

MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA PARA OBTENÇÃO DA FORMA MUTANTE DE CITOCROMO *c* K79A

Jaqueline da Silva Bento ¹; Débora Martins de Andrade Caselli ²;
Katia Cristina Ugolini Mugnol ³

Estudante do curso de Farmácia; email: jaqueline.s.bento@gmail.com¹

Estudante do curso de mestrado no programa de pós-graduação em Biotecnologia,
email: dm.andrade@outlook.com²

Professora e Pesquisadora da Universidade de Mogi das Cruzes; email: katiac@umc.br³

Área do Conhecimento: Bioquímica.

Palavras-chave: citocromo *c*, mutagênese sítio-dirigida, proteínas recombinantes.

INTRODUÇÃO

O citocromo *c* é uma hemoproteína com massa molecular de aproximadamente 12 kDa, tendo em média 103 resíduos de aminoácidos, sendo encontrada associada à face externa da membrana interna da mitocôndria. Manipulações na sua sequência de aminoácidos são úteis para desvendar os mecanismos pelos quais esta proteína atua como carreadora de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, como se associa à membrana mitocondrial e como acontece seu *release* e a consequente ativação de enzimas do tipo caspases que culmina na morte celular por apoptose.

Para estas manipulações na sequência de aminoácidos utilizam-se técnicas de mutagênese sítio-dirigida por oligonucleotídeos que permitem alterar nucleotídeos no gene responsável pela expressão da proteína e assim substituir aminoácidos específicos no produto final e assim estudar o comportamento da proteína frente a esta nova condição.

Em estudos com citocromo *c* modificado existe um plasmídeo modelo desenhado por Rumbley *et al.* e Kellogg e Bren ditado PJRhN2 que contém genes para expressão de citocromo *c* de coração de cavalo e também da heme-liase, uma enzima essencial para o acoplamento do grupo heme à cadeia proteica (RUMBLEY, 2002; KELLOGG, 2002). Este plasmídeo contém originalmente mutação nos resíduos de histidina 26 e 33 visando aumentar a produtividade durante sua expressão em cepas bacterianas, resultando em uma forma de citocromo *c* denominada pseudo-wilde-type (wt). Esta substituição está associada ao fato de que estes resíduos são limitantes no *folding* da proteína durante sua biogênese em bactérias, o que torna o rendimento da expressão muito abaixo do desejado. Com sua substituição por resíduos de asparagina, os trabalhos que empregaram este plasmídeo demonstraram uma alta produção de proteína nas bactérias por elas transformadas, de modo que tornou-se um bom sistema para produção de citocromo *c* modificado.

O que se percebeu, entretanto, é que a ausência dos resíduos de histidina 26 e 33, promove alterações estruturais que afetam o comportamento da proteína, por exemplo, frente a sistemas-modelo de membrana, como micelas de SDS. Na tentativa de comprovar que micelas de SDS convertem a forma baixo-spin do citocromo *c* nativo a uma forma menos rômica, dita forma baixo spin alternativo (MUGNOL, 2008), por substituição do sexto ligante do ferro hemínico desta proteína, a metionina 80, por um ligante de campo fraco, a lisina 79, trabalhos anteriores produziram forma mutante de citocromo *c* com substituição adicional neste resíduo, produzindo uma forma

H26N/H33N/K79A. Esta, entretanto, não respondeu aos objetivos propostos justamente pelas alterações estruturais decorrentes da ausência das histidinas 26 e 33. Portanto, fez-se adequado propor a produção de uma forma modificada de citocromo *c* em que somente a lisina 79 se encontrasse substituída, o que se tornou o objetivo deste trabalho.

OBJETIVOS

Obtenção de forma mutante de citocromo *c* K79A a partir de processo de mutagênese sítio-dirigida tendo como molde o plasmídio PJRhN2 H26N/H33N/K79A.

METODOLOGIA

Como controle e para análise comparativa, foram realizadas expressão e purificação das formas H26N/H33N (pwt) e H26N/H33N/K79A. Para isto os plasmídios respectivos foram inseridos por choque térmico em cepas de *Escherichia coli* BL21 Star, posteriormente cultivadas em LB Ágar contendo ampicilina como forma de seleção de colônias contendo o plasmídio de interesse, já que o mesmo contém gene que confere resistência a este antibiótico para as bactérias que o incorporaram. Colônias transformadas foram transferidas para meio LB Broth também com ampicilina, submetidas a um pré-cultivo overnight e depois transferidas para meio Terrific com o mesmo antibiótico como ambiente para expressão. A indução deste evento foi feito por adição de IPTG e o cultivo mantido por 58 horas a 30°C e sob agitação a 220 rpm. O produto da expressão foi purificado em uma sequência de centrifugações, lise das células em sonicador, precipitação de proteínas por sulfato de amônio, ciclos de diálise e por fim cromatografia de troca iônica com retenção de citocromo *c* e posterior eluição com gradiente de NaCl (RUMBLEY, 2002).

Para obtenção da forma mutante K79A a partir do plasmídio H26N/H33N/K79A foram desenhados oligonucleotídeos que, durante reação de PCR, permitissem alterações na sequência de nucleotídeos na região codificadora das histidinas 26 e 33, visando assim obter uma sequência adequada à expressão do citocromo *c* com histidinas nestas posições em substituição às asparaginas presentes no molde. Para o processo de mutagênese empregou-se o kit Quikchange II Site-Directed Mutagenesis da Stratagene e as orientações fornecidas pelo fabricante.

Após o processo de mutagênese o DNA obtido foi inserido em *Escherichia coli* BL21 Star por choque térmico, efetuado cultivo em LB ágar com ampicilina, sendo as colônias selecionadas submetidas a pré-cultivo em LB Broth, também com ampicilina, seguido de isolamento do DNA plasmidial pelo método de lise alcalina, eletroforese do produto deste em gel de agarose e posteriormente ao sequenciamento pelo método de Sanger para constatar se as substituições desejadas ocorreram de fato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão das formas pwt e H26N/H33N/K79A ocorreu a contento, tendo-se obtido um rendimento médio de 4 e 10 mg de proteína respectivamente. Este produto final foi submetido a análise espectroscópica no UV-vis o que indicou que as mutações de fato não promovem alterações significativas no que concerne ao grupo heme e suas coordenações com a histidina 18 e a metionina 80 nas quinta e sexta posições respectivamente. Já o dicroísmo circular no far-UV mostra diminuição no conteúdo de alfa-hélice destes mutantes em comparação com a forma nativa da proteína, enquanto que por espectroscopia de fluorescência é possível notar afastamento do resíduo de tirosina do grupo heme dado que nos mutantes estudados ocorre diminuição do efeito supressor de fluorescência por este aminoácido.

O processo de mutagênese para obtenção da forma K79A resultou em um plasmídio que quando inserido com sucesso em bactérias forneceu a estas resistência à ampicilina e permitiu a expressão de citocromo *c* porém com um rendimento muito aquém daquele percebido para as formas pwt e triplo mutante. Este fato já era esperado justamente pelo fato de que a devolução dos resíduos de histidina 26 e 33 faria com que eles passassem naturalmente a agir como limitantes do enovelamento proteico durante a produção *in vitro*. Entretanto, face a este rendimento muito baixo, não se conseguiu obter uma forma pura de citocromo *c* em quantidade suficiente para todas as análises espectroscópicas desejadas visando sua caracterização e o estudo de seu comportamento face às micelas de SDS e outros ambientes que mimetizem a membrana mitocondrial interna.

CONCLUSÕES

O desenvolvimento do projeto permitiu concluir que a presença dos resíduos de histidina 26 e 33 realmente atuam como limitantes à expressão da proteína em laboratório. Por outro lado, quando substituídos por asparagina aumentam consideravelmente a expressão, porém resultam em proteínas com alterações estruturais que, dependendo do estudo em questão, podem prejudicar os resultados ou mesmo levar a interpretações errôneas de fenômenos biológicos que se deseja simular.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

KELLOGG, J.A.; BREN, K.L. Characterization of recombinant horse cytochrome *c* synthesized with the assistance of *Escherichia coli* cytochrome *c* maturation factors. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1601, p. 215– 221, 2002.

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**, New York v. 94, p. 1–12, 2008.

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**, Philadelphia, v.41, n.47, p.13894-13901, 2002.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos ao CNPq pela bolsa de estudos que me foi fornecida, à Profa Dra. Regina Lucia de Oliveira, por ceder à infraestrutura do NIB, à Profa. Dra. Katia Cristina Ugolini Mugnol pela paciência, confiança, dedicação e pela orientação desse projeto, ao Prof. Dr. Wagner Alves de Souza Júdice por contribuir com seu conhecimento, ao Prof. Dr. Rafael Radi por contribuir com a doação dos plasmídios e a todos do CIIB pelo companheirismo.