consistent with the X-ray structure of the met R220A mutant (*17*). For the R220E mutant (Table 2), the considerable attenuation of the propionate 7 $\delta_{C\beta CcCd}$ mode RR band at 376 cm^{-1} band could be due to an unusual, more out-of-plane geometry of the propionate 7 group (*41*) imposed by steric constraints or possibly an electrostatic (repulsive) interaction between the propionate group and the nearby deprotonated, negatively charged Glu side chain (see above).

For the R220H, R220Q, and R220I mutants, the ν_8 band at 341 or 344 cm^{-1} (Figure 6), which is ascribed to a combination of pyrrole stretching and propionate substituent bending modes (*27*, *42*), is seen to lose intensity upon mutation (Table 2) and the γ_6 mode at 332 cm^{-1} (pyrrole tilting mode (*27*)) becomes more intense, indicating an increased flexibility for the propionate groups (*39*, *43*). These intensity changes are greater for the R220H and R220I mutants than for the R220Q mutant. In contrast, the $\nu_8-\gamma_6$ spectral region for the R220E mutant is very similar to that of WT protein (where the propionate 7 group is H-bonded with Arg 220), indicating more rigid propionate groups. In both cases, this rigidity could be attributed to electrostatic interactions between the residue 220 and the propionates, consistent with the negatively charged Glu 220 proposed above.

Thus, for the Fe^{II} deoxy states of WT *Bj*FixL mutants, we observe in general that both (i) the intensity of the RR band due to the propionate 7 heme group and (ii) its flexibility increased following the order: R220E $\approx$ WT $<$ R220Q $<$ R220H $\approx$ R220I (Table 2).

To summarize the RR results of the propionate groups in the Fe^{II} state of FixL: (i) We have been able to assign the 365 and 381 cm^{-1} RR bands in the Fe^{II} deoxy state of WT FixL to the heme propionate 6 and 7 groups, respectively. For the Fe^{III} met state, they were observed at 374 and 385 cm^{-1}, respectively. (ii) Replacement of Arg 220 with other residues does not conserve the H-bond interaction between residue 220 and the heme propionate 7 group, which in turn (iii) results in an increase in propionate flexibility and rotation of the propionate 7 group more in-plane with the heme group (Figure 6 and see refs *11* and *17*). An exception to this observation occurs for the Glu 220 mutation where an unusual out-of-plane propionate geometry is reflected, most likely due to negative electrostatic charge of the Glu side chain.

Fe^{II}−Histidine Mode. The RR band corresponding to the ν_{Fe-His} stretching mode is readily observed in heme (b-type) proteins, where the central iron is in the Fe^{II} 5c HS state, typically around 216−220 cm^{-1} in Mb and Hb (*27*, *34*). Both the vibrational frequency and the relative intensity of this ν_{Fe-His} RR band provide structural information concerning the heme Fe^{II}−His coordination. In *Bj*FixLH, the ν_{Fe-His} stretching mode arising from the proximal His200 was observed at 219 cm^{-1} for the WT (Figure 6). This frequency is somewhat higher than that reported for *Rm*FixL at 209−212 cm^{-1} (*40*), but similar to that previously reported (218 cm^{-1}) for *Bj*FixLH (*35*). For the R220H, R220I, R220Q, and R220E mutants, the ν_{Fe-His} stretching mode is observed at lower frequency, indicating a weakening of the Fe−His_{200} bond (Table 2). This observation is consistent with the lengthening of the Fe−His_{200} bond (+0.31 Å) reported in the X-ray crystal structure of the R220A mutant of met-*Bj*FixLH (*17*). However, the relative intensity of the ν_{Fe-His} stretching mode band of the R220I, R220Q, and R220E mutants is increased as compared to that of WT. The

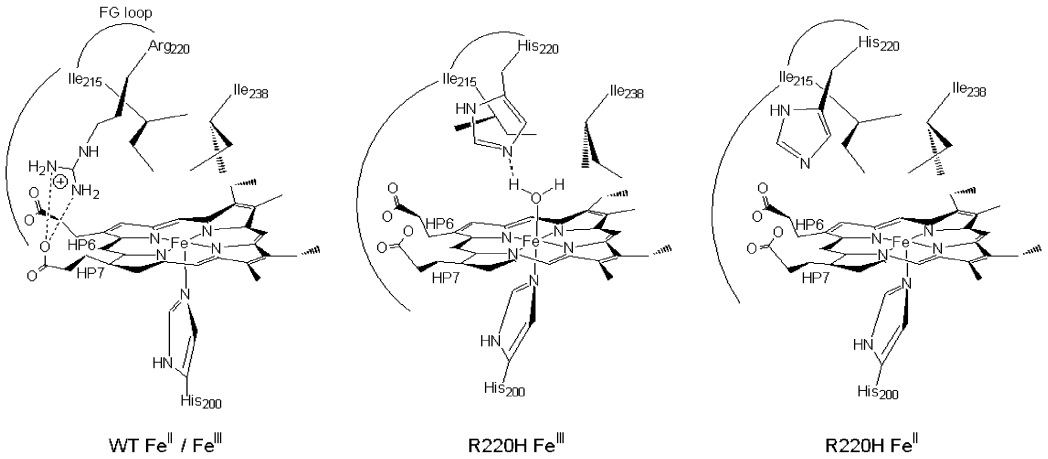


FIGURE 7: Schematic of the structural modifications for the Fe^{III} and Fe^{II} states of the R220H *Bj*FixLH mutant at neutral pH as compared to wild type.

enhancement of the ν_{Fe-His} band intensity can be attributed to the increase of both the azimuthal and tilt angles of the Fe−His unit (*44*), consistent with the crystallographic structure of the R220A met-*Bj*FixLH mutant, which indicates a change of the orientation of the imidazole ring with respect to the heme pyrrole nitrogen atoms and an increase in tilt in the Fe−His bond with respect to the heme plane (*17*). For the R220H mutant, which exhibits the same ν_{Fe-His} frequency as the WT protein, the band intensity is markedly increased, suggesting significant increase in tilt and/or azimuthal angles (*17*, *44*).

DISCUSSION

Arginine 220 is a strictly conserved residue in FixL oxygen sensors that has been shown to be important for selective ligand affinity (*21*) and histidine kinase inactivation (*17*). The specific structural modifications resulting from the mutation of Arg220 we have identified here can be related to functional differences, especially with respect to the k_{on} values for O_2 and CO previously published, thus providing further information on the ligand selectivity mechanism (*21*). In addition, the *Bj*FixLH R220H mutant unexpectedly exhibits pH- and redox-dependent heme iron-coordination changes, which is reminiscent of some WT myoglobins and of *Ec*Dos but is completely unprecedented for FixL proteins. Our findings that the *Bj*FixLH R220H mutant can switch from a six-coordinated high-spin to a five-coordinated high-spin heme iron state upon Fe^{III}/Fe^{II} redox state change reveal the potential of engineering FixL into a redox sensor as well as an oxygen sensor, as well as providing new insights into the mechanism of oxygen sensing in general for these PAS heme-based sensors.

The R220H Mutant. Fe^{III} State. The R220H mutant exhibits a unique behavior not previously observed for FixL proteins. At pH 7.4, the heme iron is six-coordinated HS in the Fe^{III} state, unlike WT and the other mutants, which are all 5c HS. At low pH (e.g., pH 4), the iron R220H mutant is completely in a 5c HS state as determined by UV−visible absorption, RR, and EPR spectroscopies. The pH-dependent 5c ↔ 6c transition of the R220H Fe^{III} iron is probably due to a single protonation of a heme pocket residue with an apparent pK_a value of 5.7 (Figure 2). This value is compatible with that of a distal histidine residue, since in several hemo- or myoglobins, pK_a of the distal His(E7) residue is observed in the pH range 4.3 for *SW*Mb (*45*) to 6.3 for midge larva Hb (*46*). Thus, the sixth ligand of the His mutant might be considered to be the actual His220 side chain itself. However, such resulting Fe^{III}−bis-histidine coordination usually results in low-spin Fe^{III} states (Table 1 and ref *47*), unlike the high-spin state we observe here. Thus, we propose that the sixth ligand in the R220H *Bj*FixLH Fe^{III} state is most likely a water molecule since the spectroscopic features are very similar to that of *SW* met myoglobin. The proposed structure of the heme pocket at pH 7.4 is schematically shown in Figure 7, where the Fe^{III} center is coordinated with a water molecule that is itself H-bonded with the His residue at position 220. At low pH, this His220 becomes protonated, thus destabilizing the coordination of the water molecule with the Fe^{III} center. This resulting structure is similar to that of *SW*Mb (*15*) and *Ec*Dos (*9*), but in *Ec*Dos the Fe^{III} is low-spin (*7*). The presence of a water molecule and His220 pointing inside the heme pocket of *Bj*FixLH suggests a more hydrophilic heme pocket whose structure, especially with respect to the hydrophobic Ile238 and Ile215 side chain positions (Figure 7), should be similar to that reported in the FixL crystallographic structures of all six coordinated states (*12*). On the basis of the similarity of the RR spectra in the propionate bending mode region for the R220H mutant in the Fe^{III} deoxy and $Fe^{II}-O_2$ states (*21*), we further expect displacement of the crucial FG loop (including Ile215), as observed for the R220H $Fe^{II}-O_2$ state where His220 interacts via a hydrogen bond with the O_2 ligand (*21*). Displacement of Ile215 is further supported by the results obtained for the I210H mutant of *Rm*FixL, which exhibits both an isoleucine (Ile209 = Ile215 in *Bj*FixL) and a histidine residue around the heme iron and still has a hydrophobic heme pocket with no coordinated water molecule in the met state (*16*). By analogy, Ile215 and the water molecule should not be present together in the heme vicinity of the *Bj*FixLH R220H mutant.

In contrast, for the low pH RR spectrum of the *Bj*FixLH R220H mutant (Figure 5) the $\nu_{C=C}$ vinyl stretching frequency is identical to that of WT at pH 7.4, where it is known that Arg220 is pointing away from the heme iron while Ile238 is pointing toward the iron. The heme vinyl groups of *Bj*FixL are in van der Waals contact with Ile238 (and Leu236) (*14*), therefore the lack of change in the vinyl frequencies indicating that Ile238 of the hydrophobic triad is still pointing toward the iron for the R220H mutant. This implies that the

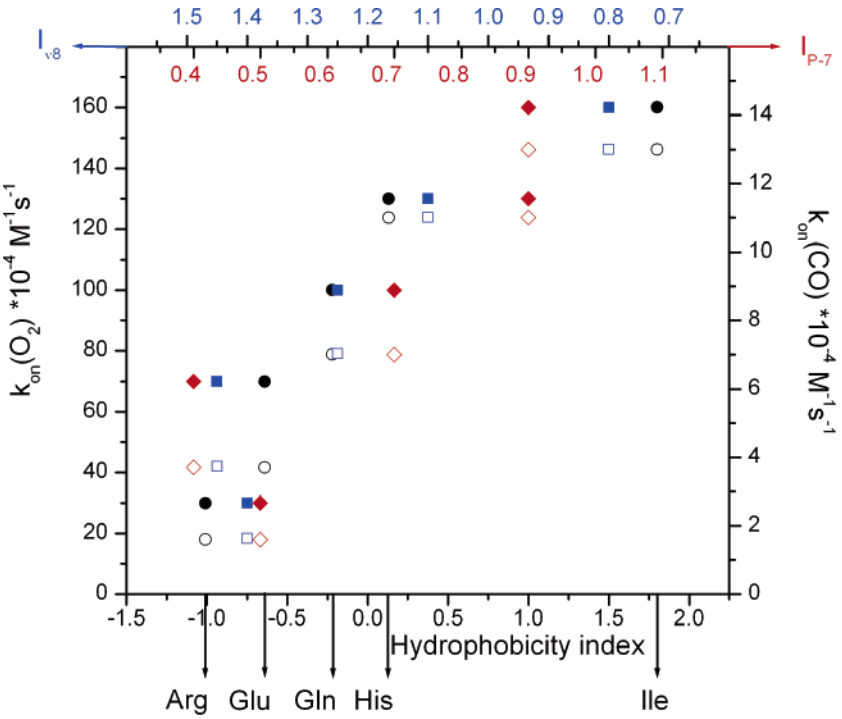


FIGURE 8: Correlation between the k_{on} values for O_2 (filled symbols) and CO (empty symbols) (*24*) and the hydrophobicity index of the residue in position 220 (●○) (*60*), the ν_8 Raman band relative intensity $I_{\nu 8}$ (■□), and the propionate 7 $\delta_{C\beta CcCd}$ band relative intensity I_{P-7} (◆◇), both reported in Table 2.

protonated His220 residue is pointing toward the outside of the heme pocket and thus results in a small highly hydrophobic heme pocket in the immediate vicinity of the central heme iron, similar to that of the wild-type Fe^{III} protein (*10*). Still, we do not detect a significant H-bond interaction between His220 and the propionate 7 group as is present in the WT. This lack of H-bond can be due to the reduced length of the His side chain as compared to arginine or to protonation of propionate 7 at pH 4.4, since heme propionate usually ionizes with a pK_a of 5−6 (*48*).

Fe^{II} State. Upon reduction of the R220H mutant from the met Fe^{III} to the Fe^{II} deoxy state, the coordinated water molecule is lost, resulting in a 5c HS Fe^{II} heme iron state. A similar behavior is observed for most myo- and hemoglobins; however, in these cases, the water molecule is maintained in the distal pocket and still interacts via a H-bond with the His(E7) residue (*15*). For myo- and hemoglobin, this results in steric hindrance in the distal pocket and low k_{on} values for both O_2 and CO binding (*49*). For the R220H mutant, the k_{on} values for O_2 and CO bonding are similar to those reported for the R220I and R220Q mutants (*21*). This means that no additional steric hindrance is noticed in the distal pocket of the R220H mutant and strongly suggests that the water molecule ligated to Fe^{III} in the met form is not situated near the Fe−O_2/CO binding site in the deoxy Fe^{II} state. Moreover, analysis of the vinyl substituent frequencies indicates that the vinyl environment is similar in the wild-type protein and in the R220H mutant. This indicates that the Ile238 side chain is not directed toward the vinyls as in the R220H Fe^{III} state, but pointing toward the iron as in the wild-type protein (Figure 7).

Analysis of the RR spectra of the Fe^{II} deoxy state indicates highly flexible propionates in a similar way as for the R220I mutant. However, the structure of the Fe^{II} R220H mutant is not exactly that of the other mutants, as indicated by increase of both frequency and intensity of the ν_{Fe-His} stretching mode, indicating a stronger Fe−His interaction.

Redox Behavior of the R220H Mutant. In the Fe^{III} state, the R220H *Bj*FixLH mutant exhibits a similar high-spin six-coordinated structure as that of myoglobin, with both a His and a water molecule in the axial positions (*15*). Upon reductive titration, the water ligand is displaced and the iron becomes five-coordinated (His−Fe). Therefore, for both proteins, the observed redox midpoint potential corresponds to the redox couple His−Fe^{III}−OH_2/His−Fe^{II}. However, for *SW*Mb the water ligand remains in the heme pocket, whereas for the R220H *Bj*FixLH mutant, the water molecule exits the heme pocket, with substantial FG loop shift. The absence of hysteresis in both cases indicates that rapid interconversion is observed between both redox state stuctures, implying a relatively low activation energy for the hydrophobic to hydrophilic transition in the R220H *Bj*FixLH mutant despite the fact that it is associated with a shift of the FG loop. This observation is generally consistent with the high flexibility expected for PAS domains (*3*). The electrochemical behavior of the R220H *Bj*FixLH mutant protein is quite similar to that reported for the oxygen/redox sensor *Ec*Dos. Upon reductive titration, the water ligand of the low-spin *Ec*Dos His−Fe^{III}−OH_2 complex is replaced by a methionine residue leading to a 6c His−Fe^{II}−Met complex (*9*). Again in this case, no hysteresis is reported for the redox titration (*8*). This implies that the structural modifications related to the ligand exchange are rapid and reversible on the time scale of the electrochemical experiment and the 67 mV redox potential reported for *Ec*Dos corresponds to the redox couple His−Fe^{III}−OH_2/His−Fe^{II}−Met. The recent crystallographic structures reported for the Fe^{III} state of *Ec*Dos indicate that the water ligand is not stabilized by a histidine residue, consistent with a pH-independent coordination state, and comparison of the *Ec*Dos crystallographic structures of both redox states

indicates substantial stiffening of the FG loop upon reduction (*50*).

The Fe^{II} Deoxy States: Functional Implications. The Fe^{II} deoxy state is a key state in FixL functioning. Mutation of Arg 220 to Ile, His, Gln, or Glu does not alter *Bj*FixLH iron coordination (5c) and spin state (HS) in the Fe^{II} deoxy state, as revealed by UV−visible, EPR, and resonance Raman spectra (see above for the R220H mutant). Still, several structural changes in the heme vicinity are reported. First, the RR spectra of these mutants clearly indicate that removal of the Arg 220 side chain results in the net loss of an H-bond interaction on the heme propionate 7 group consistent with the crystal structure (*17*), where Arg220 is engaged in a H-bond interaction with the heme propionate 7 group. Comparing the properties of the arginine side chain with those others in the series of mutants studied here that are capable of donating H-bonds (e.g., glutamine, histidine), we found that it is probably a combination of the length of the Arg side chain and its positive charge that is largely responsible for H-bonding with the propionate 7 group. For the R220E mutant, as deduced from the electrochemical redox titrations (see Results), the Glu side chain is most likely deprotonated and thus incapable of donating a H-bond. Disruption of this H-bond also affects the H-bond network near the propionate 6 group (Table 2). This leads to modifications of the propionates' flexibility and of the propionate 7 geometry as gauged by several propionate sensitive modes (e.g., $\delta_{C\beta CcCd}$, γ_6 modes) in the low-frequency RR spectra.

Protein Conformational Changes. Key structural elements of signal initiation in oxygen-sensing in FixL have been proposed to be the change in heme planarity and concomitant changes in H-bond interactions with respect to the heme propionate groups when O_2 dissociates from the Fe^{II} atom (*12*). Here, we have a unique opportunity to investigate the structural changes occurring when the hydrogen bond between residue 220 and propionate 7 is broken without the presence of O_2. The RR spectra of the Fe^{II} redox states of the four R220I, R220H, R220Q, and R220E *Bj*FixLH mutants indicate an increase in the heme planarity as compared to WT. In addition, the ν_{Fe-His} stretching mode in the Fe^{II} deoxy state spectra shows that frequency decreases indicate a weakening or lengthening of the $Fe-His_{200}$ bond, as well as increases in band intensity which can be ascribed to changes in the orientation of the imidazole plane toward the porphyrin ring, with increase of the tilt and/or the azimuthal angle (*44*). The above-mentioned structural changes are similar to those reported upon O_2 fixation in the wild-type protein (*10*−*12*). Thus, part of the heme structural changes usually attributed to O_2 fixation appears to be induced solely by the disruption of the H-bond between propionate 7 and Arg220. This H-bond places the arginine, which is part of the critical FG loop, in a position pointing away from the O_2 binding site, thus "locking" the protein in a particular conformational state. The rupture of this H-bond as seen in all the mutants studied here induces a "release" of the locked protein conformation, which results in geometrical rearrangement of both the propionate 6 and 7 groups along with concomitant changes in heme planarity as well as heme $Fe^{II}-His_{200}$ bond length and histidine orientation. Since the His_{200} is part of the α-helix connected to the critical FG loop (*10*), whose movement is thought to be important in signal transduction and ligand discrimination, the observed changes in its orientation with the heme when the Arg220-propionate 7 H-bond interaction is removed should be transmitted to the α-helix and thus to the FG loop.

In the R220H and R220I mutants, residue 220 is pointing outside the heme pocket in the Fe^{II} deoxy states (see above for the R220H mutant). This indicates that the interaction between residue 220 and propionate 7 is not required to maintain residue 220 outside of the heme pocket, but that this structure is thermodynamically favored when no ligand is bound to the iron. The results presented here, together with those previously reported (*21*), provide further evidence that the H-bond between Arg220 and the propionate 7 group of the heme is important for ligand discrimination in the O_2 sensor FixL. X-ray crystallographic (*12*) and RR data (*21*) show that the native Arg220 residue does not interact with CO in the $Fe^{II}-CO$ state but remains H-bonded with the propionate 7 group like in the Fe^{II} deoxy state as seen by the crystal structure (*12*) and in the RR work reported here. Only when O_2 is bound does the Arg220 residue rupture its H-bond with the propionate 7 heme group and move toward the O_2 ligand to interact with it. The results obtained for the histidine mutant indicate that, upon all ligand binding (H_2O, CO, and O_2) (*21*), structural reorganization of the heme pocket occurs, implying displacement of the G β-sheet and FG loop residues (Leu236, Ile238, and residue 220), and no ligand discrimination is observed. This indicates that the 6c thermodynamically stable structure of the mutant is the one having residue 220 pointing inside the heme pocket. Extrapolation of this observation to the WT protein strongly suggests that the role of the strong interaction between propionate 7 and Arg220 is to prevent displacement of this residue inside the heme pocket upon binding of ligands other than O_2.

O_2 and CO k_{on} Binding Rates. In our previous article (*21*), we were able to relate the observed O_2 k_{off} values for the mutants with the formation of H-bonds with the bound O_2 molecule; however, the variation in k_{on} values could not be explained. The structural modifications reported here for the Fe^{II} deoxy states of the mutants may be related to the reported k_{on} values for the binding of the O_2 and CO ligands. We previously showed that mutation of Arg220 in the *Bj*FixL hemodomain leads to an increase in the k_{on} values for both diatomic ligands (*21*). Our RR results indicate that the conformations of the vinyl substituents remain unchanged for the mutants in their Fe^{II} deoxy states. Since the vinyl substituents are in van der Waals contact with the Leu236/Ile238 residues of the hydrophobic triad (*14*), this observation indicates that the positions of the Leu236 and Ile238 residues (*10*) in the heme distal pocket, and thus its degree of hydrophobicity, remain largely unchanged in the vicinity of the $Fe-O_2$/CO binding site. Thus, hydrophilic residues such as His or Gln at position 220 should point away from the $Fe-O_2$ binding site of the heme pocket, as Arg220 does in the WT protein, leading to a more or less unchanged FG loop position as compared to the WT Fe^{II} deoxy protein. Therefore, differences in the observed k_{on} values for the mutants cannot be explained by steric changes around the iron atom. Two other explanations may be proposed. One is that the interaction between Arg220 and propionate 7 is localized in the entrance channel of the ligands, resulting in steric hindrance for ligand approach and binding. This

proposal is further supported by the crystallographic structure where Arg220 interacts with solvent water molecules (*10*). The second explanation is that increase in the His200 tilt and/or azimuthal angles (see above) results in a decrease of the repulsion energy between the imidazole carbon atoms of His200 and the porphyrin nitrogen atom, leading to a decrease in the activation energy of bond formation between the iron and the ligand (*51*).

We rather observe a correlation between both the k_{on} values for O_2 and CO and the geometry/flexibility of the propionates indicated by the ν_8 and $\delta_{C\beta CcCd}$(P-7) relative intensities (Figure 8) than with the ν_{Fe-His} frequency. Moreover, we also notice that the k_{on} values for CO and O_2 binding correlate with the hydrophobicity index of the residue in position 220 (*52*), which has to be an important parameter since Arg220 is interacting with a solvent molecule in the wild-type *Bj*FixLH protein (*10*) indicative of a fairly accessible Arg220−propionate 7 cluster. Figure 8 shows that high k_{on} values for both ligand bindings correlate with a high HI for residue 220, with low ν_8 intensity indicative of flexible propionates and with high $\delta_{C\beta CcCd}$(P-7) intensity indicative of more in-plane propionate 7 geometry.

In the wild-type *Bj*FixLH protein, the interaction of propionate 7 with Arg220 is based on an electrostatic attraction together with H-bond formation that rigidifies propionate 7 in a fixed geometry ($I_{\nu 8}$ high and I_{P-7} low). This results in the formation of a rigid hydrophilic cluster, probably also involving water molecules according to the X-ray structure (*10*). For the R220E mutant, the propionate 7 group appears to be more rigid as seen by RR, which we attribute to electrostatic repulsion between the propionate 7 and the negatively charged glutamate. Because this negatively charged residue is hydrophilic, this interaction probably induces formation of a cluster also containing water molecules. As in the wild-type protein, this interaction rigidifies propionate 7 in a fixed geometry. In both cases, the k_{on} values for O_2 and CO binding are low. For the R220H and R220I mutants, RR analysis of the deoxy state indicates highly flexible propionates ($I_{\nu 8}$ low and I_{P-7} high), rotated away from the heme plane, and we observe an increase in the k_{on} values. For the R220Q mutant, we observe a slight increase in the propionate flexibility together with slight rotation away from the heme plane, and we report an increase in the k_{on} values. The structural differences observed between the R220I and R220Q mutants may be due to weak interaction of the Gln with propionate 7 probably via water molecule, since glutamine (HI = −0.22) is much more hydrophilic than isoleucine (HI = +1.8) (*52*). This proposal is consistent with the slight increase of the $\delta_{C\beta CcCd}$ frequency reported for the R220Q mutant (Table 2).

We finally propose that both the heme propionate 7 and Arg220 are located in the entrance channel of the ligands and that formation of a hydrophilic cluster involving both groups and probably water molecules hinders the approach of both O_2 and CO molecules, most likely by steric hindrance. Hydrophobicity of the propionates has been previously shown to influence the k_{on} rates for both O_2 and CO binding in myoglobin (*53*). For *Bj*FixL, this proposal is further supported by molecular dynamics simulations of ligand dynamics in the heme environment of wild-type and mutant FixLH (Lambry, J.-C., Liebl, U., and Vos, M. H., unpublished results). Thus, the size of the 220 residue also has to be an essential parameter for the ligand entrance rate.

CONCLUSION

In both the met Fe^{III} and Fe^{II} deoxy forms of the wild-type *Bj*FixLH protein, the heme pocket is characterized by a high degree of hydrophobicity, which is mainly due to the presence of the hydrophobic triad Ile215/Leu236/Ile238 conserved in several sensor proteins presenting PAS domains. In both redox states, this peculiar heme pocket structure is associated with a fully active histidine kinase domain. In the deoxy state, the lack of perturbation on the heme vinyl groups strongly suggests that the structure of the heme pocket and the position of the FG loop remain unchanged upon mutation of Arg220. Thus, we expect these mutations to not strongly affect the kinase activity of the full length Fe^{II} enzyme. In contrast, we report structural modifications at the level of the heme propionate groups for the Fe^{II} and Fe^{III} resting states upon R220 mutation that are related to the k_{on} values for ligand binding previously published (*21*). The interaction between propionate 7 and Arg220 is essential to lock the protein structure and enhance ligand discrimination, by maintaining Arg220 outside of the heme pocket upon CO and NO binding. However, this interaction appears also to be responsible for the low k_{on} values reported for ligand binding, most likely by generating steric hindrance in the ligand entrance channel.

We also report a unique six-coordinated FixL Fe^{III} state of the R220H mutant exhibiting a heme pocket, where the His220 is pointing toward the inside of the heme pocket and interacting with a bound H_2O ligand. We report for the first time for FixL that hydrophobicity of the heme pocket, and the position of the FG loop, can be modified by only changing the redox state of the metal. This should result in a partial inhibition of the histidine kinase activity. Thus, by changing Arg220 into His220, the function of the *Bj*FixLH protein is strongly altered, and the protein becomes redox-sensitive. We notice that this effect appears to be very specific to histidine and that substitution of Arg220 by another hydrophilic residue capable of H-bonding (e.g., glutamine) does not allow the structural switch by changing the redox state of the protein.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Oxidative and reductive redox titrations for the R220H variant of *Bj*FixLH at pH 7.6. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

REFERENCES

1. Gilles-Gonzalez, M.-A., and Gonzalez, G. (2005) Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. *J. Inorg. Biochem. 99*, 1−22.
2. Jain, R., and Chan, M. K. (2003) Mechanisms of ligand discrimination by heme proteins. *J. Biol. Inorg. Chem. 8*, 1−11.
3. Vreede, J., van der Horst, M. A., Hellingwerf, K. J., Crielaard, W., and van Aalten, D. M. F. (2003) PAS Domains. *J. Biol. Chem. 278*, 18434−18439.
4. Gilles-Gonzalez, M.-A., Ditta, G. S., and Helinski, D. R. (1991) A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature 350*, 170−172.
5. Dioum, E. M., Rutter, J., Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.-A., and McKnight, S. L. (2002) NPAS2: a gas-responsive transcription factor. *Science 298*, 2385−2387.

6. Chang, A. L., Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M., and Gilles-Gonzalez, M.-A. (2001) Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry 40*, 3420−3426.
7. Delgado-Nixon, V. M., Gonzalez, G., and Gilles-Gonzalez, M.-A. (2000) Dos, a heme-binding PAS protein from *Escherichia coli*, is a direct oxygen sensor. *Biochemistry 39*, 2685−2691.
8. Sasakura, Y., Hirata, S., Sugiyama, S., Suzuki, S., Taguchi, S., Watanabe, M., Matsui, T., Sagami, I., and Shimizu, T. (2002) Characterization of a direct oxygen sensor heme protein from *Escherichia coli*. Effects of the heme redox states and mutations at the heme-binding site on catalysis and structure. *J. Biol. Chem. 277*, 23821−23827.
9. Kurokawa, H., Lee, D.-S., Watanabe, M., Sagami, I., Mikami, B., Raman, C. S., and Shimizu, T. (2004) A redox-controlled molecular switch revealed by the crystal structure of a bacterial heme PAS sensor. *J. Biol. Chem. 279*, 20186−20193.
10. Gong, W., Hao, B., Mansy, S. S., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.-A., and Chan, M. K. (1998) Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95*, 15177−15182.
11. Gong, W., Hao, B., and Chan, M. K. (2000) New mechanistic insights from structural studies of the oxygen-sensing domain of *Bradyrhizobium japonicum* FixL. *Biochemistry 39*, 3955−3962.
12. Hao, B., Isaza, C., Arndt, J., Soltis, M., and Chan, M. K. (2002) Structure-based mechanism of O_2 sensing and ligand discrimination by the FixL heme domain of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochemistry 41*, 12952−12958.
13. Miyatake, H., Mukai, M., Park, S.-Y., Adachi, S., Tamura, K., Nakamura, H., Nakamura, K., Tsuchiya, T., Iizuka, T., and Shiro, Y. (2000) Sensory mechanism of oxygen sensor FixL from *Rhizobium meliloti*: crystallographic, mutagenesis and resonance Raman spectroscopic studies. *J. Mol. Chem. 301*, 415−431.
14. Key, J., and Moffat, K. (2005) Crystal structure of deoxy and CO-bound *bj*FixLH reveal details of ligand recognition and signaling. *Biochemistry 44*, 4627−4635.
15. Quillin, M. L., Arduini, R. M., Olson, J. S., and Phillips, G. N., Jr. (1993) High-resolution crystal structures of distal histidine mutants of sperm whale myoglobin. *J. Mol. Biol. 234*, 140−155.
16. Mukai, M., Nakamura, K., Nakamura, H., Iizuka, T., and Shiro, Y. (2000) Roles of Ile209 and Ile210 on the heme pocket structure and regulation of histidine kinase activity of oxygen sensor FixL from *Rhizobium meliloti*. *Biochemistry 39*, 13810−13816.
17. Dunham, C. M., Dioum, E. M., Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Scott, W. G., and Gilles-Gonzalez, M.-A. (2003) A distal arginine in oxygen-sensing heme-PAS domains is essential to ligand binding, signal transduction, and structure. *Biochemistry 42*, 7701−7708.
18. Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Dioum, E. M., and Gilles-Gonzalez, M.-A. (2002) Ligand and oxidation-state specific regulation of the heme-based oxygen sensor FixL from *Sinorhizobium meliloti*. *Biochemistry 41*, 6170−6177.
19. Perutz, M. F., Paoli, M., and Lesk, A. M. (1999) FixL, a haemoglobin that acts as an oxygen sensor: signalling mechanism and structural basis of its homology with PAS domains. *Chem. Biol. 6*, R291−R297.
20. Liebl, U., Bouzhir-Sima, L., Négrerie, M., Martin, J.-L., and Vos, M. H. (2002) Ultrafast ligand rebinding in the heme domain of the oxygen sensors FixL and Dos: general regulatory implications for heme-based sensors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99*, 12771−12776.
21. Balland, V., Bouzhir-Sima, L., Kiger, L., Marden, M. C., Vos, M. H., Liebl, U., and Mattioli, T. A. (2005) Role of arginine 220 in the oxygen sensor FixL from *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem. 280*, 15279−15288.
22. Rodgers, K. R., and Lukat-Rodgers, G. S. (2005) Insights into heme-based O_2 sensing from structure−function relationships in the FixL proteins. *J. Inorg. Biochem. 99*, 963−977.
23. Boussac, A., Un, S., Horner, O., and Rutherford, A. W. (1998) High-spin states ($S \geq {}^5/_2$) of the photosystem II manganese complex. *Biochemistry 37*, 4001−4007.
24. Ferguson, W. J., Braunschweiger, K. I., Braunschweiger, W. R., Smith, J. R., McCormick, J. J., Wasmann, C. C., Jarvis, N. P., Bell, D. H., and Good, N. E. (1980) Hydrogen ion buffers for biological research. *Anal. Biochem. 104*, 300−310.
25. Lexa, D., Saveant, J.-M., and Zickler, J. (1977) Electrochemistry of vitamin B12. 2. Redox and acid−base equilibria in the B12a/B12r system. *J. Am. Chem. Soc. 99*, 2786−2790.
26. Wilson, G. S. (1978) Determination of Oxidation-Reduction Potentials. *Methods Enzymol. 54*, 396−435.
27. Hu, S., Smith, K. M., and Spiro, T. G. (1996) Assignment of protoheme resonance Raman spectrum by heme labeling in myoglobin. *J. Am. Chem. Soc. 118*, 12638−12646.
28. Gilles-Gonzalez, M.-A., Gonzalez, G., and Perutz, M. F. (1995) Kinase activity of oxygen sensor FixL depends on the spin state of its heme iron. *Biochemistry 34*, 232−236.
29. Ikeda-Saito, M., Hori, H., Andersson, L. A., Prince, R. C., Pickering, I. J., George, G. N., Sanders, C. R., II, Lutz, R. S., McKelvey, E. J., and Mattera, R. (1992) Coordination structure of the ferric heme iron in engineered distal histidine myoglobin mutants. *J. Biol. Chem. 267*, 22843−22852.
30. Lukat-Rodgers, G. S., Rexine, J. L., and Rodgers, K. R. (1998) Heme speciation in alkaline ferric FixL and possible tyrosine involvement in the signal transduction pathway for regulation of nitrogen fixation. *Biochemistry 97*, 13543−13552.
31. Palmer, G. (1985). The electron paramagnetic resonance of metalloproteins. *Biochem. Soc. Trans. 13*, 548−560.
32. Shifman, J. M., Gibney, B. R., Sharp, R. E., and Dutton, P. L. (2000) Heme redox potential control in de novo designed four-α-helix bundle proteins. *Biochemistry 39*, 14813−14821.
33. Van Dyke, B. R., Saltman, P., and Armstrong, F. A. (1996) Control of myoglobulin electron-transfer rates by the distal (nonbound) histidine residue. *J. Am. Chem. Soc. 118*, 3490−3492.
34. Spiro, T. G., and Li, X.-Y. (1988) in *Biological applications of Raman spectroscopy* (Spiron, T. G., Ed.) Vol. 3, pp 1−37, Wiley-Interscience, New York.
35. Tomita, T., Gonzalez, G., Chang, A. L., Ikeda-Saito, M., and Gilles-Gonzalez, M.-A. (2002) A comparative resonance Raman analysis of heme-binding PAS domains: heme iron coordination structures of the *Bj*FixL, *Ax*PDEA1, *Ec*Dos, and *Mt*Dos proteins. *Biochemistry 41*, 4819−4826.
36. Smulevich, G., Mantini, A. R., Paoli, M., Coletta, M., and Geraci, G. (1995) Resonance Raman studies of the heme active site of the homodimeric myoglobin from *Nassa mutabilis*: a peculiar case. *Biochemistry 34*, 7507−7516.
37. Jin, Y., Nagai, M., Nagai, Y., Nagamoto, S., and Kitagawa, T. (2004) Heme structures of five variants of hemoglobin M probed by resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry 43*, 8517−8527.
38. Marzocchi, M. P., and Smulevich, G. (2003) Relationship between heme vinyl conformation and the protein matrix in peroxidases. *J. Raman Spectrosc. 34*, 725−736.
39. Gottfried, D. S., Peterson, E. S., Sheikh, A. G., Wang, J., Yang, M., and Friedman, J. M. (1996) Evidence for damped hemoglobin dynamics in a room temperature trehalose glass. *J. Phys. Chem. 100*, 12034−12042.
40. Tamura, K., Nakamura, H., Tanaka, Y., Oue, S., Tsukamoto, K., Nomura, M., Tsuchiya, T., Adachi, S., Takahashi, S., Iizuka, T., and Shiro, Y. (1996) Nature of endogenous ligand binding to heme iron in oxygen sensor FixL. *J. Am. Chem. Soc. 118*, 9434−9435.
41. Cerda-Colon, J. F., Silfa, E., and Lopez-Garriga, J. (1998) Unusual rocking freedom of the heme in the hydrogen sulfide binding hemoglobin from *Lucina pectinata*. *J. Am. Chem. Soc. 120*, 9312−9317.
42. Morikis, D., Champion, P. M., Springer, B. A., Egeberg, K. D., and Sligar, S. G. (1990) Resonance Raman studies of iron spin and axial coordination in distal pocket mutants of ferric myoglobin. *J. Biol. Chem. 265*, 12143−12145.
43. Peterson, E. S., Friedman, J. M., Chien, E. Y. T., and Sligar, S. G. (1998) Functional implications of the proximal hydrogen bonding network in myoglobin: a resonance raman and kinetic study of Leu89, Ser92, His97, and F-swap mutants. *Biochemistry 37*, 12301−12319.
44. Mizutani, Y., and Kitagawa, T. (2001) Ultrafast dynamics of myoglobin probed by time-resolved resonance Raman spectroscopy. *Chem. Rec. 1*, 258−275.
45. Ramdsen, J., and Spiro, T. G. (1989) Resonance Raman evidence that distal histidine protonation removes the steric hindrance to upright binding of carbon monoxide by myoglobin. *Biochemistry 28*, 3125−3128.
46. Akiyama, K., Fukuda, M., Kobayashi, N., Matsuoka, A., and Shikama, K. (1994) The pH-dependent swinging-out of the distal histidine residue in ferric hemoglobin of a midge larve (*Tokunagayusurika akamusi*). *Biochim. Biophys. Acta 1208*, 306−309.
47. Walker, F. A. (2004) Models of the bis-histidine-ligated electron-transferring cytochromes. Comparative geometric and electronic structure of low-spin ferro- and ferrihemes. *Chem. Rev. 104*, 589−561.

48. a. Das, D. K., and Medhi, O. K. (1998) The role of heme propionate in controlling the redox potential of heme: square wave voltammetry of protoporphyrinato IX iron(III) in aqueous surfactant micelles. *J. Inorg. Biochem. 70*, 83−90. b. Matsuoka A., and Shikama, K. (1992) Stability properties of *Aplysia* oxymyoglobin: effect of esterification of the heme propionates. *Biochim. Biophys. Acta 1118*, 123−129.
49. Springer, B. A., Sligar, S. G., Olson, J. S., and Phillips, G. N., Jr. (1994) Mechanisms of ligand recognition in myoglobin. *Chem. Rev. 94*, 699−714.
50. Sato, A., Sasakura, Y., Sugiyama, S., Sagami, I., Shimizu, T., Mizutani, Y., and Kitagawa, T. (2002) Stationary and time-resolved resonance Raman spectra of His^{77} and Met^{95} mutants of the isolated heme domain of a direct oxygen sensor from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem. 277*, 32650−32658.
51. Harutyunyan, E. H., Safonova, T. N., Kuranova, I. P., Popov, A. N., Teplyakov, A. V., Obmolova, G. V., Rusakov, A. A., Vainshtein, B. K., Dodson, G. G., Wilson, J. C., and Perutz, M. F. (1995) The structure of deoxy- and oxy-leghaemglobin from lupin. *J. Mol. Biol. 251*, 104−115.
52. Fauchere, J. L., and Pliska, V. (1983) Hydrophobic parameters of amino acid side chains from the partitioning of *N*-acetyl-amino acid amides. *Eur. J. Med. Chem. 18*, 369−375.
53. Sato, H., Watanabe, M., Hisaeda, Y., and Hayashi, T. (2005) Unusual ligand discrimination by a myoglobin reconstituted with a hydrophobic domain-linked heme. *J. Am. Chem. Soc. 127*, 56−57.

BI051696H

5. Article V

Role of Distal Arginine in Early Sensing Intermediates in the Heme Domain of the Oxygen Sensor FixL

Audrius Jasaitis, Klara Hola, Latifa Bouzhir-Sima, Jean-Christophe Lambry, Veronique Balland,
Marten H. Vos, and Ursula Liebl

Biochemistry 2006, 45, 6018-6026

Role of Distal Arginine in Early Sensing Intermediates in the Heme Domain of the Oxygen Sensor FixL†

Audrius Jasaitis,‡ Klara Hola,‡,§ Latifa Bouzhir-Sima,‡ Jean-Christophe Lambry,‡ Veronique Balland,|| Marten H. Vos,*,‡ and Ursula Liebl‡

CNRS, UMR 7645, Laboratory for Optical Biosciences, Ecole Polytechnique, 91128 Palaiseau Cedex, France, INSERM, U696, 91128 Palaiseau Cedex, France, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videnska 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic, and Laboratoire de Biophysique du Stress Oxidant, SBE/DBJC and CNRS URA 2096, CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France

Received January 4, 2006; Revised Manuscript Received March 24, 2006

ABSTRACT: FixL is a bacterial heme-based oxygen sensor, in which release of oxygen from the sensing PAS domain leads to activation of an associated kinase domain. Static structural studies have suggested an important role of the conserved residue arginine 220 in signal transmission at the level of the heme domain. To assess the role of this residue in the dynamics and properties of the initial intermediates in ligand release, we have investigated the effects of R220X (X = I, Q, E, H, or A) mutations in the FixLH heme domain on the dynamics and spectral properties of the heme upon photolysis of O_2, NO, and CO using femtosecond transient absorption spectroscopy. Comparison of transient spectra for CO and NO dissociation with steady-state spectra indicated less strain on the heme in the ligand dissociation species for all mutants compared to the wild type (WT). For CO and NO, the kinetics were similar to those of the wild type, with the exception of (1) a relatively low yield of picosecond NO rebinding to R220A, presumably related to the increase in the free volume of the heme pocket, and (2) substantial pH-dependent picosecond to nanosecond rebinding of CO to R220H, related to formation of a hydrogen bond between CO and histidine 220. Upon excitation of the complex bound with the physiological sensor ligand O_2, a 5−8 ps decay phase and a nondecaying (>4 ns) phase were observed for WT and all mutants. The strong distortion of the spectrum associated with the decay phase in WT is substantially diminished in all mutant proteins, indicating an R220-induced role of the heme in the primary intermediate in signal transmission. Furthermore, the yield of dissociated oxygen after this phase (∼10% in WT) is increased in all mutants, up to almost unity in R220A, indicating a key role of R220 in caging the oxygen near the heme through hydrogen bonding. Molecular dynamics simulations corroborate these findings and suggest motions of O_2 and arginine 220 away from the heme pocket as a second step in the signal pathway on the 50 ps time scale.

In the bacterium *Bradyrhizobium japonicum* (*Bj*),[1] the FixL/FixJ two-component regulatory system is part of the signaling cascade that enables the organism to adapt its respiratory metabolism to the aerobic or microaerobic state of its environment. FixL is a heme-containing multidomain protein (*1*). It contains a histidine kinase domain that phosphorylates the transcription factor FixJ and an oxygen-sensing heme domain FixLH (*2*, *3*). The kinase activity of this protein dramatically decreases when oxygen binds to the heme. FixL activity is also modulated by binding of other gaseous ligands such as CO and NO, but to a far lesser extent (*4*).

FixLH belongs to the family of PAS domains which possess a conserved fold binding various cofactors and are frequently involved in transducing structural protein changes, in the case of FixL in response to the binding of diatomic molecules. Several X-ray crystallographic structures of the *Bj*FixL heme domain in the ferric and ferrous unliganded state and with various ligands bound to the heme are available (*5*−*8*) as well as the three-dimensional structure of FixLH from *Rhizobium meliloti* (*9*). These structures provide models for the starting and end points of signal transmission within the heme domain, and mechanistic models for the pathway between these points have been proposed (*6*, *9*).

Elements of the transmission pathway can in principle be experimentally unravelled using time-resolved studies, initiated by ligand binding or dissociation. In particular, the fact that in FixL the signaling molecule binds to a heme cofactor can be exploited, as diatomic ligands can be photodissociated using a short light pulse, allowing subsequent observation of very short-lived intermediates in the liganded → unliganded pathway. The kinetics of ligand binding and the

† A.J. was the recipient of an EMBO long-term fellowship, and K.H. was the recipient of an EC Marie Curie Training Site fellowship.

* To whom correspondence should be addressed. Telephone: +33169084777. Fax: +33169083017. E-mail: marten.vos@polytechnique.edu.

‡ CNRS UMR 7645 and INSERM U696.

§ Academy of Sciences of the Czech Republic.

|| CEA/Saclay.

[1] Abbreviations: *Bj*, *Bradyrhizobium japonicum*; FixLH, heme domain of FixL; MD, molecular dynamics; WT, wild type.

10.1021/bi060012i CCC: $33.50 © 2006 American Chemical Society
Published on Web 04/18/2006

spectral characteristics of intermediates have been studied using various spectroscopic techniques (*10*−*13*). As in most heme proteins, CO rebinding is essentially bimolecular and can be studied with nanosecond and lower time resolution. In this way, resonance Raman spectroscopy with nanosecond pulses provided indications that the heme structure of the CO-photodissociated complex differs from the relaxed deoxy state (*11*), and transient absorption data suggested that on a millisecond time scale the relaxed deoxy state is recovered (*13*). In view of the high yield of geminate heme−ligand rebinding (*12*), the characterization of the dissociated complex for NO and the physiological ligand O_2 requires a much higher time resolution. Using femtosecond transient absorption spectroscopy, we have previously shown substantial constraints on the heme spectrum upon excitation of the liganded FixLH complexes in the order O_2 > NO > CO (*12*), implying the buildup of intermediate states between heme-liganded and relaxed unliganded states. In addition, specifically for oxygen, extremely fast (5 ps) re-formation of the steady-state heme−O_2 complex was observed with only ∼10% O_2 escaping from the heme pocket (*12*). Thus, despite the low oxygen affinity (130 μM) (*10*), the heme pocket efficiently traps oxygen and acts as a picosecond "bistable switch", which allows a fraction of dissociated oxygen to bring about the ensemble of further intermediates in the sensing process. Although the steady-state heme configurations are very similar to those in nonsensor heme proteins such as myoglobin, the spectral characteristics of the transients are dramatically different, implying a specific role of the protein environment in the transiently formed initial signaling intermediate.

A conserved arginine residue (R220 in *B. japonicum*) is present in all known FixL proteins, and its equivalent is also found in the distal pocket of the related *Ec*Dos heme-based sensor protein (*14*). This residue has been proposed to play a crucial role in ligand discrimination and in the signal transmission pathway, because of its striking rearrangement between the oxy complex, where R220 is hydrogen-bonded to the terminal oxygen atom, and the deoxy-, NO-, and CO-bound states, where it interacts with propionate 7 of the heme (*6*, *7*). Indeed, a characterization of the R220A mutant of *Bj*FixL revealed modifications of the heme structure and oxygen affinity as well as changes the activity of the enzymatic domain and its regulation (*15*).

To further probe the role of R220 in ligand sensing and early signaling, we have constructed several position 220 mutants of FixLH. Mutations of R220 to I, Q, H, and E were selected to alter the electrostatic and hydrogen bonding properties, with minor steric modifications, and the mutants were characterized by their steady-state resonance Raman spectra and bimolecular ligand interaction properties (*16*, *17*). In addition, the FixLH R220A mutant in which steric modifications are quite substantial was constructed (*15*). For all mutant proteins, the ligand binding and dissociation rates were found to be substantially increased and the overall oxygen affinity was found to be modified (*16*). In this work, we study the influence of these mutations on the initial dynamics and heme perturbations after ligand dissociation using femtosecond spectroscopy. Along with molecular dynamics simulations, our results imply that the presence of the conserved arginine residue at position 220 strongly, but not exclusively, determines the strain on the heme in the initially formed transmission intermediate and the "oxygen cage" properties of the heme pocket.

MATERIALS AND METHODS

DNA manipulations, protein expression, and purification were performed as previously described (*16*).

Sample Preparation. FixLH was prepared to a heme concentration of 50−70 μM in a gastight optical cell with an optical path length of 1 mm. Unless specified otherwise, the buffer was 50 mM Hepes buffer (pH 8.0). For the deoxy form of the protein, the degassed as-prepared (ferric) sample was reduced with 10 mM sodium dithionite. For the CO form, the deoxy form was equilibrated with 1 atm (1 atm = 101.3 kPa) of CO. For measurements in the presence of O_2 and NO, the degassed sample in the ferric state was reduced with 10 mM ascorbate, using 10 μM hexamine ruthenium as a mediator, and subsequently equilibrated with 1 atm of O_2 and 0.01 atm of NO, respectively.

Spectroscopy. Steady-state spectra were recorded using a Shimadzu UV−vis 1601 spectrophotometer. Multicolor femtosecond absorption spectroscopy (*18*) was performed with a 30 fs pump pulse centered at 565 nm and a <30 fs white light continuum probe pulse, at a repetition rate of 30 Hz. Full spectra of the test and reference beams were recorded using a combination of a polychromator and a CCD camera. Multiple time window acquisition schemes were used, with windows ranging from 4 ps to 4 ns full scale. All experiments were carried out at 21 °C. The sample was continuously moved perpendicular to the beams to ensure sample renewal between subsequent pulse pairs.

Basic data matrix manipulations and presentation were performed using Matlab (The Mathworks, South Natick, MA). The absorbance changes were globally analyzed in terms of a multiexponential model and decay-associated spectra using the SPLYMOD algorithm (*19*), with a Matlab interface (*20*).

Molecular Dynamics Simulations. A model of the oxy complex of the *B. japonicum* FixLH heme domain was constructed using the molecular modeling program CHARMM (*21*) (version 30b1) and the crystal structure of the wild type *Bj*FixLH oxy complex (Protein Data Bank entry 1DP6) (*6*). The model includes 104 residues (154−257), one heme, one dioxygen ligand, and 1031 water molecules that surround the protein.

Simulations were performed with a relative dielectric constant of 1 for the entire structure and with a time integration step of 1 fs. Hydrogen atoms were generated using the "HBUILD" CHARMM command. The length of bonds with hydrogen atoms was fixed using the SHAKE algorithm, and nonbonded interactions were gradually set to zero between 8 and 14 Å. After energy minimization using SD and ABNR algorithms, a heating phase from 0 to 300 K over 30 ps and an equilibration phase at 300 K over 300 ps were performed. Free dynamic simulations over 500 ps for WT and 200 ps for mutants with restart backup each 50 ps were achieved. The backbone root-mean-square deviation between the crystal structure and the simulated structure remains below 1.2 Å at all times before dissociation.

Oxy complex models for mutants in which position 220 was occupied by I or A were generated starting from the WT X-ray structure using the same procedure, after deletion

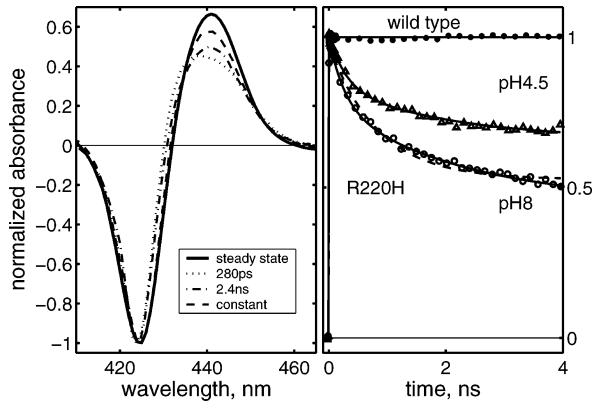


FIGURE 1: CO recombination in the R220H mutant of FixLH. In the right panel is a comparison of kinetics at 442 nm in the wild type (●) and the R220H mutant at pH 8.0 (○) and 4.5 (▲, in 50 mM acetate buffer). The dashed line through the R220H pH 8.0 data is a fit to a single exponential and a constant. The solid lines through the data at both pHs are fits to two exponentials (280 ps and 2.4 ns) and a constant. In the left panel are normalized spectra of components from the multiexponential fit: 280 ps phase (···), 2.4 ns phase (•−•), nonrelaxing phase (- - -), and steady-state CO binding difference spectrum (—). The spectra are normalized at 425 nm; the relative amplitude of the phases is 0.25 (280 ps), 0.35 (2.4 ns), and 0.40 (constant).

of the lateral chain atoms at position 220 and construction of the new atoms with the "IC BUILD" CHARMM command. For WT, R220 was constrained during the equilibration phase to prevent it from "swinging out" of the heme pocket. During the free dynamics of the oxygen-bound form, where the constraint was released, this residue remained in the heme pocket.

Ligand dissociation was simulated by deletion of the bond between heme iron and the dioxygen ligand from the bond list and simultaneous switching of heme parameters from six-coordinate to five-coordinate. The small quadrupolar charge distribution of dioxygen was simulated using a three-charge model (*22*). Different starting conditions of the model before ligand dissociation were obtained by prolonging the free dynamic phase of the oxygen-bound form by subsequent periods of 50 ps. Atom coordinates of the simulated structures were saved each picosecond for further analysis.

RESULTS

CO Dissociation and Rebinding. The steady-state spectra of the FixLH−CO complexes of the different mutant proteins are all similar to those of WT (*16*). As in WT FixLH, with the R220A, R220E, R220Q, and R220I substitutions, the transient spectra were unchanged on the time scale of 4 ps to 4 ns and rebinding of CO to the heme was not observed on this time scale. In WT, the transient spectrum is somewhat altered compared to the steady-state difference spectrum (*12*). In the four above-mentioned mutants, this spectral perturbation was considerably smaller.

In the R220H mutant protein, the CO dynamics are strikingly different. Here substantial heme−CO rebinding does occur in the first few nanoseconds (Figure 1). The rebinding kinetics are described by at least two rebinding phases. A best fit was obtained with time constants of 280 ± 50 ps (25% of the recovery of the bleaching) and 2.4 ± 0.8 ns (35%), and a constant (40%) (the quality of a fit with two exponentials and no constant was slightly, but significantly, lower as judged from the residuals), implying that at most ∼40% of the dissociated CO escapes from the protein. The spectra associated with the decay phases and the asymptotic phase deviate from the steady-state difference spectrum, implying an intermediate heme configuration. This is the case in particular for the spectrum of the faster, 280 ps phase, which is more perturbed than the spectrum associated with dissociated CO in WT FixLH on a similar time scale (*12*), suggesting that the relatively rapid heme−CO rebinding is at least partially due to a constrained heme configuration associated with the presence of a distal histidine.

Table 1: NO Recombination Properties in WT and Different Mutants of FixLH

	fast phase		middle phase		slow phase		
	τ (ps)	Amp (%)	τ (ps)	Amp (%)	τ (ps)	Amp (%)	constant (%)
wild type	4.6	70	17	20	190	5	5
R220H	8.5	83	25	10	1100	4	3
R220Q	8.7	62	−	−	190	28	10
R220A	8.5	50	−	−	105	17	33

When the pH was lowered from 8.0 to 4.5, the relative amplitude of both decay phases decreased (Figure 1). This observation correlates well with a change in the distribution of CO interactions in the CO complex of the R220H as inferred from Fourier transform infrared spectroscopy (see the Supporting Information). These observations reflect conformational changes in the CO environment presumably related to the protonation state of H220 (see Discussion).

NO Dissociation and Rebinding. To study the interaction of FixLH with oxygen and nitric oxide, the degassed sample was reduced with ascorbate (see Materials and Methods). In all mutants, the reduction of the sample was complete, with the exception of R220E [which has a relatively low redox potential (*17*)], where it amounted to only ∼40%.

In the mutants, a stable complex with NO was obtained only for R220H, R220Q, and R220A. The NO rebinding properties of the mutants and wild type are summarized in Table 1. All kinetics are multiphasic, as generally observed in heme proteins (*23*), and are qualitatively similar. In wild-type FixLH, the decay kinetics can be fit with three exponential phases on the picosecond time scale (Figure 2) with similar spectral features. Five percent of NO does not rebind on this time scale, and no further decay was observed up to 4 ns (not shown); therefore, it may escape to the medium (*12*).

The overall rebinding kinetics are somewhat slower for all mutant proteins. The amplitude of the asymptotic phase is similar to that of WT for the R220H and R220Q mutant proteins. A significant influence of the mutation on the release of NO was observed in the R220A mutant, where roughly 33% of NO may escape from the heme pocket (Figure 2).

The transient spectra were different from the steady-state difference spectra, in that the induced absorption lobes were relatively weak, but for all mutants, this perturbation was far less pronounced than for WT. As for the qualitatively similar observation for CO (see above), this implies that in the mutants the ligand-dissociated heme adopts a configuration which is closer to the steady-state unliganded heme than in WT.

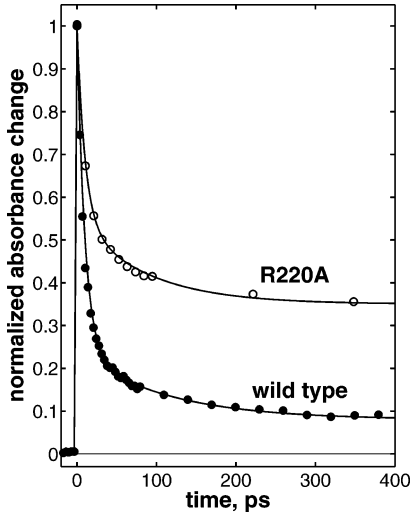


FIGURE 2: NO recombination kinetics in wild-type FixLH and the R220A mutant in the bleaching part of the spectrum (420 nm). Data are normalized.

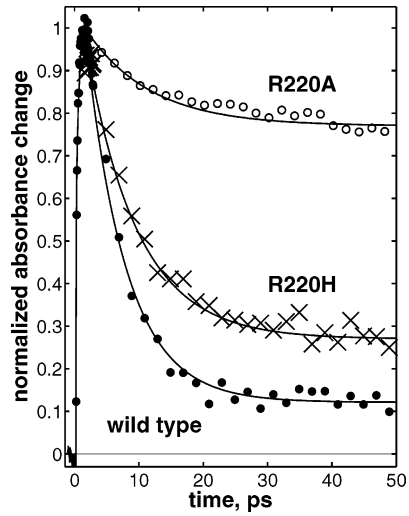


FIGURE 3: Kinetics at 442 nm of oxygenated FixLH: wild type (●), R220A (○), and R220H (×). Lines represent the global exponential fits of the data.

O_2 Dissociation and Rebinding. In the wild-type FixL heme domain, excitation of the oxy complex leads to a state characterized by a spectrum that is strongly perturbed in the induced absorbance part compared to the steady-state oxygen binding. This state decays extremely fast, in a single-exponential process with a time constant of ∼5 ps (Figures 3 and 4A), which we previously assigned to highly efficient geminate recombination of oxygen and heme (*12*). Only ∼10% of photolyzed oxygen leaves the heme pocket and can escape to the bulk.

In most mutant proteins, the oxygen binding properties were altered compared to those of the wild-type form, in which ∼98% of the FixLH population is oxygen-bound (Table 2) upon exposure to 1 atm of O_2. Under these conditions, the R220H mutant fully binds oxygen and the R220Q mutant ∼80% (*16*). Upon addition of O_2 to the R220A, R220E, and R220I mutants, a mixture of ferric, oxy, and deoxy states was obtained (Table 2). The steady-state oxygen binding properties differed most in the R220A mutant, where after addition of 1 atm of oxygen 70% of the sample was found to be oxidized, 10% remained in the deoxy

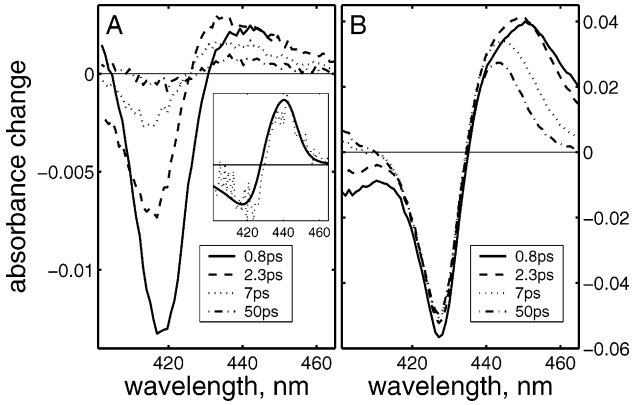


FIGURE 4: Difference spectra at selected time delays after excitation of oxygenated WT (A) and R220A (B) FixLH. The inset in panel A compares the spectrum of the long-lived (>4 ns) phase of WT FixLH (···) with the steady-state deoxy-minus-oxy difference spectrum (—).

Table 2: Reduction and Oxygen Recombination Properties in Different Mutants of FixLH

	reduction (%)	O_2 binding (at 1 atm of O_2) deoxy (%)	oxy (%)	ferric (%)	τ of the oxygen rebinding phase (ps)	constant phase (%)
wild type	100	2	98	−	5.1	10
R220Q	100	20	80	−	8.3	65
R220H	100	−	100	−	7.1 (50%), 600 (30%)	20
R220A	100	10	20	70	5.2	95
R220I	100	40	50	10	5.2	90
R220E	40	20	20	60	4.9	80

state, and only 20% bound oxygen. Comparison of these values with those reported for the full-length R220A protein (*15*) indicates a slightly higher autoxidation rate and oxygen affinity for O_2 of the isolated heme domain.

The steady-state oxygen binding properties complicate the assessment of the light-induced spectral dynamics associated specifically with the oxy complexes, as the excited-state decay of the deoxy and ferric complexes also gives rise to transient signals in the first few picoseconds (*12*, *24*). However, the ferric and deoxy complexes can be easily prepared in pure form, and the transient spectral features (which are relatively weak for the case of ferric hemes) can be measured under the same experimental conditions. As in the wild type (*12*), the ground state of both ferric and deoxy mutant species was recovered with a decay component of ∼5 ps (not shown). The spectral evolution associated with these decay components can be taken into account in the analysis of the oxygenated samples as described below.

For the R220H mutant, where 100% oxy complex is formed, our analysis shows two decay processes with distinct spectra on the time scale of a few picoseconds. The spectrum of the fastest phase (∼5 ps) is significantly red-shifted with respect to the steady-state oxygen dissociation spectrum (Figure 6) and can be ascribed to the decay of an excited state, as in other heme proteins (*25*). A second decay phase (∼7 ps) has a spectrum very similar to the steady-state difference spectrum and can be assigned to geminate oxygen recombination. The amplitude of this phase amounts to roughly half of the dissociated oxygen (due to the closeness of the two time constants, this value should be considered a rough estimate). Finally, 50% of the remaining dissociated

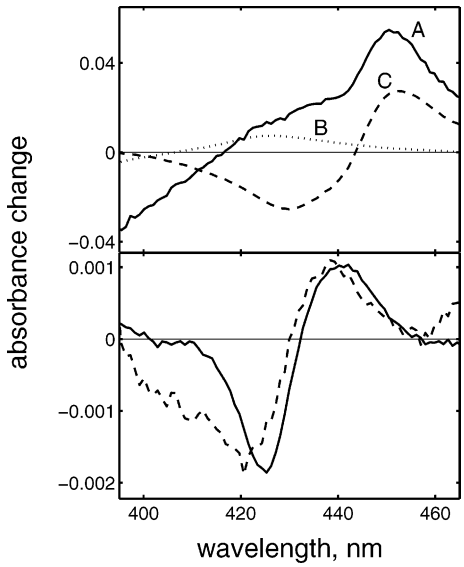


FIGURE 5: Analysis of spectral components associated with oxygen recombination in the R220E mutant of FixLH. In the top panel are spectra associated with the 5 ps component of the oxygenated complex (A, —), the ferric complex (B, ···), and the deoxy complex (C, - - -), obtained under the same concentration and excitation conditions. In the bottom panel (A − 0.6 × B − 0.2 × C) are the reconstructed spectrum associated with the 5 ps component of the oxy complex (- - -) and the constant component divided by 5 (—).

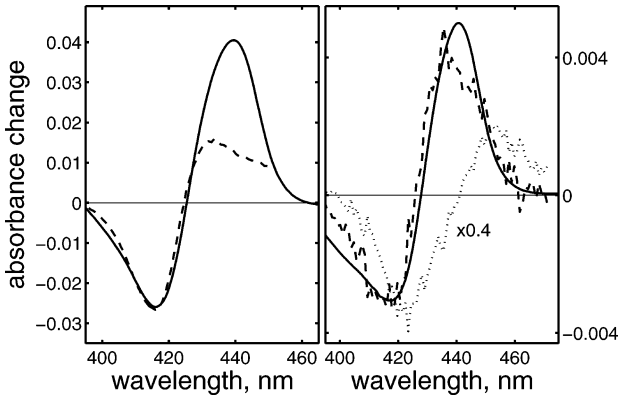


FIGURE 6: Decay components associated with excitation of wild-type FixLH and R220H oxy complexes. In the left panel is a comparison of the steady-state oxygen binding spectrum (—) and the 4.7 ps decay component (- - -) in WT. In the right panel is the same comparison in R220H: steady-state spectrum (—), 5 ps component (···), and 8 ps component (- - -).

O_2 recombines in ~600 ps (not shown) and the remainder in >4 ns. O_2 rebinding on the time scale of 10 ps to 4 ns is not observed in any of the other mutants or in WT.

For the R220Q substitution, sub-10 ps decay components with time constants similar to those for R220H were found (not shown) with the 5 ps component showing a somewhat different shape due to the contribution of a fraction of the excited deoxy complex. For this mutant protein, the fraction of geminate rebinding (in ~8 ps) was ~35%.

For the R220A, R220E, and R220I substitutions, a single picosecond decay component with a time constant of ~5 ps and a constant phase were sufficient to describe the data (Table 2). In principle, the 5 ps component contains contributions from photophysics of the deoxy and ferric forms, as well as from heme−oxygen recombination and/or photophysics of the oxy complex. After subtraction of the deoxy and ferric contributions, for all three mutants a weak

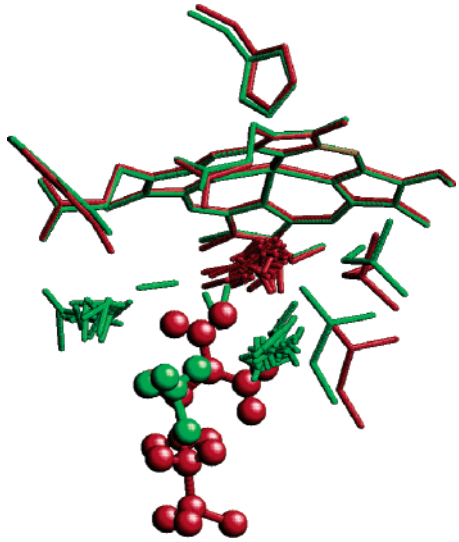


FIGURE 7: Molecular dynamics simulations. Comparison of dynamics upon oxygen dissociation in two typical 50 ps trajectories of WT (red) and R220A (green) FixLH. The position of dissociated oxygen (sticks) at 1 ps intervals is overlaid with one structure of the heme and selected residues (R220 and A220 as balls and sticks). This figure was prepared by using RASMOL (*32*).

spectrum was found that was roughly similar to the steady-state oxygen dissociation spectrum of WT and the R220H and R220Q mutants.[2] Figure 5 illustrates this for the case of the R220E substitution. For all three mutant proteins, the amplitude of this phase was less than 20% of that of the remaining constant phase (Table 2 and Figure 5), which was also similar to the steady-state difference spectrum.

The ensemble of these analyses shows that for all mutant proteins geminate rebinding of oxygen and heme occurs on a time scale of 5−10 ps but that the spectrum associated with this phase is much more similar to the steady-state deoxy-minus-oxy spectrum than in WT. The relative amplitude of the constant phase (time constant of >4 ns) is variable, but in all mutants, it is much higher than in WT.

Molecular Dynamics Simulations. To gain insight into the molecular factors determining the fate of oxygen in the heme pocket, we performed molecular dynamics simulations of wild-type and mutant FixLH. In these studies, after equilibration of the oxygen-bound complex, the Fe−O_2 bond is suddenly discarded and trajectories of the system are continued for a time window of 50 ps. This procedure is repeated for several independent initial conditions at the bond-breaking instant. In these classical simulations, after dissociation, possible bond reformation is not taken into account. In WT FixLH, after deletion of the heme iron−oxygen bond, in most simulations the oxygen molecule does not move away but fluctuates in the vicinity of its initial position close to the heme iron (red structure in Figure 7). In all trajectories of the mutants, oxygen exhibits a higher mobility and moves farther from the heme in the 50 ps time span. In the R220I mutant, oxygen always follows a trajectory out of the heme pocket via isoleucine 215, valine 222, and isoleucine 220. In the R220A mutant (Figure 7), within a few picoseconds, the ligand diffuses via either a

[2] A steady-state deoxy-minus-oxy spectrum cannot be directly obtained for the R220A, R220E, and R220I mutants due to the substantial amount of ferric heme-containing protein contributing to the oxygenated samples.

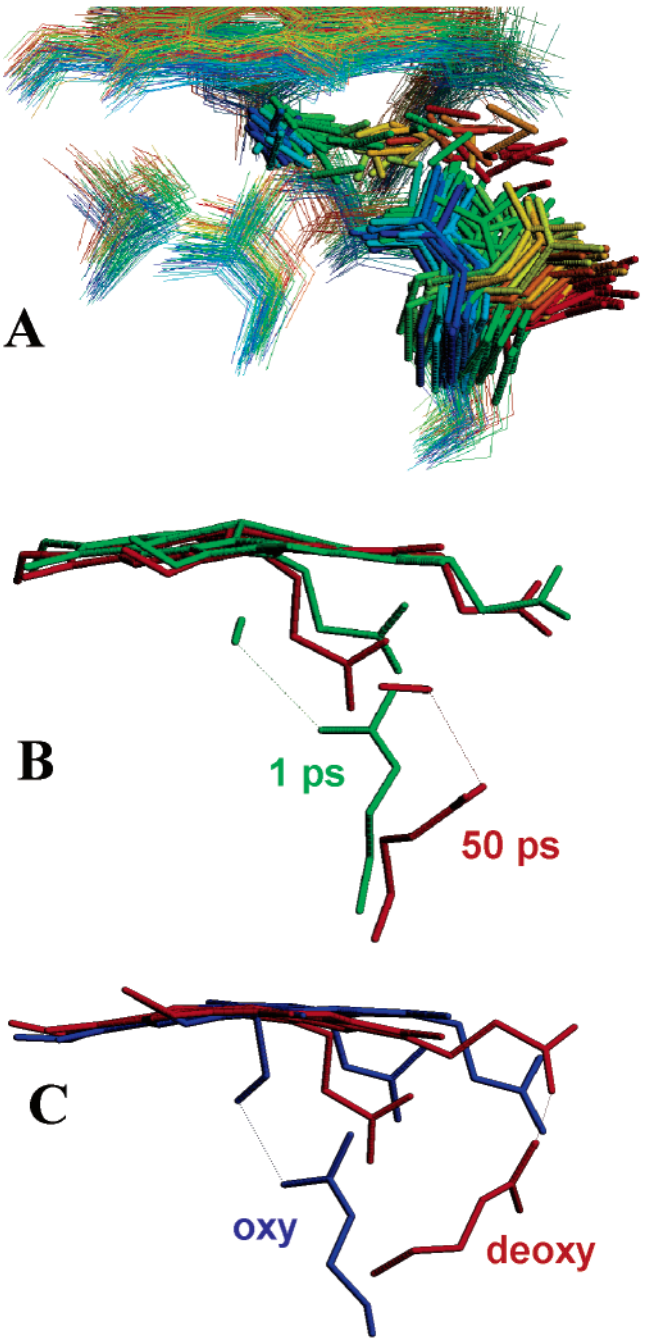


FIGURE 8: Molecular dynamics of WT FixLH during one of the few simulation trajectories in which oxygen leaves the heme pocket (see the text). (A) Superposition of structures at 1 ps intervals between −50 and 50 ps with respect to Fe−O_2 dissociation. Blue to red color coding refers to increasing time. (B) Structures of heme, O_2, and R220 1 ps (green) and 50 ps (red) after dissociation. (C) Crystal structures of the oxy complex (blue) and the deoxy complex (red), taken from Protein Data Bank entries 1DP6 (*6*) and 1LSW (*7*), respectively. In panels B and C, dashed lines represent selected hydrogen bonds and salt bridges inferred from the structures and from the simulations. This figure was prepared using RASMOL (*32*).

pathway leading to a cleft inside the protein delimited by isoleucine 215, leucine 236, and isoleucine 238 (distance to the heme iron of ~7.5 Å) or a pathway similar to that of the R220I mutant.

For WT FixLH, in five of the 13 dissociation simulations, oxygen does move out of the heme pocket. Strikingly, this motion can be associated with a conformational change of arginine 220. In two cases, the R220 side chain follows the oxygen molecule and the interaction energy between oxygen and the arginine side chain is consistent with the hydrogen bond remaining intact during and after this long-distance motion (right panel of Figure 7). In these cases, R220 moves toward its configuration in the deoxy state of FixLH (Figure 8B). However, in all cases, on the 50 ps time scale, heme propionate 7 remains in close interaction with R206 and does not adopt a conformation in which a salt bridge with R220 can be established, as observed in the deoxy structure (Figure 8C). In three of the five trajectories, R220 remained in the heme pocket while O_2 moved out. The inverse was not observed, suggesting that the R220 sweep in the direction of the propionates requires O_2 to be absent from the heme pocket.

DISCUSSION

This work concerns the influence of the distal arginine 220 on the interaction between diatomic ligands and the heme in the FixL heme sensor domain. Our findings demonstrate that the presence of an arginine residue at position 220 is largely responsible for (a) the perturbations of the ligand-dissociated five-coordinate (5-c) heme compared to the steady-state deoxy heme (5-c without ligand in the heme pocket) and (b) the strong reactivity of the heme toward the dissociated physiological sensor ligand O_2. These results are corroborated by molecular dynamics simulations that indicate a continued interaction between heme-released oxygen and heme via the hydrogen bond with R220 in WT.

Spectral Perturbations of 5-c Heme. In WT FixL, dissociation of the heme-bound ligand can be seen as the first step in the transmission of the signal toward the enzymatic domain. The subsequent steps involve additional modification of the heme electronic configuration, as the absorption spectrum of the ligand-dissociated heme is modified with respect to the steady-state 5-c heme (the final configuration in the signaling process), especially for O_2 as the ligand (*12*). Several studies have indicated that R220 is one of the key residues involved in the transmission process (*5*, *6*, *15*, *16*). In this work, we show for substitutions of arginine at position 220, that the spectral perturbations are strongly diminished compared to the WT FixLH spectrum and that the heme adopts a "deoxy-like" configuration within a few picoseconds of ligand dissociation. This implies that R220 is strongly involved in the postdissociation transmission steps involving the heme.

In the WT FixLH−O_2 complex, R220 forms a hydrogen bond with the terminal oxygen atom of heme-bound O_2 (*6*). As isoleucine and alanine are incapable of hydrogen bonding, the decrease in the extent of heme perturbation seen in the dissociated O_2 complexes of the R220I and R220A mutants might be ascribed to this fact. However, similar effects on the transient spectra of the dissociated oxy complexes were observed with other substituted residues that are capable of H-bonding (glutamine and histidine). Indeed, Raman data indicate H-bonding of the terminal oxygen atom in the R220H FixLH−O_2 complex (*16*). Furthermore, hydrogen bonding of heme-bound ligands with a distal histidine residue occurs in other nonsensor, heme proteins such as myoglobin, without sizable spectral effects on the picosecond transient spectra. Together, we can ascribe the strongly perturbed

transient spectra in WT FixLH largely to the specific influence of arginine 220. Our previous steady-state resonance Raman characterization of the FixLH−O_2 complex indicates a strong H-bond between R220 and the terminal oxygen atom as well as an unusual influence on the heme, possibly resulting in a slight doming of the heme iron toward the O_2 ligand (*16*). This feature and the proximity of O_2 after dissociation, as suggested from our MD simulations, may hinder relaxation of the heme toward a deoxy state where the doming is toward the proximal histidine (*6*). Time-resolved resonance Raman studies are presently undertaken to further characterize this important transient state.

For WT FixLH in the presence of NO and CO as ligands, the transient spectra were perturbed to a lesser extent than those of the FixLH−O_2 complex (*12*), presumably due to the lack of direct interaction between R220 and these two ligands (*6*). In full-length FixL, binding of NO and CO to the heme also diminishes kinase activity, but far less than O_2 (*4*). The finding that replacement of R220 also diminishes the perturbation of the spectrum of the NO- and CO-dissociated state (with the exception of the R220H−CO complex; see below) strongly suggests that this residue is also involved in the transmission of the NO and CO signals.

Kinetics of Rebinding. The kinetics of picosecond rebinding of NO to heme proteins are generally nonexponential (*23*) and very sensitive to small changes in the heme environment, as has been deduced from studies on myoglobin mutants (*26*, *27*). The observed variation in the kinetics of NO geminate rebinding in the FixLH mutants and WT is in agreement with this notion. All three studied mutant proteins (R220H, -Q, and -A) exhibit slower overall rebinding kinetics than WT. In particular, R220A shows relatively slow rebinding kinetics on the time scale of tens and hundreds of picoseconds. In view of the marked difference in the size of alanine and arginine, and considering the fact that R220 does not appear to interact directly with heme-bound NO in the X-ray structure (*6*), this indicates that the efficient rebinding kinetics in the WT heme domain are due to volume reduction of the distal heme pocket by R220. The same order of efficiency of NO rebinding in the three mutants (histidine > glutamine > alanine) is observed for CO and O_2 and correlates as well with a decrease in residue size, suggesting that the volume of the heme pocket plays an important role in the kinetics of rebinding of these ligands.

In WT and the R220Q, -A, -E, and -I mutants, rebinding of CO to the heme does not occur on the time scale up to 4 ns, as is the case in most studied heme proteins. The R220H mutant provides a remarkable exception. In this case, at least ∼60% of dissociated CO decays in a multiexponential way (Figure 1), and the spectra associated with these decay phases differ from those associated with the long-lived state and the steady-state difference spectrum. Resonance Raman experiments have shown the presence of two fractions of the R220H−CO complex, one in an "open" configuration [like CO-bound myoglobin at acidic pH (*28*)] where CO does not interact and one in a "closed" configuration where CO does significantly interact with the protein surroundings, possibly via a CO−histidine hydrogen bond (*16*). The observed pH dependence of the geminate rebinding yield (Figure 1) and its correlation with the pH dependence of the CO stretching frequency (see the Supporting Information) imply that the fraction of R220H that rapidly rebinds CO after dissociation corresponds to the closed configuration, where environmental constraints keep dissociated CO in a favorable position for rebinding. Similar constraints may also explain the unusual 600 ps phase of recombination of O_2 to R220H, in view of the hydrogen bond between histidine 220 and the terminal oxygen atom in the R220H oxy complex (*16*).

Using vibrational spectroscopy, as for the R220H−CO complex, two configurations were observed for the R220Q−CO complex, although with a lower population of the closed configuration (*16*). Our finding that in the R220Q mutant no rebinding is observed on the picosecond time scale suggests that in this case the constraints on the dissociated CO either are released rapidly after dissociation or force CO to move away from a favorable rebinding position.

The interaction of the heme with O_2 is most relevant for the physiological functioning of the sensor. In WT and all mutants, a decay phase of ∼5−8 ps and a constant phase were observed after excitation; with the exception of R220H (see above), no O_2 rebinding occurs on the time scale of 8 ps to 4 ns. Thus, in ∼5 ps, O_2 either rebinds or moves to a position much less favorable for rebinding. As similarly a rebinding phase of ∼5 ps is observed for oxyhemoglobin (*25*) and oxymyoglobin (*12*, *29*−*31*), this time constant may correspond to barrierless heme−O_2 binding.

The relative amplitude of the constant (>10 ps) phase, only ∼0.1 in WT, is strongly increased in the mutants and practically unity in the R220A mutant. Thus, the very low yield of dissociated oxygen at times of >10 ps is strongly correlated with the presence of arginine at position 220. Our MD simulations indicate indeed that in the mutants O_2 can move away rapidly from its position occupied immediately after the Fe−O_2 bond is broken. This is particularly clear for the R220A mutant, which has the lowest rebinding yield, but also for the R220I mutant, where steric differences are much smaller.

Our results indicate that the rapid re-formation of the heme−O_2 complex as well as the perturbed heme spectrum of the precursor of this state are largely due to the presence of R220 in WT FixLH. These findings are corroborated by the MD simulations of the WT complex that indicate that O_2 is mostly kept very close to the heme due to the hydrogen bond between R220 and one of the oxygen atoms.

In a few of the simulations in which O_2 does move out of the heme pocket, R220 remains hydrogen bonded with O_2 and also sweeps away from the heme (Figure 8). This suggests a correlated movement of R220 and O_2. Altogether, prior to ligand dissociation, the H-bond with O_2 stabilizes R220 in its conformation toward the heme pocket. After dissociation, R220 can act both as an oxygen trap, allowing fast oxygen recombination, and as a signal "transducer" in case oxygen escapes from the heme pocket. Although the R220 sweep was not observed in all our simulations (limited to 50 ps) where oxygen escapes from the pocket, this charged residue is not likely to be maintained long in the hydrophobic heme environment in the absence of the stabilizing interaction with O_2. Indeed, the strain on the heme appears mostly released after the ∼5 ps decay phase (∼90% of dissociated O_2), as the spectrum of the weak long-lived spectrum is rather similar to the steady-state difference spectrum (Figure 4). Altogether, these findings strongly suggest that, after of the heme−O_2 bond is broken, rebinding with the heme in ∼5

ps competes with oxygen release from the heme pocket on the ~50 ps time scale, the second step in the signaling process, and that the latter process is followed by a marked conformational change of R220, at least in part also on the picosecond time scale. As pointed out in Results, the next step toward the steady-state deoxy structure, a change in the interaction partner of heme propionate 7, is likely to take place on a longer time scale.

CONCLUDING REMARKS

We have shown that in *Bj*FixL R220 plays an important, though not exclusive, role in exerting strain on the heme after dissociation of the ligand and in caging the oxygen ligand. Previously, we have discussed that the heme pocket of FixL acts as a bistable switch, allowing, after thermal (or light-induced) breaking of the heme−O_2 bond, the system either to go back to the oxygen-bound form without further rearrangements or (in ~10% of the cases) to continue to induce structural changes eventually leading to an "anoxy" signal (*12*). Our experimental and computational results presented here indicate that R220 acts as the pivoting element of this picosecond switch.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Jean-Louis Martin for stimulating discussions.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

FTIR characterization of the CO stretching frequency in carboxylated R220H FixLH. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

REFERENCES

1. Gilles-Gonzalez, M. A., Ditta, G. S., and Helinski, D. R. (1991) A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*, *Nature 350*, 170−172.
2. Rodgers, K. R., and Lukat-Rodgers, G. S. (2005) Insights into heme-based O_2 sensing from structure−function relationships in the FixL proteins, *J. Inorg. Biochem. 99*, 963−977.
3. Gilles-Gonzalez, M.-A., and Gonzalez, G. (2004) Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins, *J. Appl. Physiol. 96*, 774−783.
4. Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Dioum, E. M., and Gilles-Gonzalez, M. A. (2002) Ligand and oxidation-state specific regulation of the heme-based oxygen sensor FixL from *Sinorhizobium meliloti*, *Biochemistry 41*, 6170−6177.
5. Gong, W., Hao, B., Mansy, S. S., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.-A., and Chan, M. K. (1998) Structure of a biological oxygen sensor: A new mechanism for heme-driven signal transduction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95*, 15177−15182.
6. Gong, W., Hao, B., and Chan, M. K. (2000) New mechanistic insights from structural studies of the oxygen-sensing domain of *Bradyrhizobium japonicum* FixL, *Biochemistry 39*, 3955−3962.
7. Hao, B., Isaza, C., Arndt, J., Soltis, M., and Chan, M. K. (2002) Structure-based mechanism of O_2 sensing and ligand discrimination by the FixL heme domain of *Bradyrhizobium japonicum*, *Biochemistry 41*, 12952−12958.
8. Key, J., and Moffat, K. (2005) Crystal Structures of Deoxy and CO-Bound bjFixLH Reveal Details of Ligand Recognition and Signaling, *Biochemistry 44*, 4627−4635.
9. Miyatake, H., Mukai, M., Park, S. Y., Adachi, S. I., Tamura, S., Nakamura, H., Nakamura, K., Tsuchiya, T., Iizuka, T., and Shiro, Y. (2000) Sensory mechanism of oxygen sensor FixL from *Rhizobium meliloti*: Crystallographic, mutagenesis and resonance Raman spectroscopic studies, *J. Mol. Biol. 301*, 415−431.
10. Gilles-Gonzalez, M.-A., Gonzalez, G., Perutz, M., Kiger, L., Marden, M. C., and Poyart, C. (1994) Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, are a new class of heme protein with distinctive ligand binding and autoxidation, *Biochemistry 33*, 8067−8073.
11. Rodgers, K. R., Lukat-Rodgers, G. S., and Tang, L. (1999) Spectroscopic observation of a FixL switching intermediate, *J. Am. Chem. Soc. 121*, 11241−11242.
12. Liebl, U., Bouzhir-Sima, L., Negrerie, M., Martin, J.-L., and Vos, M. H. (2002) Ultrafast ligand rebinding in the heme domain of the oxygen sensor FixL and Dos: General regulatory implications for heme-based sensors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99*, 12771−12776.
13. Miksovska, J., Suquet, C., Satterlee, J. D., and Larsen, R. W. (2005) Characterization of conformational changes coupled to ligand photodissociation from the heme binding domain of FixL, *Biochemistry 44*, 10028−10036.
14. Park, H., Suguet, C., Satterlee, J. D., and Kang, C. (2004) Insights into Signal Transduction Involving PAS Domain Oxygen-Sensing Heme Proteins from the X-ray Crystal Structure of *Escherichia coli* Dos Heme Domain (Ec DosH), *Biochemistry 43*, 2738−2746.
15. Dunham, C. M., Dioum, E. M., Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Scott, W. G., and Gilles-Gonzalez, M.-A. (2003) A Distal Arginine in Oxygen-Sensing Heme-PAS Domains Is Essential to Ligand Binding, Signal Transduction, and Structure, *Biochemistry 42*, 7701−7708.
16. Balland, V., Bouzhir-Sima, L., Kiger, L., Marden, M. C., Vos, M. H., Liebl, U., and Mattioli, T. A. (2005) Role of Arginine 220 in the Oxygen Sensor FixL from *Bradyrhizobium japonicum*, *J. Biol. Chem. 280*, 15279−15288.
17. Balland, V., Bouzhir-Sima, L., Anxolabéhère-Mallart, E., Boussac, A., Vos, M. H., Liebl, U., and Mattioli, T. A. (2006) Functional implications of the propionate 7−arginine 220 interaction in the FixLH oxygen sensor from *Bradyrhizobium japonicum*, *Biochemistry 45*, 2072−2084.
18. Martin, J.-L., and Vos, M. H. (1994) Femtosecond spectroscopy of ligand rebinding in heme proteins, *Methods Enzymol. 232*, 416−430.
19. Provencher, S. W., and Vogel, R. H. (1983) in *Progress in Scientific Computing* (Deuflhard, P., Ed.) pp 304−319, Birkhauser, Boston.
20. Morgan, J. E., Verkhovsky, M. I., Puustinen, A., and Wikström, M. (1995) Identification of a "Peroxy" Intermediate in Cytochrome bo_3 of *Escherichia coli*, *Biochemistry 34*, 15633−15637.
21. Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., Swaminathan, S., and Karplus, M. (1983) CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations, *J. Comput. Chem. 4*, 187−212.
22. Lambry, J.-C. (1997) Ph.D. Thesis, University of Orsay, Orsay, France.
23. Vos, M. H., and Martin, J.-L. (1999) Femtosecond processes in proteins, *Biochim. Biophys. Acta 1411*, 1−20.
24. Borisov, V. B., Liebl, U., Rappaport, F., Martin, J.-L., Zhang, J., Gennis, R. B., Konstantinov, A. A., and Vos, M. H. (2002) Interactions between heme *d* and heme b_{595} in quinol oxidase *bd* from *Escherichia coli*: A photoselection study using femtosecond spectroscopy, *Biochemistry 41*, 1654−1662.
25. Petrich, J. W., Poyart, C., and Martin, J.-L. (1988) Photophysics and reactivity of heme proteins: A femtosecond absorption study of hemoglobin, myoglobin and protoheme, *Biochemistry 27*, 4049−4060.
26. Carlson, M. L., Regan, R., Elber, R., Li, H., Phillips, G. N., Jr., Olson, J. S., and Gibson, Q. H. (1994) Nitric oxide recombination to double mutants of myoglobin: Role of ligand diffusion in a fluctuating heme pocket, *Biochemistry 33*, 10597−10606.
27. Petrich, J. W., Lambry, J.-C., Balasubramanian, S., Lambright, D. G., Boxer, S. G., and Martin, J.-L. (1994) Ultrafast measurements of geminate recombination of NO with site-specific mutants of human myoglobin, *J. Mol. Biol. 238*, 437−444.
28. Ramsden, J., and Spiro, T. G. (1989) Resonance Raman evidence that distal histidine protonation removes the steric hindrance to upright binding of carbon monoxide by myoglobin, *Biochemistry 28*, 3125−3128.

29. Walda, K. N., Liu, X. Y., Sharma, V. S., and Magde, D. (1994) Geminate recombination of diatomic ligands CO, O_2, and NO with myoglobin, *Biochemistry 33*, 2198−2209.
30. Ye, X., Demidov, A., and Champion, P. M. (2002) Measurements of the Photodissociation Quantum Yields of MbNO and MbO_2 and the Vibrational Relaxation of the Six-Coordinate Heme Species, *J. Am. Chem. Soc. 124*, 5914−5924.
31. Wang, Y., Baskin, J. S., Xia, T., and Zewail, A. H. (2004) Human myoglobin recognition of oxygen: Dynamics of the energy landscape, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101*, 18000−18005.
32. Sayle, R. A., and Milner-White, E. J. (1995) RASMOL: Biomolecular graphics for all, *Trends Biochem. Sci. 20*, 374−376.

BI060012I