

ANÁLISE COMPARATIVA DE ATIVAÇÃO DE CASPASE-3 POR FORMAS MUTANTES DE CITOCROMO *c*

Danielli Aparecida Selegatto¹; Luis Felipe Gomes Michelin²; Katia Cristina Ugolini Mugnolo³.

Estudante do Curso de Medicina; e-mail: dani_selegatto@hotmail.com¹

Aluno do curso de mestrado em Biotecnologia; e-mail: lmichelin90@gmail.com²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: katiac@umc.br³

Área do conhecimento: Bioquímica

Palavras-chave: citocromo-c; caspase-3; apoptose.

INTRODUÇÃO

O citocromo *c* é uma heme proteína situada na face externa da membrana mitocondrial interna, responsável por transferir elétrons na cadeia respiratória mitocondrial entre os complexos citocromo *c* redutase e citocromo *c* oxidase, respectivamente complexos III e IV, além de estar envolvida em processos de apoptose. Apoptose é a morte celular programada e natural, ativada por estresse celular, por falta de fatores de crescimento celular ou por proteínas apoptóticas, levando a ativação de proteases chamadas caspases (cisteínaaspartil proteases), as quais hidrolisam peptídicas e são clivadas por enzimas denominadas pró-caspases (DEVLIN, 2007). Em um dos mecanismos de apoptose, há liberação de citocromo *c* através de poros gerados na membrana mitocondrial que permitem sua saída para citosol, onde se liga ao Apaf1 (*apoptotic protease activating factor1*), dando origem a um complexo denominado apoptossomo (DEVLIN, 2007; NIIMI *et al.*, 2012). Com uso de ATP, este conjunto sofre alterações estruturais que permitem a ativação autocatalítica de pró-caspase 9 a caspase-9, a qual ativa a caspase-3. Esta última está envolvida na ativação de outras quatro caspases (caspases-2, -6, -8 e -10) na cascata e participa também no mecanismo de *feedback* positivo sobre a própria caspase-9, estimulando conversão de mais pró-caspase 9 em sua forma ativa e, assim, reforçando a cascata para ativação de mais caspases (JÄNICKE *et al.*, 1998; SLEE *et al.*, 1999). Além disso, a caspase-3 é responsável por participar da clivagem de outras proteínas e é necessária também para fragmentação da fita de DNA e para provocar alterações morfológicas da célula durante a apoptose. Pequenas variações que ocorrem na sequência de aminoácidos no citocromo *c* de diferentes espécies podem ter relação com sua capacidade em desencadear o processo de morte celular por apoptose. Desta forma, trabalhar com diferentes formas de citocromo *c* com modificações em pontos específicos pode ser uma maneira de demonstrar o papel dos diferentes resíduos de aminoácidos nesta propriedade.

OBJETIVO

Objetivo geral é demonstrar e comparar o efeito pró-apoptótico de formas mutantes de citocromo *c* via ativação *in vitro* de caspase-3. Objetivos específicos são: verificar por espectrofluorimetria se formas mutantes de citocromo *c* H26N/H33N, K22A/H26N/H33N, K25A/H26N/H33N, H26N/K27A/H33N, H26N/H33N/K72A e H26N/H33N/K79A, referidas resumidamente como pwt, tmK22A, tmK25A, tmK27A, tmK72A e tmK79A, são capazes de ativar igualmente caspase-3 em extrato citosólico obtido a partir de células de músculo liso de aorta de coelho em comparação com a forma nativa de citocromo *c*; determinar a cinética de ativação de caspase-3 para cada uma das formas testadas.

METODOLOGIA

Para a obtenção de formas mutantes de citocromo *c*, foi utilizado como molde o plasmídeo PJRhrsN2, que 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). Este plasmídeo possui também duas mutações pontuais nas histidinas 26 e 33, substituídas por asparagina, uma vez que resíduos de histidina agem como uma barreira cinética ao enovelamento protéico, aumentando o rendimento da expressão. O plasmídeo PJRhrsN2 é em bactérias do tipo *Escherichia coli* BL21 Star e a expressão realizada em meio Terrific pós-indução com IPTG, obtendo a forma *pseudowild-type* (pwt) de citocromo *c* (H26N/H33N). A partir do plasmídeo PJRhrsN2, já foram previamente realizadas como parte de um outro projeto mutações sítio-específicas dirigidas por oligonucleotídeos seguindo protocolos existentes na literatura (CAFFREY, 1994; PATEL *et al.*, 2001) e assim obtidas formas capazes de expressar os mutantes nas lisinas 22, 25, 27, 72 e 79 necessárias para este projeto. Estas formas expressas são nomeadas como K22A/H26N/H33N, K25N/H26N/H33N, H26N/K27A/H33N, H26N/H33N/K72A e H26N/H33N/K79A ou, de forma resumida, tmK22A, tmK25A, tmK27A, tmK72A e tmK79A, onde tm representa um triplo mutante. Foram cultivadas em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂ células aderentes de músculo liso de aorta de coelho em meio DMEM-high glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino e “pool” de antibióticos (10.000 unidades de penicilina e 10 mg de estreptomicina por mL em 0,9% de NaCl) com verificação de percentual de confluência a cada 24 horas. Atingida confluência de 70%, o meio de cultura foi descartado e as células aderidas lavadas com meio CMF. A seguir, as células foram destacadas da parede do frasco de cultura por adição de solução de tripsina em CMF + EDTA com incubação nesta solução por 3 minutos a 37°C seguida de neutralização da enzima por adição de DMEM. O produto final deste processo foi centrifugado por 10 minutos a 10000xg, sendo o pellet ressuspense em 1 mL de tampão. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em solução de lise, oferecida por kit comercial utilizado a partir desta etapa (EnzChek Caspase-3 Assay Kit da Molecular Probes). Foram adicionados 50 µL da solução de lise previamente diluída (tampão 20X concentrado + 950 µL de água deionizada). Após homogeneização suave, a solução foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos para reação e, em seguida, submetida a 3 ciclos de congelamento e descongelamento rápido, visando o rompimento das células e liberação da fração citosólica, sendo 30 minutos em freezer -60°C e descongelamento espontâneo à temperatura ambiente. O material resultante foi, então, centrifugado por 10 minutos a 10.000xg sendo o sobrenadante reservado em banho de gelo até o momento do uso. A partir do extrato citosólico obtido, foram realizados os testes de ativação de caspase-3 por reação enzimática a partir de um substrato fluorogênico, o Z-DEVD-AMC, e como controle um inibidor de caspase, o Ac-DEVD-CHO, empregando kit EnzCheck Caspase-3 da Molecular Probes (USA). Este método baseia-se na clivagem do peptídeo Z-DEVD-AMC pela forma ativada de caspase-3 com liberação consequente da porção AMC, cuja concentração é usada como referência para determinação da atividade da enzima, visto emitir fluorescência em 442 nm quando submetido à excitação em 342 nm. A partir da confecção de uma curva padrão de AMC livre, é possível avaliar quantitativamente por comparação a atividade de caspase-3. Para o teste, foram empregados 25 µl do extrato citosólico, aos quais foram adicionados, em tubos devidamente identificados, quantidade suficiente de cada forma mutante de citocromo *c* para concentração final deste a 25µM. A cada um dos tubos foram então adicionados 1

mM de dATP, 10 mM de MgCl₂ e 100 μM do substrato fluorogênico Z-DEVD-AMC (mix). Paralelamente serão montados tubos-controle. As medidas de fluorescência foram realizadas em cada uma das amostras, diluídas 20 vezes em água deionizada, utilizando espectrofluorímetro Hitachi F2500. Foram realizadas medidas de ativação de caspase-3 após 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas de incubação. Para demonstração e análises dos dados, foi utilizado o software Origin 6.0 da Microcal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As caspases são proteases sintetizadas na forma de zimogênios (inativa) que hidrolisam seu substrato em um produto ativo. A caspase-3 é uma das proteínas mais essenciais da cascata apoptótica, sendo responsável pela ativação das caspases -2, -6, -8 e -10 e, por isso, é alvo deste estudo (SLEE *et al.*, 1999). Conforme metodologia, obteve-se a purificação e a expressão de apenas quatro das cinco formas mutantes de citocromo *c* selecionadas para esse trabalho. A expressão e purificação da forma triplo mutante H26N/H33N/K72A (tmK72A) não foi possível uma vez que não houve o rendimento necessário da amostra para ser testada com o kit reagente. Em trabalhos anteriores de nosso grupo, foi constatado que esta forma pode ter alterações importantes em sua estrutura, já que sua expressão não obedece ao rendimento que foi obtido das outras quatro formas testadas (pwt, tmK22A, tmK25A, tmK27A e tmK79A). Acredita-se que a troca do resíduo de lisina 72 por alanina tenha alterado o processo de biogênese da proteína em *Escherichia coli*, o que demonstraria que este resíduo, assim como já foi determinado para os de histidina 26 e 33, teria papel importante na biossíntese e estruturação do citocromo *c*. Por este motivo, apenas cinco formas mutantes foram incluídas no teste de ativação de caspase-3. Concomitantemente, foi obtido o extrato citosólico de células de músculo liso de aorta de coelho, submetidas à cultura. Em seguida, foi realizado o teste de caspases, cuja clivagem do peptídeo Z-DEVD-AMC pela forma ativada de caspase-3 libera a fração fluorescente AMC, cuja concentração serve para determinar a atividade de tal enzima. Os resultados obtidos demonstram que todas as formas mutantes testadas foram capazes de ativar a via de caspase-3, levando a célula ao processo de apoptose e não tendo diferenças significativas entre tais formas. A forma tmK27A teve destaque porque somente ela obteve conversão completa semelhantemente à forma nativa de citocromo *c*. Observou-se também menor potencial de ativação de caspase-3 a longo prazo pelas formas mutantes de citocromo *c* em relação a forma nativa, demonstrando que a alteração na estrutura tridimensional do citocromo *c* pode comprometer sua interação com sítios de ligação da própria membrana mitocondrial interna e com outras proteínas do citosol como a Apaf-1. A velocidade com que a ativação de caspase-3 ocorreu também foi diferente da forma nativa, mesmo que ao final do tempo máximo transcorrido para o teste todas tenham convertido totalmente o AMC conjugado ao peptídeo na forma AMC livre. Os resultados obtidos se assemelham ao trabalho de De Paula *et al.* (2013), que demonstrou adicionalmente os níveis de alteração estrutural das formas mutantes por espectrofotometria no UV-vis, por espectrofluorimetria e dicróismo circular. Especificamente para a forma mutante tmK79A, trabalho anterior de Mugnol (2011) demonstrou que a substituição do resíduo de lisina 79 por alanina bloqueou a capacidade apoptótica desta forma de citocromo *c* detectada por microscopia de fluorescência após microinjeção em células normais de músculo liso de aorta de coelho. No teste com extrato citosólico, houve, entretanto, ativação de caspase-3.

CONCLUSÃO

A expressão de formas modificadas de citocromo *c* está atrelada a como as substituições pontuais de aminoácidos afetam a estrutura, a estabilidade e a própria biogênese da proteína. A expressão da forma tmK72A em *Escherichia coli* é prejudicada pela substituição de aminoácido existente, não tendo obtido o rendimento adequado para o projeto. Todas as quatro formas mutantes de citocromo *c* testadas (pwt, tmK22A, tmK25A, tmK27A e tmK79A), apesar de apresentarem alteração em sua estrutura tridimensional, puderam ativar a cadeia de caspase-3, sem comprometimento de seu potencial apoptótico quando submetidas ao teste de ativação de caspase-3, não tendo diferenças significativas entre as formas mutantes. Entretanto, tal potencial foi reduzido se analisado a longo prazo, podendo-se inferir que tais substituições possam afetar sítios de interação de outras proteínas com o citocromo *c*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

DE PAULA, I.M.; TIRELLI, A. B.; PEREIRA, J. A. S.; TÓRTORA, V.; MUGNOL, K. C. U. Formas mutantes de citocromo *c* como ativadores de caspase-3. **Biochemistry and biotechnology reports**, v.2,n.3, p.257-60, 2013.

DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Blücher, 2007. p.993-5.

JÄNICKE, R.U.; SPRENGART, M.L.; WATI, M.R.; PORTER, A.G. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 16, p. 9357-9360, 1998.

NIIMI, S.; ARAKAWA-TAKEUCHI, S.; URANBILEG, B.; PARK, J.; JINNO, S.; OKAYAMA, H. Cdc6 protein obstructs apoptosome assembly and consequent cell death by forming stable complexes with activated Apaf-1 molecules. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 22, p. 18573-18583, 2012.

PATEL, C.N., LIND, M.C., PJELAK, G.J. Characterization of horse cytochrome *c* expressed in *Escherichia coli*. **Protein Expression Purif.** v.22, p.220-224, 2001.

RUMBLEY, J.N., HOAND, L., ENGLANDER, S.W. Recombinant equine cytochrome *c* in *Escherichia coli*: high-level expression, characterization, and folding and assembly mutants. **Biochemistry**, v.41, p.3894-3901, 2002.

SLEE, E.A.; HARTE, M. T.; KLUCK, R. M.; WOLF, B. B.; CASIANO, C. A.; NEWMAYER, D. D.; WANG, H. G.; REED, J. C.; NICHOLSON, D. W.; ALNEMRI, E. S.; GREEN, D. R.; MARTIN, S. J. Ordering the cytochrome *c*-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. **J Cell Biol**, v. 144, n. 2, p.281-292, 1999.