

# CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE FORMAS MUTANTES DE CITOCROMO *c* EM *Escherichia coli* MODULADA PELA CAPACIDADE DE RECONHECIMENTO DA HEME LIASE CO-RECOMBINANTE

Marcella de Freitas Reis<sup>1</sup>; Katia Cristina Ugolini Mugnolo<sup>2</sup>; 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-chave:** Citocromo *c*, Mutagênese sítio-dirigida, Expressão protéica, Degradação do heme.

## 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.

O processamento do heme em bactérias também está sendo estudado, pois pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias para combater doenças infecciosas.

## OBJETIVOS

Realizar a expressão e purificação, em *Escherichia coli*, das formas de citocromo *c* com mutações pontuais que resultem na substituição dos resíduos de C14, C17, K22, K25, K27, K79, H18, H26 e H33 por resíduos de alanina a partir de plasmídeos que foram submetidos à técnica de mutagênese sítio dirigida (Rumbley *et al.*, 2002). Estudar a mutação sítio-dirigida feita nos resíduos de cisteína 14, 17 e histidina 18 investigando se a heme liase realmente não conseguiu produzir o holocitocromo *c* ou se o citocromo *c* apenas com ligação covalente do grupo heme na cisteína 17 fica mais instável e acaba desencadeando a degradação.

## METODOLOGIA

Foi realizada já como parte deste trabalho de iniciação científica a técnica de transformação, inserindo o plasmídeo mutante de interesse em cepas bacterianas (*Escherichia coli* BL21 star supercompetentes) comercializadas pela Invitrogen, prosseguindo com a técnica do choque térmico e plaqueamento em LB Ágar contendo ampicilina.

A expressão se deu com pré-cultivos em LB-Broth + ampicilina de *Escherichia coli* transformadas, sendo posteriormente transferidas para o meio Terrific contendo ampicilina e induzidas por IPTG.

Para proceder com a técnica de purificação, as células foram rompidas por meio de sonicação e posterior adição de sulfato de amônio ao sobrenadante.

Após esta primeira etapa de extração de proteínas inespecíficas, a solução foi submetida à diálise overnight. A solução foi então submetida 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 meio da espectroscopia no UV-vis, do fluorímetro (C17A/H26N/H33N) com padrão comercial de bilirrubina, de técnicas eletroforéticas, além de dicroísmo circular e dicroísmo circular magnético.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão das formas mutantes H26N/H33N, K22A/H26N/H33N, K27A/H26N/H33N, K25A/26N/H33, K79A/H26N/H33N, H18A/H26N/H33N, C14A/H26N/H33N e C17A/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 PJRh2N2.

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.

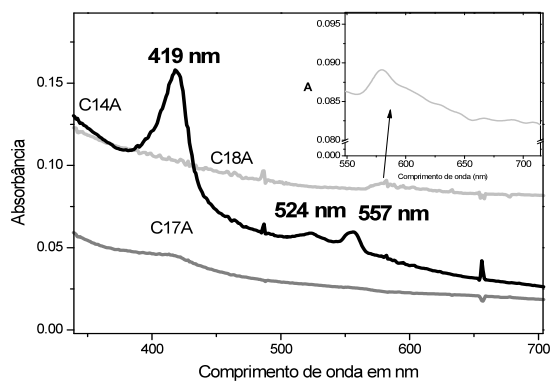
Foram realizadas também medidas por dicroísmo circular e dicroísmo circular magnético, bastante empregadas em estudos estruturais de proteína, que revelaram-se iguais entre as formas mutantes e a forma nativa utilizada como controle.

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.

Surpreendentemente, a remoção da cisteína 17 (C17A/H26N/H33N) provavelmente inviabilizou a ação da heme liase, o produto final da expressão foi diferente. Ao invés do esperado meio de cultivo com tom avermelhado ao final de 50 horas após indução de expressão com IPTG, foi obtido um material de tom esverdeado.



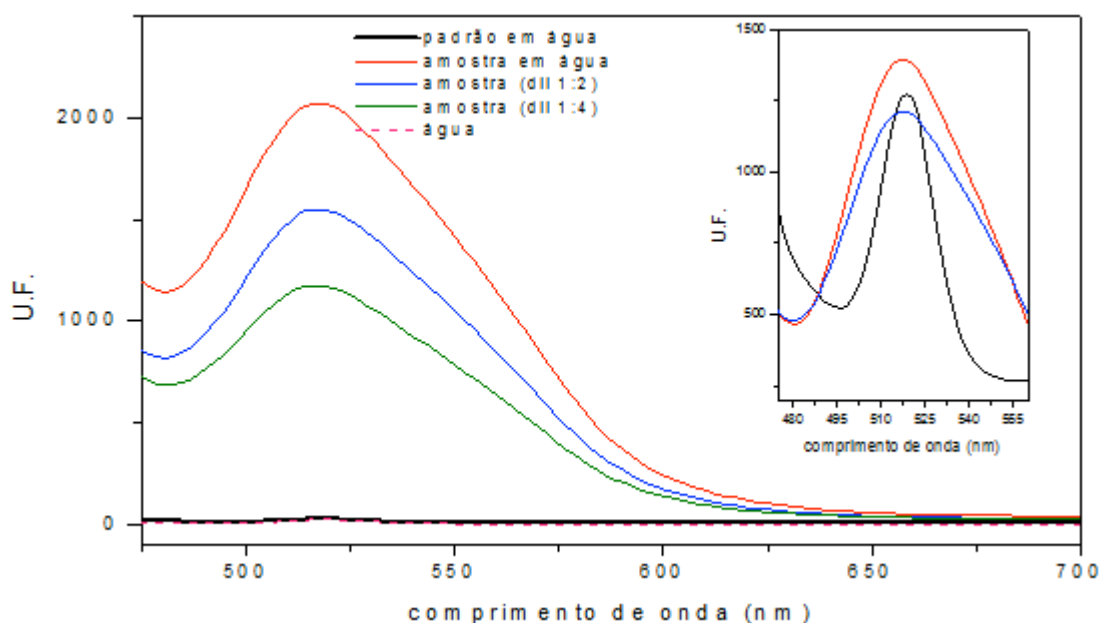
**Figura 1-** Foto ilustrativa de uma amostra de pwt citocromo *c* contendo mutação adicional na cisteína 17 obtida logo após a etapa de sonicação.



**Figura 2-** Espectroscopia no UV-vis das formas mutantes de citocromo *c* obtidas por mutação sítio-dirigida: H26N/H33N/H18A (cinza claro), H26N/H33N/C14A (preto) e H26N/H33N/C17A (cinza escuro).

O resíduo de cisteína 17 está envolvido na ancoragem do grupo heme à cadeia proteica e a histidina 18 representa o quinto ligante do ferro hemínico. Portanto, a falta de um resíduo de aminoácido envolvido em uma das ligações covalentes do anel porfirínico ao apocitocromo *c* implicou na incapacidade de formação do holocitocromo *c*. Os resultados anteriores mostraram que houve melhor rendimento de holocitocromo *c* com

mutação em cisteína 14 o que nos faz supor que a cisteína 17 deve ser preferencialmente o primeiro aminoácido a ser ligado covalentemente ao heme o que dá estabilidade ao complexo e facilita a ligação da cisteína 14 na sequência de reações. Outra possibilidade é que o citocromo *c* com ligação covalente do grupo heme apenas na cisteína 14 fica mais instável e acaba sendo direcionado para degradação. Por outro lado, a ausência da histidina 18 deve ter resultado em um complexo não covalente do citocromo *c* com o heme muito instável ou ausente, visto que a coordenação do ferro com a histidina segura a proteína junto ao grupo prostético de tal forma que a heme liase possa agir e fazer as ligações covalente. Como a heme liase não conseguiu fazer o holocitocromo *c* nas condições descritas acima, a apoproteína e o grupo heme foram degradados durante o processo de expressão ou a heme liase nem conseguiu completar a biogênese porque o complexo não covalente ficou instável.



**Figura 3-** Amostra C17A/H26N/H33N analisada por espectro de fluorescência, em água, em diferentes diluições (pura (linha vermelha contínua), diluída 1:2 (linha azul) e diluída 1:4 (linha verde) em comparação ao padrão comercial de bilirrubina (linha preta). Comprimento de onda de excitação em 440 nm (excitação da bilirrubina) e 10 nm de fenda. No inserto, mesmo resultado, porém normalizado em relação ao padrão.

O produto da expressão da forma mutante C17A/H26N/H33N teve fluorescência testada em comparação ao padrão de bilirrubina comercial e foi possível observar que emitiu fluorescência no mesmo comprimento de característico deste produto.

## 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. O ferro hemínico do citocromo *c* nativo se manteve hexacoordenado ao anel tetrapirrólico da porfirina e a quinta e sexta posição de coordenação mantiveram-se ocupadas pela histidina 18 e outro aminoácido que pode não ser a metionina 80, respectivamente.

As formas mutantes C14A/H26N/H33N, C17A/H26N/H33N e H18A/H26N/H33N, produziram um produto diferenciado que provavelmente se deve a degradação do citocromo *c* expresso em função do comprometimento mais acentuado da estruturação das proteínas. Em especial, a remoção da cisteína 17 (C17A/H26N/H33N)

provavelmente provocou um catabolismo do heme produzido pela bactéria, que resultou em um derivado do tipo bilirrubina.

## 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.

LIU, Y.; MONTELLANO, PRO. Reaction intermediates and single turnover rate constants for the oxidation of heme by human heme oxygenase-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (8):5297-5307, 2000.

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.

TUOMINEN, E. K.; WALLACE, C. J.; KINNUNEN, P. K.. Phospholipid-cytochrome *c* interaction: evidence for the extended lipid anchorage. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n .11 , p. 8822- 8826, 2002.