

# EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DA FORMA tmK72A DE CITOCROMO *c*

Fernando Correa de Oliveira Rodrigues Morato<sup>1</sup>  
Luis Felipe Gomes Michelin<sup>2</sup>; Katia Cristina Ugolini Mugnol<sup>3</sup>

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail – rbfmorato@hotmail.com<sup>1</sup>  
Estudante de pós-graduação em Biotecnologia; e-mail – lmicelin90@gmail.com<sup>2</sup>  
Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail – katiac@umc.br<sup>3</sup>

Área do Conhecimento: Bioquímica e Biotecnologia.

Palavras-chave: citocromo *c*; expressão; mutação sítio-dirigida.

## INTRODUÇÃO

Os citocromos fazem parte de uma família de proteínas coloridas que têm relação com a presença de um grupo prostético chamado de grupo heme, onde um átomo de ferro localizado em seu centro pode mudar seu estado de oxidação conferindo à proteína a capacidade de se oxidar e reduzir rapidamente. Esta capacidade faz com que o citocromo *c* desempenhe um papel importante na cadeia respiratória mitocondrial (ALBERTS *et. al.*, 2010). Presente na membrana mitocondrial interna, o citocromo *c*, alvo deste estudo, atua também nos processos de morte celular por ativação de cadeia de caspases, sendo um importante alvo de pesquisa para compreensão e controle de processos tumorais. Hoje, com técnicas de biologia molecular, podemos expressar proteínas recombinantes e modificadas com manipulação da sequência de aminoácidos que constituem a estrutura primária das proteínas. Estas, nas quais são efetuadas mutações sítio-específicas em resíduos de aminoácidos utilizando oligonucleotídeos desenhados para essa função, favorecem processos que visam identificar o papel de diferentes aminoácidos na estrutura e na função das proteínas e, a partir daí, demonstrar como alterações podem estar associadas a perda ou mudança de função que acarretam eventualmente em patologias (MUGNOL, 2009; VILLEGAS *et. al.*, 2000; CAFFREY, 1994).. No caso do citocromo *c*, alguns resíduos específicos já foram demonstrados como sendo importantes para sua estrutura e função. Dentre eles destacam-se os resíduos de histidina e de lisina, alguns dos quais associados à ancoragem da proteína à membrana mitocondrial interna (histidinas 26 e 33 e lisinas 22, 25 e 27), outros associados a mudanças no estado de spin (lisina 79) e outros à ancoragem do grupo heme à cadeia proteica (histina 18 e metionina 80). Especificamente o resíduo de lisina 72 tem sido associado aos processos apoptóticos, sendo que estudos demonstraram que quando de sua substituição ocorre perda de eficiência no evento de morte celular (ABDULLAEV, 2002; SHARONOV, 2005). Face a esta constatação torna-se importante demonstrar as alterações estruturais que podem ser responsáveis por esta mudança.

## OBJETIVOS

Realizar a expressão, purificação e caracterização espectroscópica de forma mutante de citocromo *c* com substituição do resíduo de lisina 72 por alanina visando determinar possíveis alterações estruturais decorrentes da modificação.

## **METODOLOGIA**

Plasmídeo desenhado por Rubley e colaboradores (RUMBLEY *et. al.*, 2002) e cedido gentilmente pelo Prof Dr Rafael Radi da Universidad de la Republica em Montevideu, Uruguai, contendo substituição dos resíduos de histidina 26 e 33 por asparagina (forma pwt, H26N/H33N) foi submetido a mutações adicionais para obtenção das formas tmK72A (H26N/H33N/K72A) e tmK79A (H26N/H33N/K79A). Estes plasmídios foram transferidos para cepas BL21 Star de *Escherichia coli* por processo de choque térmico e as bactérias transformadas, selecionadas pela resistência à ampicilina que lhe é conferida pelo plasmídeo em questão, foram submetidas ao processo de expressão e purificação da forma mutante desejada de citocromo *c*. Neste as colônias obtidas pela transformação foram selecionadas em meio LB Ágar contendo ampicilina (1 mg/mL) e transferidas para meio LB Broth contendo o mesmo antibiótico. Após incubação overnight a 37°C sob agitação a 220 rpm, este pré-cultivo foi transferido para 1 litro de meio Terrific, ao qual, passadas 8 horas de incubação também a 37°C e agitação a 220 rpm foi adicionada ao meio 0,8 mM de IPTG para induzir a expressão. Sob incubação a 30°C e agitação a 200 rpm o cultivo foi mantido por 50 horas com coleta de alíquotas a intervalos regulares. Passado o período de expressão, o cultivo foi submetido a centrifugação e o pellet ressuspenso com tampão de lise (HCl 50 mM pH 8,0). O produto obtido foi submetido a ciclos de sonicação facilitado por adição de Lisozima e Tween 20, processo de precipitação de proteínas por sulfato de amônio, ciclos de diálise para retirada do sal e coluna cromatográfica de troca iônica para separação do citocromo *c* das demais proteínas expressas. O citocromo *c* retido na coluna foi eluído com gradiente de NaCl e as alíquotas analisadas em espectrofotômetro fotodiodo Multispec Shimadzu 1500, tendo sido consideradas adequadas as alíquotas em que a reação  $Abs_{410nm}/Abs_{280nm}$  superior a 3,2. Novo ciclo de diálise foi realizado para retirada do sal e a proteína resultante foi concentrada em sistema Amicon. As análises espectroscópicas dos produtos de expressão foram realizadas no mesmo espectrofotômetro e os dados analisados utilizando programa Microcal Origin 6.0.

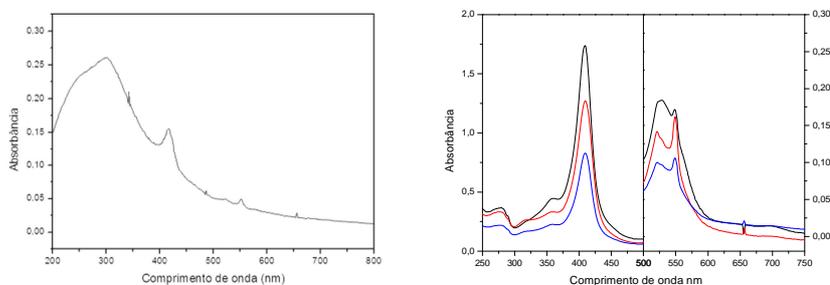
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A expressão da forma pwt (H26N/H33N) resultou em um rendimento satisfatório de 5 mg de proteína purificada por litro de meio de cultura, o que corresponde à média observada também por Rumbley e colaboradores quando da construção do plasmídeo. Mesmo padrão foi observado na expressão da forma tmK79A (H26N/H33N/K79A), que passou íntegro por todo o processo de purificação empregado.

Para a forma tmK72A (H26N/H33N/K72A), entretanto, os resultados foram bem diferentes. Pequena quantidade desta proteína modificada foi obtida, tendo suas características espectroscópicas sido comparadas à de forma nativa e tmK79A antes do término do processo de purificação. Nesta análise foi possível constatar a presença do citocromo *c*, visto a presença das bandas características em 409-412 nm e 500-550 nm (Figura 1A e 1B). No prosseguimento do processo de purificação, que consistiu de ciclos de diálise, cromatografia de troca iônica e novo ciclo de diálise para dessalinização, houve perda da proteína no processo, que demonstrou estar fragmentada já que ultrapassou poros de 3.500 KDa da membrana de diálise empregada no último ciclo, sendo que a forma íntegra da proteína apresenta-se com 12.300 KDa aproximadamente.

Este evento demonstrou que a substituição do resíduo de lisina 72 por alanina tornou difícil o processo de expressão, tendo possivelmente afetado tanto a biogênese da proteína quanto sua estrutura tridimensional, que tornou-se fragilizada e não se manteve durante o processo de purificação realizado.

**Figura 1** – Comparação por espectroscopia no UV-vis da forma tmK72A com as formas nativa, pwt e tmK79A de citocromo *c*. **A** - À esquerda: Espectro no UV-vis de produto de expressão da forma mutante tmK72A. Amostra consiste de alíquota de sobrenadante pós-precipitação com sulfato de amônio mostrando a existência de citocromo *c* como produto da expressão. **B** - À direita: Espectros em UV/vis de citocromo *c* nativo (linha preta), citocromo *c* pwt (linha azul) e citocromo *c* H26N/H33N/K79A (linha vermelha), todos a 100 µM em tampão fosfato de sódio 5,0 mM pH 7,4.



Abdullaev (2002) e Sharonov (2005) referiram que no trabalho com citocromo *c* K72A observaram menor rendimento na expressão desta proteína e que esta, quando empregada para indução de morte celular *in vitro*, necessitou ser acrescida em até cinco vezes a quantidade da forma nativa para desencadear o processo apoptótico.

Tal relato, se comparado aos nossos resultados, confirma que o resíduo de lisina 72 é de fato importante no processo de biogênese do citocromo *c*, o que não foi percebido para o resíduo de lisina 79. Apesar da proximidade e similaridade destes dois resíduos na estrutura primária da proteína, sua substituição por alanina leva a efeitos distintos em sua biossíntese e estruturação tridimensional.

Em resultados de projetos desenvolvidos em paralelo a este foi possível demonstrar que a forma tmK79A apresenta alterações estruturais importantes, particularmente diminuição no conteúdo de alfa-hélice e na disposição da cadeia proteica ao redor do grupo heme. Estas, entretanto, não afetaram sua resistência a altas concentrações de sais e a elevações de temperatura. A substituição da lisina 79, entretanto, implicou na perda da capacidade de desencadeamento de apoptose, evento demonstrado pela microinjeção da forma modificada em células normais de aorta de coelho em comparação ao mesmo processo empregando a forma nativa da proteína.

É fato, portanto, que a substituição da lisina 72 promoveu alterações distintas daquelas observadas no caso da substituição da lisina 79 por alanina, levando a resultados diferentes do esperado (obtenção da forma tmK72A visando sua análise estrutural) mas agregando a informação de que se trata de um resíduo essencial para a biogênese do citocromo *c* e para sua correta estruturação tridimensional.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos até o presente momento permitem inferir que o resíduo de lisina 72 é importante para o correto processo de biogênese do citocromo *c* e que as alterações estruturais decorrentes de sua substituição por alanina tornam a proteína de difícil expressão em cepas de *Escherichia coli* BL21 Star e, que mesmo se expressa, tem uma estrutura fragilizada. Tais constatações são coerentes com a literatura publicada recentemente, que confirmam a importância deste resíduo também no desencadeamento de processos de morte celular por apoptose. Paralelamente, é possível dizer que o resíduo de lisina 79, apesar de também estar implicado também nos processos de morte

celular, não tem sua estrutura tridimensional tão afetada como no caso de substituição do resíduo de lisina 72, mesmo tendo sido observadas alterações estruturais importantes por análises espectroscópicas e de dicroísmo circular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K. & WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Artmed, p. 1268, 2010.

CAFFREY, M.S. Strategies for the study of cytochrome *c* structure and function by site-directed mutagenesis. **Biochimie**, v.76, p.622-623, 1994.

MUGNOL, K.C., ANDO, R.A., NAGAYASU, R.Y., FALJONI-ALARIO, A., BROCHSZTAIN, S., SANTOS, P.S., NASCIMENTO, O.R., NANTES, I.L. Spectroscopic, Structural, and Functional Characterization of the Biophysical Journal, v.94, p. 4066–4077, 2008.

RUMBLEY, J.N; HOANG, L & ENGLANDER, S.W. **Recombinant Equine Cytochrome *c* in Escherichia coli: High-Level Expression Characterization, Folding and Assembly Mutants**. American Chemical Society. v. 41, p. 13894-13901, 2002.

VILLEGAS, J.A., MAUK, A.G., VAZQUEZ-DUHALT, R. A cytochrome *c* variant resistant to heme degradation by hydrogen peroxide. **Chemistry & Biology**, v.7, p.237-244, 2000.