

## **Produção de Formas Mutantes de Citocromo *c* para Investigação De Sítios de Interação com Membrana e Mecanismos Apoptóticos**

**Marcella de Freitas Reis<sup>1</sup>; Profa Dra Katia Cristina Ugolini Mugnolo<sup>2</sup>; Profa Dra Iseli Lourenço Nantes<sup>3</sup>**

Estudante do curso de Biomedicina; e-mail: cecella\_reis@hotmail.com<sup>1</sup>

Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: kcum@uol.com.br<sup>2</sup>

Professora da Universidade Federal do ABC; e-mail: ilnantes@gmail.com<sup>3</sup>

**Área do conhecimento: Bioquímica, Biologia molecular e celular**

**Palavras-chaves: citocromo *c*, mutagênese sítio-dirigida, expressão proteica**

### **INTRODUÇÃO**

O citocromo *c* é uma hemoproteína com peso molecular de aproximadamente 12kDa, localizada na face externa da membrana mitocondrial interna e que tem papel primordial como carreador de elétrons na cadeia respiratória. Sua estrutura é altamente conservada entre diferentes espécies de eucariotos, sendo a variabilidade na sequência de aminoácidos e na extensão da cadeia polipeptídica maior entre procariotos. Tal fato tem associação direta com o desenvolvimento evolutivo de seu papel como agente ativo no processo apoptótico, investigado atualmente visando principalmente o desenvolvimento de novas terapias anti-tumorais. Diferentes sítios do citocromo *c* estão envolvidos também na forma com que a proteína interage com membranas biológicas (Kawai, 2005) e seu estudo fornece informações importantes de como esta proteína atua e de como ocorre o seu *release* da membrana mitocondrial até o citosol, evento fundamental para o desencadeamento da apoptose. Estudos empregando formas de citocromo *c* com substituição em aminoácidos específicos permite elucidar o papel de diferentes resíduos na atividade proteica. Este trabalho visa a obtenção de algumas destas formas mutantes que possam vir a ser empregados posteriormente em estudos de interação do citocromo *c* com sistemas modelo e membranas biológicas e elucidação do papel dos diferentes resíduos de aminoácidos no ganho de propriedades apoptóticas.

### **OBJETIVOS**

Este trabalho visa a obtenção de formas mutantes de citocromo *c* nas histidinas 26 e 33 e nas lisinas 22, 25 e 79, as quais serão empregadas posteriormente em estudos de interação desta proteína com membranas biológicas naturais e modelos, bem como na elucidação do papel destes diferentes resíduos de aminoácidos no ganho de propriedades apoptóticas pelo citocromo *c* durante a evolução das espécies.

### **METODOLOGIA**

Para a obtenção de formas mutantes de citocromo *c* foi utilizado como molde o plasmídeo desenhado por Rumbley, Hoand e Englander, chamado PJRhrsN2, o qual contém o gene para expressão de citocromo *c* e também o gene que codifica a heme-liase, permitindo assim a obtenção da proteína funcional, com grupo heme unido covalentemente à cadeia polipeptídica (Rumbley *et al.*, 2002). Dentre os demais constituintes básicos ao plasmídeo, o PJRhrsN2 possui o gene para  $\beta$ -lactamase (Ampr) que confere resistência à ampicilina e que atua como forma de seleção de colônias transformadas.

Este plasmídeo foi construído já com substituição dos resíduos de histidina 26 e 33 por asparagina, pois isto aumenta a produção de citocromo *c* uma vez que facilita o enovelamento protéico (Patel *et al.*, 2001). Este plasmídeo, portanto, quando expresso produz citocromo do tipo H26N/H33N.

Por técnicas de mutagênese sítio-dirigida (Caffrey, 1994) utilizando-se do Kit Quick Change Mutagenesis, da Stratagene, e oligonucleotídeos específicos para as substituições de resíduos de aminoácidos desejadas, foram produzidos a partir do PJThrsN2 plasmídios contendo gene de citocromo *c* com sequências de nucleotídeos necessárias à produção da proteína com substituições adicionais nas lisinas 22, 25 e 79 por asparagina, originando as formas ditas K22A/H26N/H33N, K25A/H26N/H33N e K79A/H26N/H33N. A confirmação do sucesso da mutagênese foi realizada por sequenciamento.

Estes processos foram realizados no Laboratório de Bioquímica y Biología Molecular da Universidad de La Republica, em Montevideo, Uruguai, durante doutorado da co-orientadora deste trabalho.

De posse dos plasmídeos contendo os genes de citocromo *c* mutantes, para cada um deles foram realizadas transformações em células de *Escherichia coli* BL21 star supercompetentes, comercializadas pela Invitrogen, por técnica de choque térmico. As cepas transformadas foram selecionadas por cultivo a 37°C por 24 horas em meio LB Ágar contendo ampicilina e então submetidas a pré-cultivo na mesma temperatura por 8 horas sob agitação a 220 rpm em meio LB Broth com ampicilina.

O pré-cultivo foi então transferido para 1 litro de meio Terrific contendo também ampicilina e após 8 horas de incubação a 37°C foi adicionado IPTG como indutor de expressão. O cultivo foi mantido por tempo médio de 50 horas a 30°C e 220 rpm e a expressão da proteína acompanhada por extrações periódicas de alíquotas.

Passadas as 50 horas, as células foram precipitadas por centrifugação a 6000g por 20 minutos a 4°C, sendo o precipitado ressuspenso em solução tampão e submetido à sonicação após adição de lisozima e tween 20. Os restos celulares foram removidos por centrifugação a 10000g por 10 minutos a 4°C e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio em excesso para precipitação de outras proteínas presentes. Após agitação procedeu-se a nova centrifugação e a solução obtida foi submetida a diálise overnight contra tampão fosfato de potássio, sob agitação e temperatura de 4°C com troca de tampão após 6 horas de diálise. Em seguida, o citocromo *c* foi oxidado pela adição de ferrocianeto de potássio e então submetido à cromatografia de troca iônica em coluna CM Sepharose Fast Flow. O citocromo retido foi eluído usando um gradiente de NaCl, selecionando-se as frações com melhor grau de pureza a partir do cálculo de relação entre absorbâncias registradas por espectroscopia no UV-vis em 410 e 280 nm. As frações com relação superior a 3,2 foram então reunidas e dialisadas para remoção do sal e posteriormente liofilizadas.

As formas mutantes obtidas foram também analisadas por técnicas eletroforéticas, por dicroísmo circular e dicroísmo circular magnético.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão das formas mutantes H26N/H33N, K22A/H26N/H33N, K25A/26N/H33N e K79A/H26N/H33N resultou em um rendimento médio de 8 mg de citocromo *c* por litro de cultivo para cada uma delas, o que está em acordo com o que foi observado por Rumbley quando da utilização do mesmo plasmídeo PJRhrsN2.

A expressão do citocromo *c* em meio líquido é facilmente observada pelo tom avermelhado que confere ao meio durante o cultivo. Assim, as alíquotas retiradas quando submetidas a centrifugação, revelam no sedimento um tom avermelhado que

aumenta gradativamente conforme o tempo de cultivo. Ao final do processo, entretanto, a mensuração foi quantitativa, tendo sido realizada inicialmente por espectroscopia no UV-vis, utilizando-se como coeficiente de extinção molar a 549 nm o valor de  $0,84 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Foram obtidos valores condizentes com uma concentração em torno de 9 mg/L de citocromo *c*, sendo coerente com o volume residual após a liofilização, que foi de 8 mg/L.

A purificação do citocromo *c* expresso utilizando-se coluna cromatográfica de troca iônica, mostrou-se também muito eficaz, uma vez que a relação entre as absorbâncias em 410 e 280 nm foi superior a 3,2 em mais de 90% das alíquotas extraídas.

As formas mutantes obtidas foram submetidas após liofilização e reconstituição em meio homogêneo a espectroscopia no UV-vis em comparação à forma nativa comercial, baseada em citocromo *c* de coração de cavalo. Percebe-se que não ocorrem alterações nas bandas características do citocromo *c*, o que sugere que a proteína produzida mantém a mesma estrutura tridimensional e a mesma relação entre o grupo heme e a cadeia proteica circundante que a forma nativa.

Adicionalmente, foram realizadas medidas por dicroísmo circular e dicroísmo circular magnético, bastante empregadas em estudos estruturais de proteína, que revelaram-se iguais entre as formas mutantes e a forma nativa utilizada como controle.

Em corrida eletroforética por SDS-page as formas mutantes e a forma nativa apresentam igual deslocamento, condizente com base em marcador de peso molecular, ao citocromo *c* de coração de cavalo.

Para as formas H26N/H33N e K79A/H26N/H33N, procedeu-se também a western-blot utilizando-se anticorpo anti-citocromo *c*, o que revelou a complementaridade entre eles e confirmou que a proteína obtida trata-se de citocromo *c*. Tal resultado foi extrapolado inicialmente para os mutantes nas lisinas 22 e 25, uma vez que todos os demais experimentos corroboram a similaridade, porém será realizado o mesmo experimento confirmatório posteriormente.

## CONCLUSÕES

A técnica empregada para obtenção de formas mutantes de citocromo *c* mostrou-se altamente eficiente, com bom rendimento, produzindo proteínas com estrutura similar à da forma nativa, permitindo assim sua utilização posterior em estudos relacionados ao papel de diferentes resíduos de aminoácidos na interação desta proteína com membranas e no desencadeamento de processos de morte celular, bem como em outros estudos envolvendo o comportamento protéico em diferentes microambientes homogêneos e heterogêneos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

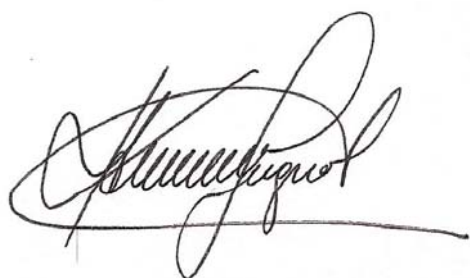
CAFFREY, M.S. Strategies for the study of cytochrome *c* structure and function by site-directed mutagenesis. *Biochimie*, v.76, pp.622-623, 1994.

KAWAI, C.; PRADO, F.M.; NUNES, G.L.C.; Di MASCIO, P.; CARMONA-RIBEIRO, A.M.; NANTES, I.L. pH-dependent interaction of cytochrome *c* with mitochondrial mimetic membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, v.280, n.41, pp. 34709-34717, 2005.

MUGNOL, K.C.U.; 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 Alternative Low-Spin State of Horse Heart Cytochrome *c*. *Biophysical Journal*, v. 94, p. 1–12, 2008.

NANTES, I.L.; FALJONI-ALÁRIO, A.; NASCIMENTO, O.R.; BANDY, B.; GATTI, R.; BECHARA, E.J.H. Modifications in heme iron of free and vesicle bound cytochrome *c* by tert-butyl hydroperoxide: a magnetic circular dichroism and electron paramagnetic resonance investigation. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 28, n. 5, p. 786-796, 2000.

RUMBLEY, J.N., HOANG, L., ENGLANDER, S.W. Recombinant equine cytochrome *c* in *Escherichia coli*: high-level expression, characterization and folding and assembly mutants. *Biochemistry*, v.41, n.47, pp.13894-13901, 2002.



marcella de F. Reis