

INVESTIGAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DO RESÍDUO DE LISINA 22 NA CAPACIDADE RESPIRATÓRIA E APOPTÓTICA DO CITOCROMO *c* E EM SUA INTERAÇÃO COM MEMBRANAS BIOLÓGICAS

**Aline de Barros Tirelli¹; Ingrid Mito de Paula²; Cintia Kawai³;
Katia Cristina Ugolini Mugnol⁴**

Estudante do curso de Farmácia; e-mail: aline.tirelli@hotmail.com¹

Estudante do curso de mestrado em Biotecnologia-UMC; e-mail: ingridmito@sercomtel.com.br²

Pós-doutoranda na Universidade Federal do ABC; e-mail: kwcintia@yahoo.com.br³

Docente pesquisadora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: kcum@uol.com.br⁴

Área de conhecimento: Bioquímica, Metabolismo e Bioenergética

Palavras-chave: citocromo *c*, mutantes, lisina 22

INTRODUÇÃO

O citocromo *c* é uma hemoproteína de cerca de 12 kDa que localiza-se na face externa da membrana mitocondrial interna e desempenha um papel fundamental no transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, importante via de biossíntese de ATP, e na ativação da apoptose, quando de sua liberação para o citosol e ativação de caspases. Estes processos estão diretamente relacionados à sua capacidade de óxido-redução e à sua relação com a membrana mitocondrial (Rytömma, 1994; Kinnunen, 2002). É fato conhecido também que o citocromo *c* é um agente de lipoperoxidação. Sua interação com membranas biológicas, compostas por ácidos graxos poliinsaturados e proteínas, é responsável pela geração de radicais livres, importantes agentes no envelhecimento, doenças degenerativas e ateroscleróticas, mas também em processos fisiológicos, como a síntese de prostaglandinas e a renovação das próprias membranas. Quando a produção de espécies reativas aumenta, a lipoperoxidação causa alterações na estrutura das membranas levando a descontrole na permeabilidade, perda da seletividade na troca iônica, formação de produtos citotóxicos e até mesmo a morte celular. Descobertas recentes demonstram que a interação do citocromo *c* com a membrana mitocondrial é dependente de sítios que atuam por interação eletrostática (sítio C), interações hidrofóbicas (sítio A) e interações dependentes de pH (sítio L) (Rytömma, 1994; Kinnunen, 2002; Kawai, 2005), esta última envolvendo os resíduos de lisina 22, 25 e 27, sendo o primeiro o alvo do presente estudo. Empregando-se as atualmente disponíveis ferramentas de biologia molecular e bioquímica, a expressão e purificação de proteínas mutantes, aminoácido-substituídas, permite analisar o papel de seus aminoácidos na dinâmica estrutural e funcional destas biomoléculas e em que grau eles afetam suas propriedades.

OBJETIVOS

Demonstrar o papel do resíduo de lisina 22 na interação do citocromo *c* com sistemas-modelo de membrana e sistemas biológicos e sua interferência na capacidade do citocromo *c* em ativar a cadeia de caspases, transportar elétrons na cadeia respiratória mitocondrial e promover lipoperoxidação.

METODOLOGIA

Para atendimento aos objetivos foram expressas e purificadas as formas mutantes H26N/H33N (dita pseudo wilde-type ou pwt) e K22A/H26N/H33N. A primeira representa a forma expressa diretamente pelo plasmídeo desenhado por Rumbley Hoand e Englander, chamado PJRhrsN2, que contém o gene para expressão do 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, 2002). A substituição original dos resíduos de histidina 26 e 33 por asparagina foi um artifício utilizado para aumentar a produtividade na expressão, dado que estes resíduos estão envolvidos no enovelamento proteico durante a biogênese do citocromo *c*. Já o mutante de interesse foi obtido por mutagênese sítio-dirigida por oligonucleotídeos tendo como molde o mesmo PJRhrsN2, tendo como produto de expressão a forma K22A/H26N/H33N. Cepas de *Escherichia coli* BL21 Star foram utilizadas como vetor de expressão, com inserção do plasmídeo induzida por choque térmico e seleção de colônias transformadas pela resistência à ampicilina. A expressão se deu utilizando pré-cultivos em LB Broth e cultivos em meio Terrific, ambos com ampicilina, e indução por IPTG, sendo que após 50 horas o produto de expressão foi submetido a processo de purificação englobando sonicação como processo de lise celular, precipitação por sulfato de amônio para extração de proteínas inespecíficas, ciclos de diálise para extração do sal e de proteínas menores que 6000 kDa, cromatografia de troca iônica para retenção de citocromo *c* seguida de eluição com gradiente de NaCl. As alíquotas com maior grau de pureza foram selecionadas por medida de absorbância, sendo consideradas adequadas aquelas com relação $A_{409\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ superior a 3,2. Estas foram reunidas e dessalinizadas por diálise e submetidas a processo de concentração proteica por centrifugação empregando filtros Centricon com membrana de 3500 kDa. As formas mutantes obtidas foram submetidas a eletroforese e a análise espectroscópica no UV-vis (espectrofotômetro de fotodiodo Shimadzu - Multispec 1501), à espectroscopia de fluorescência (espectrofluorímetro Hitachi F-200) e ao dicroísmo circular na região do far-UV (espectropolarímetro Jasco 720) para análise estrutural comparativa das formas mutantes entre si e em relação à forma nativa, tanto para caracterização do grupo heme e seus ligantes axiais quanto do conteúdo de alfa-hélice. Para avaliação indireta da capacidade respiratória, que envolve o transporte de elétrons mitocondrial via processo de óxido-redução, foram observadas as alterações espectroscópicas características da redução e da reoxidação do citocromo *c*. Para tanto, foram realizadas medidas por espectroscopia no UV-vis a cada 2 segundos durante 60 minutos empregando como agentes redutor e oxidante o *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BuOOH) e o difenilacetaldeído (DPAA) respectivamente. A propriedade das formas mutantes de citocromo *c* de induzir a geração de radicais livres quando em contato com membranas biológicas, em comparação à forma nativa de citocromo *c*, foi demonstrada pela adição destas a solução de lipossomos compostos por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e cadiolipina (PC/PE/CL) na proporção de 50/30/20%, simulando a composição da membrana mitocondrial interna. O malondialdeído (MDA) formado em função do dano oxidativo aos lipossomos causado pela proteína foi mensurado pelo método de TBARS desenvolvido por Bueg e Aust com medida do complexo MDA-TBA por espectroscopia em 532 nm. A avaliação da capacidade apoptótica se deu pela medida da capacidade de cada forma mutante em ativar, *in vitro*, a cadeia de caspases em comparação à forma nativa. Foram empregadas culturas de células de músculo liso de aorta de coelho (MLAC) em meio Dubelco modificado (DMEN) enriquecido com 5% de albumina bovina, com densidade inicial de 1×10^6 células e repiques a cada 72 horas em média. Foi empregado para lise celular e avaliação fluorimétrica da ativação da cadeia de

caspsases o kit EnzCheck® Caspase-3 Assay Kit (Molecular Probes, USA) cujo substrato fluorogênico é o Z-DEVD-AMC que, se ativada a caspase 3, é clivado e, sob excitação a 340 nm, tem migração do pico máximo de fluorescência de 395 para 442 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão das formas mutantes pwt e K22A/H26N/H33N teve um rendimento médio de quatro miligramas de citocromo *c* por litro de meio, sendo que alíquotas retiradas durante o cultivo demonstraram máximo de concentração da proteína após 50 horas da indução com IPTG. Após processo completo de expressão e purificação, foi feita uma análise espectroscópica das formas mutantes comparadas à forma nativa de citocromo *c*, o que indicou alto grau de similaridade estrutural entre elas, visto que as bandas características da proteína e da hexacoordenação do grupo heme foram mantidas. As bandas N, Soret e de transferência de carga foram mantidas, havendo apenas um desvio de 2 nm para menor comprimento de onda (desvio para azul) para o mutante K22A/H26N/H33N, o que pode indicar um maior afastamento da metionina 80 como ligante do ferro hemínico, sem entretanto ocorrer sua substituição por outro ligante de campo forte, já que a banda em 650 nm foi mantida. Diluições seriadas também demonstraram a manutenção da condição monomérica das formas mutantes. A análise espectroscópica por fluorescência, entretanto, demonstrou que as formas mutantes apresentam diferenças estruturais em relação à forma nativa. A excitação das amostras em 280 nm demonstrou nos mutantes maior grau de fluorescência do triptofano em comparação ao citocromo nativo, resíduo aromático este que na forma nativa apresenta fluorescência suprimida dada sua grande proximidade ao ferro hemínico. Tal observação foi corroborada pela análise por dicroísmo circular na região do far-UV, a qual demonstrou um menor conteúdo de alfa-hélice de ambos os mutantes em relação à forma nativa. Na análise comparativa entre as formas pwt e K22A/H26N/H33N o que se detectou é que a primeira possui tanto um menor conteúdo de alfa-hélice quanto um maior distanciamento do triptofano do ferro hemínico. Tal evento favorece interpretação de que o resíduo de lisina 22 deve também influir na forma de enovelamento proteico durante a biogênese do citocromo *c*, já que sua substituição por alanina neste mutante específico aumenta o conteúdo de alfa-hélice mesmo na ausência dos resíduos de histidina 26 e 33. Os experimentos para avaliação funcional revelaram que a ausência do resíduo de lisina 22, importante para a interação do citocromo *c* à membrana mitocondrial como participante do sítio L, não afetou a capacidade da proteína em doar e receber elétrons. Quando submetidos à ação do DPAA como agente redutor, tanto o mutante K22A/H26N/H33N quanto o pwt sofreram redução completa, caracterizada pelo desvio da banda Soret de 409 para 412 nm e divisão da banda em 550 nm. Completado este evento, a adição do *t*-BuOOH como agente oxidante promoveu a transferência do elétron anteriormente recebido e a consequente reoxidação da proteína, observada pelo retorno da banda Soret para 409 e a característica reorganização como banda única em 550 nm. Resultados de trabalhos anteriores demonstraram que a forma pwt tem a capacidade de restaurar a respiração em mitoplastos depletados de citocromo, o que face aos resultados obtidos acredita-se seja extensivo também à forma com mutação adicional na lisina 22 (Kawai, 2009). Já os eventos relacionados à lipoperoxidação induzida por citocromo *c* trouxeram resultados que revelam que a interação da forma mutante K22A/H26N/H33N com o sistema-modelo de membrana oferecido pelos lipossomos PC/PE/CL se encontra comprometida. A quantidade de MDA gerado por ação deste mutante sobre os lipossomos foi significativamente menor do que para a forma nativa. O mesmo ocorreu com o mutante pwt, indicando que não

somente o resíduo de lisina 22, componente do sítio L, como também os resíduos de histidina 26 e 33, envolvidos também na interação proteína/membrana, afetam a geração de radicais livres e conseqüentemente o dano oxidativo e, diferentemente do citocromo *c* nativo, de forma pH independente. Tais resultados indicam um menor grau de interação entre estas formas mutantes e os lipídios componentes de membrana. As alterações estruturais e funcionais relatadas, entretanto, demonstraram não ser suficientes para impedir a capacidade apoptótica *in vitro* tanto da forma K22A/H26N/H33N quanto da pwt, já que a ativação da cadeia de caspases não foi comprometida. Ambas as formas promoveram a clivagem do substrato fluorogênico da mesma forma que o citocromo *c* nativo, indicando ativação de caspase 3, essencial para o desenvolvimento do processo apoptótico *in vivo*.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem inferir que o resíduo de lisina 22 é importante na interação do citocromo *c* com membranas biológicas, porém não exclusivo, como já se sabia anteriormente. Sua ausência, associada a dos resíduos de histidina 26 e 33, afeta a capacidade oxidativa da proteína, bem como sua estrutura tridimensional, porém não afeta sua capacidade no desencadeamento da apoptose e no transporte de elétrons pela cadeia respiratória. Testes posteriores serão realizados para avaliação da capacidade de restauração da respiração em mitoplastos depletados de citocromo *c*, empregando mitocôndrias isoladas de fígados de rato, bem como da capacidade apoptótica via microinjeção das formas mutantes em células normais e tumorais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KAWAI, C.; PESSOTO, F.S.; RODRIGUES, T.; MUGNOL, K.C.U.; TÓRTORA, V.; CASTRO, L.; MILICCHIO, V.A.; TERSARIOL, I.L.; Di MASCIO, P.; RADÍ, R.; CARMONA-RIBEIRO, A.M.; NANTES, I.L. pH-sensitive binding of cytochrome *c* to the inner mitochondrial membrane. Implications for the participation of the protein in cell respiration and apoptosis. **Biochemistry**, 48(35), p.8335-42, 2009.

KAWAI, C.; PRADO, F.M.; NUNES, G.L.; 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**, 280, 41, p. 34709-34717. 2005.

KINNUNEN, P.K.J.; TUOMINEN, E.K.J.; WALLACE, C.J.A. Phospholipid cytochrome interaction. **The Journal of Biological Chemistry**, 277, p. 8822-8826. 2002.

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**, 41, p.3894-3901. 2002,

RYTÖMMA, M.; KINNUNEN, P.K.J. Evidence for two distinct acidic phospholipid-binding sites in cytochrome *c*. **The Journal of Biological Chemistry**, 269, p. 1770-1774. 1994.