

Formas Mutantes de Citocromo *c* como Ativadores de Caspase-3

Ingrid Mito de Paula¹, Aline de Barros Tirelli¹, Jéssica Aparecida da Silva Pereira¹, Verónica Tórtora², Katia Cristina Ugolini Mugno¹

¹Universidade de Mogi das Cruzes – Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica
CEP 08780-911 Mogi das Cruzes – SP - E-mail: katiac@umc.br

²Universidad de La Republica – Laboratorio de Bioquímica e Biología Molecular
Montevideo – Uruguai

RESUMO

*A ativação de cadeia de caspases e a consequente morte celular por apoptose é uma das atribuições do citocromo *c*, proteína importante também no transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. Neste trabalho apresentamos formas mutantes em resíduos de aminoácidos específicos envolvidos na interação desta proteína com a membrana mitocondrial interna, as lisinas 22, 25 e 27 e as histidinas 26 e 33. Resultados obtidos por dicróismo circular na região do far-UV demonstraram alterações importantes no conteúdo de alfa-hélice de todas estas formas modificadas em relação à forma nativa sem, entretanto, comprometer sua capacidade de ativar caspases.*

Palavras-chave: citocromo, citocromo *c*, mutação sítio-dirigida, dicróismo circular e caspase-3.

INTRODUÇÃO

O citocromo *c* é uma hemoproteína periférica, que apresenta uma cadeia polipeptídica ligada covalentemente a um grupo heme. Tem massa molecular de aproximadamente 12 kDa, em média de 103 a 105 aminoácidos e um alto teor de lisinas. Localiza-se na face externa da membrana interna da mitocôndria e sua ligação com esta envolve interações eletrostáticas via sítio A e interações hidrofóbicas via sítio C^{1,2}. Oposto ao sítio A encontra-se o sítio L, o qual envolve os resíduos de lisina 22, 25 e 27 e as histidinas 26 e 33³. As funções do citocromo *c* englobam sua participação como transportador de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial e agente promotor de apoptose por mecanismo intrínseco que envolve seu *release* desta organela e consequente atuação citoplasmática como ativador da cadeia de caspases. Sendo as funções desta proteína diretamente relacionadas à sua estrutura, ao estado redox do ferro hemínico e às suas relações com a membrana mitocondrial, utilizar formas com mutação específica em diferentes resíduos de aminoácidos permite relacioná-los com cada uma de suas propriedades biológicas e trabalhar na modulação de suas aplicações biotecnológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Formas modificadas de citocromo *c* de coração de cavalo foram obtidas por expressão em cepas de *Escherichia coli* BL21 Star do plasmídeo PJRhrsN2 previamente submetido a



mutagênese sítio-dirigida guiada por oligonucleotídeos que permitiram a substituição pontual de aminoácidos de interesse^{4,5,6}. Os produtos de expressão foram purificados por ciclos de centrifugação, precipitação de proteínas por sulfato de amônio, diálises e cromatografia de troca iônica. Foram obtidas as formas duplo mutante H26N/H33N (dita pseudo-wild-type ou pwt) e triplos mutantes K22A/H26N/H33N (tmK22A), K25N/H26N/H33N (tmK25A) e H26N/K27A/H33N (tmK27A). Todas elas foram submetidas a análise de conteúdo de alfa-hélice e comportamento de *unfolding* térmico (variação de temperatura entre 20 e 100°C) utilizando a técnica de dicroísmo circular (CD) na região do far-UV (190 a 260 nm) em espectropolarímetro JASCO J-815 com controle de temperatura via sistema peltier. Foi acompanhado o perfil da banda em 222 nm para determinação dos parâmetros estruturais pesquisados^{7,8,9}.

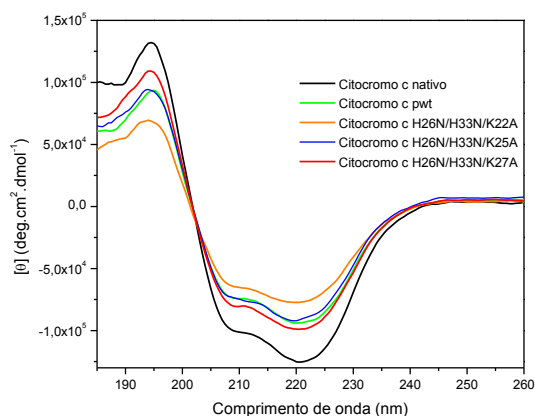
A capacidade em ativar caspases foi analisada utilizando-se extrato citosólico obtido por lise térmica de células de músculo liso de aorta de coelho (MLAC) cultivadas em DMEN (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com soro fetal bovino. O monitoramento da ativação de caspase por cada uma das formas mutantes foi realizado através de ensaio fluorimétrico em espectrofluorímetro HITACHI-2500 utilizando kit comercial EnzCheck Caspase-3 da Molecular Probes (USA) contendo como sinalizador o peptídeo Z-DEVD-AMC. A ativação de caspase-3 é sinalizada pela clivagem deste e consequente fluorescência da forma AMC livre em 442 nm quando o sistema é excitado em 342 nm. A intensidade de fluorescência foi convertida em concentração a partir de curva padrão construída com leituras de amostras com diferentes concentrações de AMC livre.

As análises com as formas mutantes foram realizadas em comparação com a forma nativa da proteína e os dados obtidos analisados através do software Origin 6.0 e 8.0, tanto no que concerne à confecção dos gráficos quanto às análises estatísticas deles decorrentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por dicroísmo circular permitiu evidenciar que as formas mutantes expressas apresentam modificações quantitativas no conteúdo de alfa-hélice em relação à forma nativa de citocromo *c*. Conforme apresentado na Figura 1, todas as formas mutantes (pwt, tmK22A, tmK25A e tmK27A) apresentam menor conteúdo de alfa-hélice do que a forma nativa o que pode ser justificado em princípio pela substituição em todas elas dos resíduos de histidina 26 e 33, aminoácidos importantes no processo de biogênese e *fold*ing do citocromo *c*. A substituição adicional dos resíduos de lisina 22 e 27 também influenciou no enovelamento proteico, o que é percebido pelo menor conteúdo de alfa-hélice das formas tmK22A e tmK27A em relação à forma pwt. Já a modificação adicional do resíduo de lisina 25 não promoveu alterações significativas em relação a este duplo mutante. As mutações realizadas influenciaram também na temperatura média de *unfolding* (T_m) e no perfil deste processo. Todas elas apresentaram menor T_m do que a forma nativa com início mais precoce do processo de desenovelamento induzido por temperatura (não mostrado).

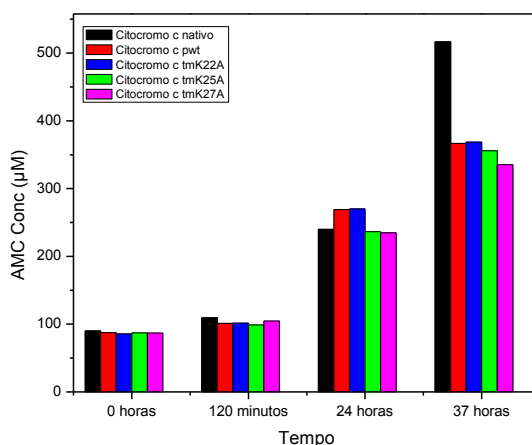
Figura 1. Espectro de dicroísmo circular das formas mutantes e nativa de citocromo *c*. Citocromos *c* nativo (linha preta), pwt (linha verde), tmK22A (linha laranja), tmK25A (linha azul) e tmK27A (linha vermelha). Amostras a 10 μM em água deionizada. Leituras em cubeta de cristal de quartzo l = 0,1 cm, fluxo contínuo de nitrogênio, 8 acumulações.



Conteúdo de alfa-hélice		
Citocromo c	% de alfa-hélice	Diferença de alfa-hélice
Nativo	100%	0
pwt	74,55%	-25,45%
tmK22A	61,26%	-38,74%
tmK25A	71,78%	-28,22%
tmK27A	78,98%	-21,02%

O teste de ativação de caspases demonstrou clivagem progressiva do peptídeo Z-DEVD-AMC e consequente liberação da fração fluorescente AMC indicando que todas as formas mutantes foram capazes de ativar caspase-3 no extrato citosólico. Conforme demonstrado na Figura 2, construída a partir de leituras nos tempos 0, 120 minutos, 24 e 37 horas de incubação, não há diferença significativa entre os diferentes mutantes, porém em relação à forma nativa da proteína, que teve conversão de 100% de AMC para a forma livre, o processo não foi completo para nenhuma delas, indicando menor potencial de ativação de caspase-3 a longo prazo.

Figura 2. Teste de ativação de caspase-3. Barras representam a concentração de AMC livre obtida para cada uma das formas mutantes nos tempo 0, 120 minutos, 24 e 37 horas. Sendo apresentado na barra de cor preta a forma nativa, vermelha o pwt, em azul tmK22A, verde tmK25A e rosa tmK27A.



CONCLUSÕES

A substituição dos resíduos de histidina 26 e 33 afetam a estrutura tridimensional do citocromo c, a qual sofre também influência direta das lisinas 22 e 27. Já a lisina 25 não demonstra ter um papel diferenciado no processo de enovelamento desta proteína durante sua biogênese, uma vez que sua substituição não influenciou na estrutura secundária da forma pwt. Todos os

mutantes testados, entretanto, apresentaram a capacidade de ativar a cadeia de caspases preservando assim seu potencial apoptótico apesar das diferenças estruturais observadas.

REFERÊNCIAS

-
- (1) Rytömaa, M., Mustonen, P. And Kinunnen, P. K. J. (1992), J. Biol. Chem. 267, p.22243-22248.
 - (2) Tuominen, E. K., Wallace, C. J. And Kinunnen, P. K. J. (2002), J. Biol. Chem. 277, p.8822-8826.
 - (3) 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. J. Biol. Chem., v. 280,nº41,p.34709-34717, 2005.
 - (4) Caffrey, M.S. Strategies for the study of cytochrome c structure and function by site-directed mutagenesis. Biochimie, v.76, pp.622-623, 1994.
 - (5) Patel, C.N., Lind, M.C., Pjelak, G.J. Characterization of horse cytochrome expressed in *Escherichia coli*. Protein Expresión Purif. v.22, pp.220-224, 2001.
 - (6) Rumbley, J.N., Hoand, L., Englander, S.W. Recombinant equyne cytochrome c in *Escherichia coli*: high-level expression, characterization, and folding and assembly mutants. Biochemistry, v.41, pp.3894-3901, 2002.
 - (7) Kelly, SM; Price, NC. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. Biochimica et Biophysica Acta, v.1338, pg 161-185, 1997
 - (8) Myer, YP. Far ultraviolet circular dichroism spectra of cytochrome c. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure, v. 154(1), 84-90, 1968.
 - (9) Kelly, S.M., Jess T.J., Price N.C. How to study proteins by circular dichroism. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics, v. 1751(2), 119-139, 2005.