

# INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA LISINA 79 COMO LIGANTE DO FERRO HEMÍNICO NO CITOCROMO *c* BAIXO SPIN ALTERNATIVO INDUZIDO POR MICELAS DE SDS E MICELAS REVERSAS DE AOT/HEXANO

Débora Martins A Caselli<sup>1</sup>; Iseli Lourenço Nantes<sup>2</sup>; Katia Cristina Ugolini Mugnol<sup>3</sup>

Estudante do Curso de Farmácia; [deboram2@yahoo.com.br](mailto:deboram2@yahoo.com.br)<sup>1</sup>

Professora da Universidade Federal do ABC; [ilnantes@gmail.br](mailto:ilnantes@gmail.br)<sup>2</sup>

Professora/Pesquisadora da Universidade de Mogi das Cruzes, SP; [katiac@umc.br](mailto:katiac@umc.br)<sup>3</sup>

**Área do conhecimento:** Bioquímica, Biologia Molecular e Celular

**Palavras-chave:** citocromo *c*, citocromo *c* mutante, micela, baixo spin alternativo

## INTRODUÇÃO

O citocromo *c* é uma hemoproteína localizada na membrana mitocondrial, tem papel importante em eventos biológicos como o transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial e no desencadeamento da apoptose. Sua efetividade como ativador da apoptose depende de seu estado redox e de sua estrutura, que pode ser modificada com alterações na coordenação do ferro hemínico, as quais podem ser desencadeadas por mudanças no microambiente em que a proteína se encontra (TUOMINEN, 2002), (RYTOMAA, 1995), (GEBICKA, 1999). Foi descrito um estado referido como baixo spin alternativo, onde o citocromo *c* apresenta-se ainda no estado baixo spin, isto é, com o ferro hemínico hexacoordenado, porém menos rômica. Tal condição foi caracterizada como sendo decorrente da substituição no aminoácido que ocupa a sexta posição de coordenação com o ferro hemínico, a metionina 80, por outro resíduo também de campo forte (ZUCCHI, 2003). Mugnol et al (2008), comprovaram que a forma baixo spin alternativo pode ser induzida pela interação do citocromo *c*  $Fe^{3+}$  e  $Fe^{2+}$  com micelas de SDS, um tensoativo aniônico, e também desta forma reduzida de citocromo *c* com micelas reversas de AOT/hexano. Os resultados reforçam a suposição de que a lisina 79 seja o substituinte da metionina 80 como ocupante da sexta coordenação do ferro hemínico neste estado de baixo spin alternativo. Para comprovar esta hipótese, a utilização de formas mutantes de citocromo *c* onde a lisina 79 não esteja presente é a ideal, podendo ser obtidas através de técnicas de biologia molecular empregando especificamente a mutagênese sítio-dirigida.

## OBJETIVO

Comprovar, através da utilização de formas mutantes de citocromo *c* com substituição nas histidinas 26 e 33 e na lisina 79, que este último é o ligante substituinte da metionina 80 quando o citocromo *c* se encontra na forma baixo spin alternativo induzido por micelas de SDS e micelas reversas de AOT/hexano.

## METODOLOGIA

**Obtenção das formas mutantes de citocromo *c*:** A forma original do plasmídeo empregado para a produção de formas mutantes de citocromo *c* já contem mutações nas histidinas 26 e 33, de modo que sua expressão direta resultou no citocromo *c* H26N/H33N denominado pseudo-wild-type (pwt). Mutação adicional a esta foi inserida para substituição do resíduo de lisina 79 por alanina, produzindo a forma H26N/H33N/K79A. A expressão dos plasmídeos foi realizada por transformação em

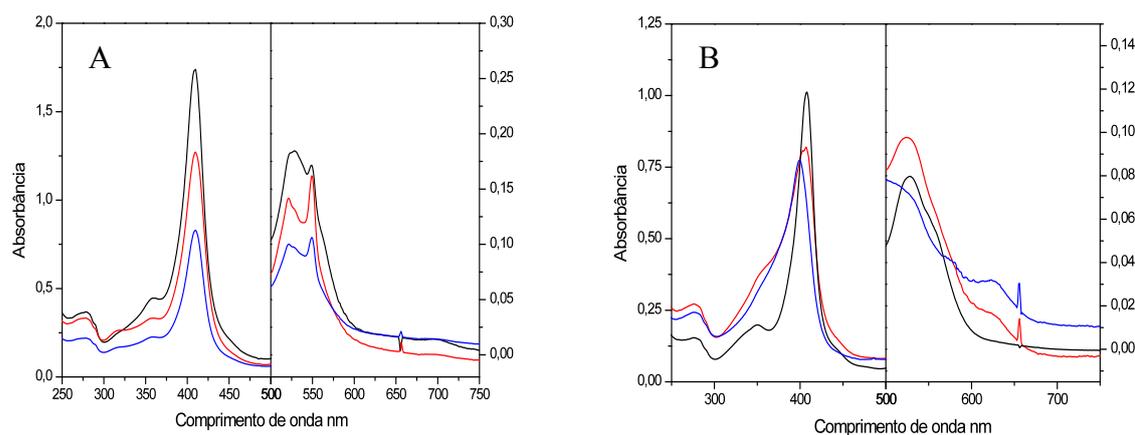
*Escherichia coli* e pré-cultivo posterior em LB Ágar contendo ampicilina como agente de seleção. As colônias transformadas foram cultivadas então em LB-Broth + ampicilina, seguida de transferência para meio Terrific + ampicilina. Após 56 horas de indução, o produto foi submetido a processos de purificação que incluíram sonicação, centrifugação, precipitação de proteínas por sulfato de amônio, diálises, cromatografia de troca iônica, dessalinização e liofilização.

#### **Técnicas espectroscópicas empregadas para caracterização das formas mutantes:**

Foram empregadas técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida, western-blotting, espectroscopia de absorção UV/vis, espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular no Far-UV e *unfolding* térmico monitorado por dicroísmo circular.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

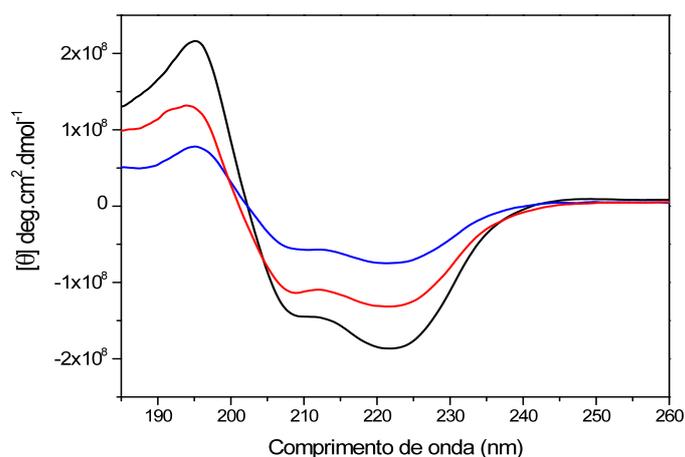
As formas mutantes de citocromo *c* obtidas pelo processo de expressão e purificação tiveram sua identidade confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida e western-blotting empregando anticorpo monoclonal anti-citocromo *c*. Por análises espectroscópicas no UV-vis foi demonstrado que elas não exibem alterações que denotem mudanças na conformação do grupo heme quando em tampão fosfato de sódio (Figura A). Apresentam a banda solet com  $\lambda_{\text{max}}$  em 409 nm para as três formas de citocromo *c* analisadas e também a banda de transferência de carga em 695 nm, o que indica que também não ocorreram mudanças quanto ao sexto ligante do ferro hemínico.



**Figuras A e B** – Espectros UV/vis de citocromo *c* nativo  $\text{Fe}^{3+}$  100 $\mu\text{M}$  (linha preta), citocromo *c* H26N/H33N  $\text{Fe}^{3+}$  100  $\mu\text{M}$  (linha azul) e citocromo *c* H26N/H33N/K79A  $\text{Fe}^{3+}$  100 $\mu\text{M}$  (linha vermelha). Equipamento Multispec 1501- Shimadzu. Cubetas de cristal de quartzo de  $l = 0,1$  cm. **A** - Amostras em tampão fosfato de sódio 5,0 mM pH 7,4. **B** – Amostras em micelas aquosas de SDS 7,0 mM em tampão fosfato de sódio 5,0 mM pH 7,4.

Na presença de micelas aquosas de SDS (Figura B), é possível verificar que ocorre um desvio hipsocrômico da banda solet de 409 nm de  $\lambda_{\text{max}}$  para 407 nm na forma de citocromo *c* nativo, bem como no mutante H26N/H33N/K79A. A forma nativa, entretanto, apresenta característica espectral condizente com a forma baixo spin alternativo, previamente caracterizada, enquanto que para o mutante na lisina 79 isto não é fato. O mutante H26N/H33N (pwt), por sua vez, exibe um desvio maior, sendo que a banda solet passa a um  $\lambda_{\text{max}}$  de 400 nm. As três formas, nativa e mutantes, não apresentam a banda de transferência de carga em 695 nm, o que indica mudanças no ligante. O que se esperava encontrar é que a forma H26N/H33N apresentasse características espectroscópicas condizentes com a forma baixo spin alternativo, induzido por micelas de SDS a 7,0 mM, uma vez que a hipótese formulada é de que

nesta condição a sexta posição de coordenação seja ocupada pela lisina 79. Como este resíduo de aminoácido se encontra presente neste mutante, nenhuma alteração significativa deveria ter sido encontrada em comparação com a forma nativa do citocromo *c*. Esperava-se, entretanto, que o mutante com substituição adicional no resíduo de lisina 79 (H26N/H33N/K79A), quando em presença de micelas de SDS, não demonstrasse as características espectroscópicas do baixo spin alternativo, justamente pela ausência do ligante alvo do estudo. O que se obteve, entretanto, é que nenhuma das formas mutantes apresentou as características espectroscópicas no Uv-vis condizentes com o estado de baixo spin alternativo, o que suprimiu inclusive a necessidade de emprego de micelas reversas de AOT/hexano para monitoramento do processo. Tal falta de evolução para a forma baixo spin alternativo é atribuída à ausência dos resíduos de histina 26 e 33 em ambos os mutantes, aminoácidos estes envolvidos no *fold*ing durante a biogênese do citocromo *c*. Sua substituição por asparagina deu origem a proteínas com menor conteúdo de alfa hélice (Figura C) e menor supressão fluorescência do triptofano (Figura não mostrada). O acréscimo de fluorescência do triptofano é um importante indicativo de que este resíduo de aminoácido encontra-se mais afastado do ferro hemínico, supressor natural de fluorescência, o que corrobora a hipótese de importante modificação na estrutura secundária da proteína. Resultados complementares obtidos em experimentos de desenovelamento (*un*folding) térmico monitorado por dicroísmo circular revelaram que estas alterações também modificaram a cinética e a temperatura média de *un*folding de ambos os mutantes (Figura não mostrada).



**Figura C** - Espectros no far-UV, obtidos por dicroísmo circular, de citocromo *c* nativo Fe<sup>3+</sup> 0,1 mg/ml (linha preta), citocromo *c* H26N/H33N (pwt) Fe<sup>3+</sup> 0,1 mg/ml (linha azul) e citocromo *c* H26N/H33N/K79A Fe<sup>3+</sup> 1 mg/ml (linha vermelha) em H<sub>2</sub>O. Equipamento JASCO-720, cubeta de cristal de quartzo de l = 0,1 cm, velocidade de scanner 50 nm/min e 8 acumulações.

Resultados preliminares quanto à atividade catalítica do citocromo *c* frente a aldeídos e peróxidos empregando as formas mutantes H26N/H33N e H26N/H33N/K79A já demonstraram importantes diferenças no poder de óxido-redução destas formas em comparação à proteína nativa e também entre si. Paralelamente, estudos envolvendo a interação destas formas com sistemas-modelo de membrana e também em sua capacidade de desencadear apoptose estão culminando em resultados bastante promissores.

## CONCLUSÃO

As formas mutantes de citocromo *c* H26N/H33N e H26N/H33N/K79A apresentam alterações na estrutura secundária que as tornam mais suscetíveis à ação das micelas de SDS desfavorecendo sua conversão à forma baixo spin alternativo, com substituição do sexto ligante do ferro hemínico, a metionina 80, por outro ligante de campo forte e, por outro lado, promovendo sua possível conversão à forma alto-spin, pentacoordenada. A ausência das histidinas 26 e 33 promove a expressão de proteínas com menor conteúdo de alfa-hélice e dinâmica e temperatura de *unfolding* distintas da forma nativa. Apesar da forma com mutação na lisina 79 não ter permitido a confirmação do papel deste resíduo de aminoácido como sexto ligante do ferro hemínico na forma baixo spin alternativo induzido por micelas de SDS e AOT/hexano, permitiu a demonstração do importante papel dos resíduos de histidina na estruturação do citocromo *c* durante sua biogênese, como também o papel destes e do próprio resíduo de lisina 79 na atividade catalítica desta proteína frente a acetaldeídos e peróxidos e da implicação de diferentes aminoácidos em sua atividade apoptótica.

## REFERÊNCIAS

- Tuominen, E. K. J., C. J. A. Wallace, and P. K. J. Kinnunen. 2002. Phospholipid-cytochrome *c* interaction. *J. Biol. Chem.* 277:8822–8826.
- Rytomaa, M., and P. K. J. Kinnunen. 1995. Reversibility of the binding of cytochrome *c* to liposomes. *J. Biol. Chem.* 270:3197–3202.
- Gebicka, L., and J. L. Gebicki. 1999. Kinetic studies in the interaction of ferricytochrome *c* with anionic surfactants. *J. Protein Chem.* 18:165–172.
- Zucchi, M. R., O. R. Nascimento, A. Faljoni-Ala'rio, T. Prieto, and I. L. Nantes. 2003. Modulation of cytochrome *c* spin states by lipid acyl chains: a continuous-wave electron paramagnetic resonance (CW-EPR) study of haem iron. *Biochem. J.* 370:671–678.
- Mugnol, K.C., Ando, R.A., Nagayasu, R.Y., Faljoni-Alario, A., Brochsztain, S., Santos, P.S., Nascimento, O.R., Nantes, I.L. 2008. Spectroscopic, Structural, and Functional Characterization of the *Biophysical Journal*, 94: 4066–4077.