

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

CINTIA KAWAI

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM
NOVO SÍTIO DE INTERAÇÃO DE CITOCROMO *c*
COM FOSFOLIPÍDIOS PRESENTES NA MEMBRANA
INTERNA MITOCONDRIAL**

MOGI DAS CRUZES

2007

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

CINTIA KAWAI

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO
SÍTIO DE INTERAÇÃO DE CITOCROMO *c* COM
FOSFOLIPÍDIOS PRESENTES NA MEMBRANA INTERNA
MITOCONDRIAL**

Tese apresentada ao curso de
Doutorado em Biotecnologia da
Universidade de Mogi das Cruzes
como parte dos requisitos para a
conclusão do curso.

Área de Concentração: Biológica

Orientadora: Dra. Iseli Lourenço Nantes

MOGI DAS CRUZES

2007

Agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa (FAEP).

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Kawai, Cíntia

Identificação e caracterização de um novo sítio de interação de citocromo *c* com fosfolipídios presentes na membrana interna mitocondrial / Cíntia Kawai. -- 2007.

186 f.

Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) -
Universidade de Mogi das Cruzes, 2007

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Profa. Dra. Iseli Lourenço Nantes

1. Citocromo *c* 2. Fusão de vesícula 3. Membrana interna mitocondrial 4. Sítio L I. Título II. Nantes, Iseli Lourenço

CDD 572.6

ATAS

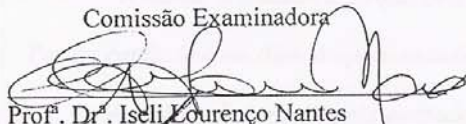
ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

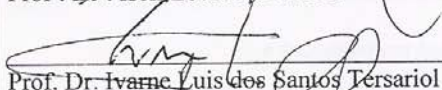
Às treze horas do dia vinte e quatro de outubro de dois mil e sete, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa da tese "IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO SÍTIO DE INTERAÇÃO DE CITOCROMO c COM FOSFOLÍPIDIOS PRESENTES NA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL" para obtenção do grau de Doutor pelo(a) candidato(a) **Cíntia Kawai**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 80 (oitenta), a saber: 44 unidades de crédito em disciplinas e atividades na pós-graduação e 36 unidades de crédito no preparo da Tese, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Doutor. A Comissão Examinadora foi constituída pelos Senhores Professores Doutores Iseli Lourenço Nantes, Ivarne Luis dos Santos Tersariol e Luiz Roberto Nunes da Universidade de Mogi das Cruzes, Anibal Eugenio Vercesi da Universidade Estadual de Campinas e Sayuri Miyamoto da Universidade de São Paulo, sob a presidência da primeira, como orientadora da aluna. A Sessão Pública da defesa da Tese foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou a candidata. Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral de seu trabalho, ao final da qual seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir, a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

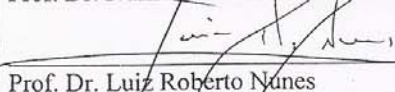
Aprovado por unanimidade.
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

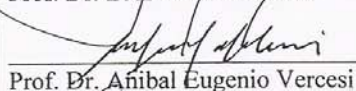
Mogi das Cruzes, 24 de outubro de 2007

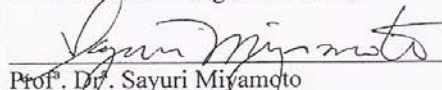
Comissão Examinadora


Prof. Dr. Iseli Lourenço Nantes


Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol


Prof. Dr. Luiz Roberto Nunes


Prof. Dr. Anibal Eugenio Vercesi


Prof. Dr. Sayuri Miyamoto

Julgamento

Aprovada
(aprovado(a)/reprovado(a))

Aprovada
(aprovado(a)/reprovado(a))

Aprovada
(aprovado(a)/reprovado(a))

APROVADA
(aprovado(a)/reprovado(a))

APROVADA
(aprovado(a)/reprovado(a))

DEDICATÓRIAS

*Aos meus dedicados pais, Toyoko e Ysamu,
Por serem meus primeiros e eternos professores da vida,
Que confiaram em mim,
E por me darem tudo o que precisei para alcançar meus objetivos.*

*Aos meus queridos irmãos, Sonia, Edson e Hélio,
Pela compreensão, carinho e amizade em todos os momentos.*

*À minha orientadora, Profa. Dra. Iseli Lourenço Nantes,
Por ter confiado e me dado à oportunidade de entrar no mundo da ciência.
Agradeço de coração pela amizade, sinceridade, paciência,
e incentivo em todo momento.*

AGRADECIMENTOS

Aos professores Paolo Di Mascio, Ana Maria Carmona-Ribeiro, Maurício Baptista e Tiago Rodrigues pelo carinho e colaboração.

Aos professores Ivarne L. S. Tersariol, Luiz R. Nunes, Aníbal E. Verseci e Sayuri Miyamoto pelas críticas construtivas que melhoraram este trabalho.

Aos demais pesquisadores do CIIB, Prof. Antônio C. F. Caíres, Prof. Flávio A. Rodrigues, Prof. Paulo C. Almeida, Prof. Sérgio Brochsztain e Prof. Cláudio Shida pela amizade e apoio.

Às minhas amigas desde graduação Daniela M. Fausto e Cristianne K. Matsumoto pelo carinho, amizade e ajuda a todo o momento.

Aos amigos Karla M. Figueredo, Kátia C. Ugolini Mugnol, Felipe Pessoto, Vitor Millichio, Francisco L. de Sousa, Fábio H. Dyszy, Tatiana Prieto, Tatiana A. Rinaldi, Simone Dreher, Priscila A. de Faria, Carolina G. dos Santos, Juliana Conrado, Débora, Luci A. Crivellaro, Karina, Rodrigo de O. Marco e Taíz Soares pela amizade, compreensão e conselhos que me ajudaram na vida e no trabalho.

As amizades carinhosas de Ivana Barros, Elisa C. Batista, Vinícius, Eduardo O. Carvalho, Maíra Kobayashi, Frascielle, Rafael, Hamilton, Ângela, Guilherme, Tiago, Rodrigo Cunha, Ana Paula B. Araújo, Ana Carolina C. Redondo, Antônio A. Mattos, Gabriel L. Nunes, Fernanda M. Prado, Izaura Iotoma, Cláudia C. A. Rizzi, Renata Mesquita, Prof. Dr. Ronaldo C. Araújo, João Daividson e demais alunos e pesquisadores que contribuíram e incentivaram neste período.

Ao Carlos pelo apoio, amor e carinho que me incentivou a todo o momento.

Ao grupo de pesquisa da Universidade de Helsinki, Prof. Dr. Paavo K. J. Kinnunen, Yegor Domanov, Karen Sabatini, Pavol Vitovic, Rohit e Cristina pela amizade e colaboração.

À Universidade de Mogi das Cruzes (UMC), Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa (FAEP).

A todos que não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram e ajudaram na elaboração deste trabalho.

RESUMO

A associação de citocromo *c* com bicamadas lipídicas é um fenômeno importante em eventos biológicos, tais como respiração celular e apoptose. A interação de cit *c* com vesículas de PCPECL (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e cardiolipina) que mimetizam a membrana mitocondrial foi investigada na faixa de pH 7,4 – 6,2 por medidas de espectroscopia UV-visível, espalhamento de luz, fluorescência, entre outras. Na presença de cit *c*, o decréscimo de pH induziu um aumento na turbidez e no diâmetro das vesículas, resultado da fusão de vesículas que foi determinada pelo rápido decréscimo na razão excímero/monômero de 2-(10-(1-pyrene)decanoyl)phosphatidylcholine (PPDPC). Ao contrário do citocromo *c* nativo, citocromo *c* *N*-acetilado e protamina, proteínas carregadas positivamente, aumentaram a turbidez de vesículas de modo independente de pH, enquanto que albumina não afetou a turbidez de vesículas PCPECL. As cinéticas dependentes de pH revelaram uma função de grupos ionizáveis com pK_a por volta de 7,0 para cit *c*. Citocromo *c*, tratado com um excesso molar 3 vezes de dietilpirocarbonato, não foi capaz de induzir fusão de vesículas, embora sua associação com as vesículas não tenha sido afetada. As análises de MALDI-ToF revelaram a carboxilação nos resíduos Lys87, Lys22 e Lys27 de cit *c*. De fato, estes resíduos de lisina formam um agregado de aminoácidos carregado positivamente na estrutura de cit *c*, que abaixa o valor de pK_a . Assim, em baixo pH, a protonação de resíduos altamente conservados Lys22 e invariante Lys27 produz uma segunda região carregada positivamente no lado oposto à região das Lys72 e Lys73 na estrutura de citocromo *c*. Estes dois sítios em lados opostos permitem que duas vesículas sejam trazidas para junto da mesma molécula de cit *c* para que promova a fusão. Um novo sítio dependente de pH para a associação de cit *c* com membranas mitocondriais foi estabelecido neste estudo, denominado como sítio L. O papel biológico deste novo sítio foi estudado comparando-se a capacidade de cit *c* de cavalo e atum de restaurar a respiração em mitoplastos. A capacidade de citocromo *c* (cavalo e atum) de restaurar a respiração de mitoplastos depletados de citocromo *c* em diferentes valores de pH foi correlacionada com a disponibilidade do sítio L de citocromo *c*. Ambos citocromos *c* de atum e cavalo exibiram dois tipos de ligação com a membrana interna mitocondrial, que contribuíram para o processo de transferência de elétrons: uma independente de pH exibindo uma alta afinidade e baixa eficiência (constante macroscópica de dissociação, $K_{sapp} \sim 10$ nM) e outra dependente de pH com uma afinidade relativamente baixa e alta eficiência. Para citocromo *c* de cavalo o valor de pK_a para a interação dependente de pH foi $\sim 6,7$. Para citocromo *c* de atum (Lys22 e His33 substituídas por Asn22 e Trp33), o efeito de pH no valor de K_{sapp} foi menos drástica em relação a hemoproteína de cavalo. Os valores de K_{sapp} foram idênticos para citocromo *c* de cavalo em pH 7,2 e atum pH 6,2 (111nM) sugerindo que a protonação da Lys22 e His33 poderia ser uma etapa limitante que determina a participação desta hemoproteína na cadeia respiratória ou na apoptose.

PALAVRAS-CHAVES: citocromo *c*; fusão de vesícula; sítio L; membrana interna mitocondrial

ABSTRACT

The association of cytochrome *c* (cyt *c*) with lipid bilayers influences important biological events such as cell respiration and apoptosis. The interaction of cyt *c* with mitochondrial membrane mimetic vesicles of PCPECL (phosphocholine, phosphoethanolamine and cardiolipin) was investigated over the 7.4 - 6.2 pH range by means of turbidimetry and photon correlation spectroscopy, fluorescence and others techniques. In the presence of cyt *c*, pH decreases induced an increase in vesicle turbidity and mean diameter resulting from vesicle fusion determined by a rapid decrease in the excimer/monomer ratio of 2-(10-(1-pyrene)decanoyl)phosphatidylcholine (PPDPC). In contrast with native cyt *c*, *N*-acetylated cyt *c* and protamine, a positively charged protein, increased vesicle turbidity in a pH-independent manner, whereas albumin did not affect PCPECL vesicle turbidity. The pH-dependent turbidity kinetics revealed a role for cyt *c* ionizable groups with pK_a around 7.0. Cyt *c* treated with 3-fold molar excess of diethylpirocarbonate failed to induce vesicle fusion, although cyt *c* association to vesicles remained unaffected. MALDI-ToF analysis revealed carbethoxylation of Lys87, Lys22 and Lys27 cyt *c* residues. In fact, these lysine residues belong to clusters of positively charged amino acids in the cyt *c* structure, which lower the pK_a value. Thus, at low pH, protonation of the highly conserved Lys22 and the invariant Lys27 residues produced a second positively charged region opposite the Lys72 and Lys73 regions in the cyt *c* structure. These two opposing sites allowed two vesicles to be brought together by the same cyt *c* molecule for fusion. A novel pH-dependent site associating cyt *c* to mitochondrial membranes was established in this study, denominated as site L. The biological role of this new site was studied comparing the ability of horse and tuna cyt *c* to restore the respiration on isolated mitoplasts. Both horse and tuna cytochromes *c* exhibited two types of binding to inner mitochondrial membranes that contributed to respiration: a high affinity and low efficiency pH-independent binding (macroscopic dissociation constant, $K_{sapp} \sim 10$ nM) and a low affinity and high efficiency pH-dependent binding that for horse cytochrome *c* exhibited $pK_a \sim 6.7$. For tuna cytochrome *c* (Lys22 and His33 replaced by Asn22 and Trp33), the pH effect on the K_{sapp} was less striking than for the horse hemeprotein. Both tuna and horse cytochrome *c* exhibited identical K_{sapp} (111 nM) at pH 7.2 and 6.2, respectively, suggesting the protonation of Lys22 and His33 as a limiting step to determine the participation of mammal cytochromes *c* in respiratory chain and apoptosis.

KEYWORDS: cytochrome *c*; vesicle fusion; site L; inner mitochondrial membrane

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Estrutura do grupo heme.....	20
Figura 2.	Estrutura de heme <i>a</i> , <i>b</i> e <i>c</i>	22
Figura 3.	Espectro de absorbância luz visível de citocromo <i>c</i> de coração de cavalo nos estados de oxidação Fe ³⁺ e Fe ²⁺	23
Figura 4.	Microscopia eletrônica de varredura de mitocôndria de pâncreas de rato.....	25
Figura 5.	Estrutura dos glicerofosfolipídios: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, cardiolipina e fosfatidilinositol.	28
Figura 6.	Componentes da cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa e seus inibidores.	30
Figura 7.	Representação da estrutura tridimensional de citocromo <i>c</i> (cavalo) em solução aquosa (A) e coordenação do átomo de ferro do grupo heme com a metionina e histidina da cadeia polipeptídica de citocromo <i>c</i> (B).....	31
Figura 8.	Reação de carboxilação da cadeia lateral de histidina (A) e lisina (B) pelo DEPC.....	35
Figura 9.	Componentes da cadeia transportadora de elétrons.....	39
Figura 10.	Vias gerais do início da cascata apoptótica por ativação de caspases.....	41
Figura 11.	Posicionamento dos sítios A (Lys 72 e 73) e C (Asn 52) na estrutura de citocromo <i>c</i> (cavalo) tridimensional (A); Interação de citocromo <i>c</i> com fosfolipídios via sítio A e C e, ancoramento da proteína via interação lipídio estendida (B).....	47
Figura 12.	Espectro de fluorescência e estrutura química de PPDPC (1-palmitoyl-2-[10-(pyren-1-yl)decanoyl]- <i>sn</i> -glycerol-3-phosphocholine).....	50
Figura 13.	Estrutura geral de ceramida e esfingomiélna.....	52
Figura 14.	Diagrama esquemático do funcionamento da interface de um espectrômetro de SPR.	79
Figura 15.	Esquema demonstrando a lavagem da superfície contendo a monocamada lipídica para remoção de citocromo <i>c</i> através da alta força iônica.....	80
Figura 16.	Efeito do pH na fusão de lipossomos PCPECL na presença de citocromo <i>c</i> Fe ³⁺ monitorado pelo espectrofotômetro UV-vis.....	82

Figura 17.	Efeito do pH na fusão de lipossomos PCPECL e PCPEPG na presença e ausência de citocromo <i>c</i> , monitorado pelo espectrofotômetro UV-vis.....	83
Figura 18.	Espetros de emissão de fluorescência de lipossomos PCPPDPCPECL associados a citocromo <i>c</i>	85
Figura 19.	Capacidade de citocromo <i>c</i> , protamina e albumina de induzir fusão de vesículas de PCPECL.....	87
Figura 20.	Efeito do pH na fusão de lipossomos PCPECL na presença de citocromo <i>c</i> reduzido (Fe ²⁺) e Zn-substituído monitorado pelo espectrofotômetro UV-vis.....	88
Figura 21.	Representação da estrutura tridimensional de citocromo <i>c</i> (cavalo) em solução aquosa.....	89
Figura 22.	Espetros de massa (MALDI-ToF) de citocromo <i>c</i> nativo e após tratamento com DEPC.....	91
Figura 23.	Efeito de citocromo <i>c</i> modificado pelo DEPC na indução de fusão de lipossomos PCPECL.....	90
Figura 24.	Efeito da carboxilação e <i>N</i> -acetilação na capacidade de cit <i>c</i> de induzir fusão de vesículas de PCPECL.....	93
Figura 25.	Efeito da razão DEPC/cit <i>c</i> no número de aminoácidos carboxilados.....	96
Figura 26.	Efeito da razão DEPC/cit <i>c</i> na ligação de lipossomos PCPECL e na porcentagem correspondente de inibição de fusão de vesículas detectada após a adição de cit <i>c</i> nativo ou carboxilado.....	97
Figura 27.	(A) Efeito da carboxilação de cit <i>c</i> na promoção de turbidez do meio contendo vesículas de PCPECL. (B) Análise de Maldi-Tof de cit <i>c</i> carboxilado.....	99
Figura 28.	Estrutura de cit <i>c</i> oxidado de coração de cavalo em meio aquoso.....	102
Figura 29.	Aumento de turbidez na presença de vesículas de PCPECL contendo DPPE (linha sólida grossa) e PE biológica (linha sólida fina) em pH 6,2 na presença de cit <i>c</i>	103
Figura 30.	Efeito da razão DEPC/ citocromo <i>c</i> no número de aminoácidos carboxilados na estrutura de citocromo <i>c</i> na faixa de pH 5,5 a 11,5....	105
Figura 31.	Efeito de pH de tratamento no número de aminoácidos modificados na estrutura de cit <i>c</i> , na razão DEPC/cit <i>c</i> 50/1.....	106
Figura 32.	Capacidade de citocromo <i>c</i> carboxilado em promover fusão de vesículas PCPECL.....	107
Figura 33.	Gel de SDS contendo citocromo <i>c</i> extraído e purificado a partir de músculo cardíaco de atum.....	109

Figura 34.	Figura 33. Espectros de massa (MALDI-ToF) de citocromo <i>c</i> atum nativo.....	110
Figura 35.	Espectros de absorção em Uv-vis de citocromo <i>c</i> de atum purificado e citocromo <i>c</i> de cavalo procedente da Sigma na forma base livre.....	111
Figura 36.	Desligamento de citocromo <i>c</i> atum e cavalo associado em lipossomos pelo aumento da força iônica.....	113
Figura 37.	Associação de citocromo <i>c</i> em lipossomos contendo diferentes concentrações de ceramida-1-fosfato em meio pH 7,4 e 6,2.....	115
Figura 38.	Índice de refração em função de tempo após injeção de citocromo <i>c</i> 5 μ M em pH 7,4 (A) e 6,2 (B) sobre monocamada de PCPECL.....	117
Figura 39.	Δ Índice de refração em função da concentração de citocromo <i>c</i> em pH 7,4 e 6,2.....	118
Figura 40.	Interação de citocromo <i>c</i> com monocamada lipídica em pH 7,4 e 6,2.....	119
Figura 41.	Efeito de pH na taxa de respiração e fosforilação de mitoplastos e mitocôndria isolados.....	121
Figura 42.	Efeito de pH no funcionamento de mitocôndrias em diferentes condições.....	123
Figura 43.	Dados normalizados da taxa máxima de respiração de mitoplastos depletados de citocromo <i>c</i> em função da concentração de citocromo <i>c</i> adicionado.....	125
Figura 44.	(A) Gráfico dos duplos recíprocos da taxa de respiração de mitoplastos depletados de citocromo <i>c</i> em função da concentração de citocromo <i>c</i> . (B) Estruturas tridimensionais de citocromo <i>c</i> de dados cristalográficos indicando o posicionamento dos resíduos de aminoácidos presente no sítio L.....	127
Figura 45.	Efeito de pH do tratamento de citocromo <i>c</i> com DEPC na produção de ATP pelos mitoplastos supridos de citocromo <i>c</i> DEPC modificado e, efeito de pH na afinidade de citocromo <i>c</i> pela membrana interna mitocondrial.....	130
Figura 46.	Titulação de citocromo <i>c</i> base livre em presença de lipossomos POPC/POPE/CL.....	169
Figura 47.	Efeito do conteúdo de fosfolípido carregado negativamente na interação de citocromo <i>c</i> base livre com lipossomos POPC/POPE/CL em diferentes concentrações de proteína.....	170
Figura 48.	Espectro de emissão de citocromo <i>c</i> base livre em diferentes meios hidrofóbicos.....	172

Figura 49.	Efeito do aumento da força iônica (150mM NaCl) do meio na interação de citocromo <i>c</i> base livre com lipossomos POPC/POPE/POPG.....	172
Figura 50.	Esquema da estrutura de citocromo <i>c</i> de atum representada em modelo fita.....	173
Figura 51.	Espectro de fluorescência do triptofano de citocromo <i>c</i> de atum e cavalo na forma nativa e denaturada.....	174
Figura 52.	Espectro de fluorescência do triptofano de citocromo <i>c</i> cavalo em presença de lipossomos PCPECL.....	175
Figura 53.	Espectro de fluorescência do triptofano de citocromo <i>c</i> atum em presença de lipossomos PCPECL.....	175
Figura 54.	Queda da intensidade de fluorescência de citocromo <i>c</i> de atum versus o tempo.....	176
Figura 55.	Representação do posicionamento dos resíduos de triptofano e do grupo heme de citocromo <i>c</i> de atum em tampão pH 7,4.....	177
Figura 56.	Representação do posicionamento dos resíduos de triptofano e do grupo heme de citocromo <i>c</i> de atum em tampão pH 7,4 na presença de lipossomos PCPECL.....	178
Figura 57.	Representação do posicionamento dos resíduos de triptofano e do grupo heme de citocromo <i>c</i> de atum em tampão pH 6,2 na presença de lipossomos PCPECL.....	179
Figura 58.	Análise de Differential Scanning Calorimetry (DSC) de citocromo <i>c</i> cavalo na presença e ausência de lipossomos.....	181

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.	48
Equação 2.	69
Equação 3.	70
Equação 4.	71
Equação 5.	72
Equação 6.	75
Equação 7.	122
Equação 8.	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Comprimento de onda dos picos de absorção das principais classes de citocromos e oxiemoglobina.....	23
Tabela 2.	Composição lipídica de membranas celular (de fígado de rato).....	26
Tabela 3.	Composição lipídica de membranas interna e externa mitocondrial (de fígado de rato).....	26
Tabela 4.	Carga líquida dos principais glicerofosfolipídios em pH 7,0.....	27
Tabela 5.	Comparação da seqüência de aminoácidos de citocromo <i>c</i> de 7 espécies.....	33
Tabela 6.	Efeito de pH no tamanho de lipossomos de PCPECL na presença e ausência de citocromo <i>c</i> monitorado pelo Zeta Plus.....	84
Tabela 7.	Massa previstas de citocromo <i>c</i> carboxilado por DEPC.....	92
Tabela 8.	Massa dos fragmentos peptídicos de cit <i>c</i> nativo e modificado por DEPC detectados pelo MALDI-ToF.....	101
Tabela 9.	Velocidade de consumo de oxigênio pelos mitoplastos na presença e ausência de antimicina A (nmol O/mg/min).....	126
Tabela 10.	Tempo de vida da fluorescência de citocromo <i>c</i> atum na presença e ausência de lipossomos PCPECL.....	177
Tabela 11.	Temperatura de desnaturação de citocromo <i>c</i> na ausência e presença de lipossomos, em pH 7,4 e 6,2.....	181

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\Psi$ - Potencial transmembrana

AA – Antimicina A

Acetil-CoA – Acetil-Coenzima A

ACN – acetonitrila

ADP – Adenosina difosfato

APAF-1 - Fator de ativação de protease apoptótica

Asn – Asparagina

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Albumina de soro bovino

CAF – *Chemically assisted fragmentation*

Cit *c* – Citocromo *c*

CM 32 - *Carboxymethyl Cellulose 32*

DNP - 2,4-dinitrofenol

DSC - *Differential Scanning Calorimetry*

DTT - Dithiothreitol

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA - Ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)*N,N'*-tetraacetic acid

FADH₂ – Flavina adenina dinucleotídeo

FCCP - Carbonilcianeto-p-trifluorometoxi fenil-hidrazona

HEPES - 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

HII - Fase hexagonal invertida

His - Histidina

GTP – Guanosina trifosfato

K_{sapp} – Constante macroscópica de dissociação

Lys - Lisina

MALDI-ToF - *Mass-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*

MES – 2-[Morpholino]ethanesulfonic acid

Met – Metionina

MP – Mitoplasto

MPc – mitoplastos supridos de citocromo *c*

MTB - Transição de permeabilidade mitocondrial

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

P_i – Fosfato inorgânico

PPDPC - 1-palmitoyl-2-[10-(pyren-1-yl)decanoyl]-*sn*-glycerol-3-phosphocholine

PSA – Amonium Persulfate

RFI – Unidade relativa de fluorescência

SA - Sinapinic acid

SDS – Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE – Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SPR - *Surface Plasmon Resonance*

TEMED – N,N,N',N' - tetra methylethylenediamine

TFA - ácido trifluoracético

TEA - trietilamina

Trp - Triptofano

UV-Visível – Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Primeiros trabalhos de citocromo <i>c</i>	18
1.2. Citocromo <i>c</i>	19
1.3. Hemoproteínas.....	20
1.4. Classes de citocromo.....	21
1.5. Mitocôndria.....	24
1.6. Membrana mitocondrial.....	25
1.7. Inibidores mitocondriais.....	29
1.8. Estrutura de citocromo <i>c</i>	30
1.9. Modificação química de citocromo <i>c</i> por DEPC.....	34
1.10. Funções de citocromo <i>c</i>	36
1.10.1. Transportador de elétrons na cadeia respiratória.....	36
1.10.2. Citocromo <i>c</i> como mediador de apoptose.....	39
1.10.3. Atividade oxidase e peroxidase de citocromo <i>c</i>	42
1.11. Associação de citocromo <i>c</i> com membranas fosfolipídicas.....	44
1.12. Transferência de energia pela ressonância da fluorescência.....	48
1.13. Citocromo <i>c</i> e esfingolipídios como mediadores de apoptose.....	51
1.13.1. Mecanismo de ação das ceramidas no processo apoptótico.....	53
2. OBJETIVOS	54
3. MÉTODOS	55
3.1. MATERIAIS.....	55
3.2. EQUIPAMENTOS.....	57
3.3. PROCEDIMENTOS.....	59
3.3.1. Extração e purificação de citocromo <i>c</i> de músculo de atum.....	62
3.3.2. Gel de eletroforese SDS-PAGE.....	64
3.3.3. Preparo de citocromo <i>c</i> base livre (porfirina cit <i>c</i>).....	65
3.3.4. Modificação química por dietilpirocarbonato (DEPC).....	65
3.3.5. Preparo de lipossomos.....	66

3.3.5.1. Lipossomos preparados por sonicação.....	66
3.3.5.2. Lipossomos preparados por extrusão.....	67
3.3.6. Obtenção de mitoplastos.....	67
3.3.6.1. Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato.....	67
3.3.6.2. Dosagem de proteína.....	68
3.3.6.3. Preparo de mitoplastos.....	69
3.3.7. Medidas de consumo de oxigênio.....	70
3.3.8. Dosagem de ATP.....	71
3.3.9. Medidas de absorvância UV-Vis.....	71
3.3.9.1. Determinação de valores de pK_a	72
3.3.10. Medidas de fluorescência.....	72
3.3.10.1. Medidas de fluorescência em estado estacionário (<i>steady-state</i>).....	72
3.3.10.2. Medidas de tempo de vida de fluorescência (<i>lifetime</i>).....	73
3.3.10.3. Determinação de fusão de lipossomos contendo lipídio marcado PPDPC.....	74
3.3.11. Medidas de determinação do diâmetro médio e do potencial zeta das vesículas de PCECL.....	74
3.3.12. Espectroscopia de massa por Maldi-Tof (<i>Mass-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight</i>).....	75
3.3.13. Medida de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR – <i>Surface Plasmon Resonance</i>).....	77
3.3.13.1 Preparo da monocamada lipídica.....	78
3.3.14. Medidas de <i>Differential Scanning Calorimetry</i> (DSC).....	80
4. RESULTADOS	81
4.1. Sistemas modelo: vesículas de PCPECL E PCPEPG.....	81
4.1.1. Efeito de pH na instabilidade coloidal de vesículas fosfatidilcolina/ fosfatidiletanolamina/ cardiolipina (PCPECL) e fosfatidilcolina/ fosfatidiletanolamina/ fosfatidilglicerol (PCPEPG) promovido pelo citocromo <i>c</i>	81
4.1.2. Determinação da causa do aumento da turbidez em função de pH promovido por cit <i>c</i>	84
4.1.3. Identificação de grupos ionizáveis específicos com $pK_a \sim 7,0$	86
4.1.4. Modificação química em resíduos de aminoácido específicos de citocromo <i>c</i> por dietil pirocarbonato – DEPC	90

4.1.5. Estudo do perfil dos valores de pK_a dos aminoácidos envolvidos no sítio A e L na estrutura de citocromo <i>c</i>	104
4.1.6. Estudo comparativo da interação de citocromo <i>c</i> de cavalo e atum em lipossomos PCPECL.....	108
4.1.7. Isolamento e purificação de citocromo <i>c</i> de coração de atum.....	109
4.1.8. Dissociação de citocromo <i>c</i> de cavalo e atum de lipossomos PCPECL..	111
4.1.9. Efeito de ceraminda na afinidade de citocromo <i>c</i> de cavalo e atum com lipossomos PCPECL.....	114
4.1.10. Monitoramento da interação de citocromo <i>c</i> em monocamadas lipídicas por SPR.....	116
4.1.11. Interação de citocromo <i>c</i> com membrana interna mitocondrial de mitoplastos e produção de ATP.....	120
5. DISCUSSÃO	133
5.1 Sistema modelo de membrana: Identificação do sítio L na estrutura de citocromo <i>c</i>	133
5.2 Sistema biológico: Papel biológico do sítio L na estrutura de citocromo <i>c</i>	142
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	147
7. REFERÊNCIAS	149
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	168
8.1 Estudos iniciados durante o período de doutoramento (não concluídos).....	168
8.1.1. Monitoramento da fluorescência intrínseca de citocromo <i>c</i> associado a vesículas fosfolipídicas.....	168
8.1.2. Comparação da fluorescência intrínseca de citocromo <i>c</i> de cavalo e atum associados a membranas fosfolipídicas.....	173
8.1.3. Estudo comparativo das propriedades termodinâmicas da associação de citocromo <i>c</i> com membranas de PCPECL via sítio A e L.....	180
8.2. Estudo das interações eletrostática e lipídeo estendida dos sítios A e L de citocromo <i>c</i> com modelos de membrana interna mitocondrial contendo lipídeos íntegros e oxidados por radicais livres e por oxigênio singlete.....	182
9. ANEXO 1 (<i>Parecer da Comissão de Ética em manipulação e experimentação animal – CEMEA/UMC autorizando o projeto</i>).....	184

1. INTRODUÇÃO

1.1. Primeiros trabalhos de citocromo *c*

Desde 1880, trabalhos de um físico MacMunn já descreviam a presença de quatro bandas espectroscópicas em numerosos tecidos e organismos vivos, postulando que envolviam pigmentos denominados histohematinas ou miomatinas, responsáveis pelo papel respiratório no interior das células, exibindo fases de oxidação e redução. Contudo, na época, seu trabalho foi alvo de críticas, principalmente pelo cientista Hoppe-Seyler que justificava as bandas espectroscópicas como sendo derivados de hemoglobina.

Em 1925, o clássico artigo de Keilin também observa as quatro bandas características de citocromo *c* em musculatura torácica de larva da mosca *Gasterophilus intestinalis* por meio de espectrocópio de baixa dispersão, enquanto o autor estudava mudanças no conteúdo de hemoglobina durante o ciclo de vida da mosca. Keilin julgou que o pigmento observado era derivado de hemoglobina contudo, análises de outros organismos que não continham hemoglobina, incluindo levedura de fermento, ele logo percebeu que o pigmento encontrava-se amplamente distribuído e que não poderia ser derivado de hemoglobina. O autor ainda relata o aparecimento das bandas no espectro de uma suspensão de leveduras que foi aerada, mas que no início (antes do processo de aerar a suspensão) o espectro da suspensão não apresentava as bandas. Assim, Keilin descreve os componentes da cadeia respiratória, citocromo (“pigmento de célula”) *a*, *b* e *c* e seu papel no processo de respiração intracelular (KEILIN, 1925; RICH, 2003).

A partir dos estudos de Keilin, muitos trabalhos vêm se dedicados a estudar citocromo *c*, que além de seu papel como transportador de elétrons na cadeia respiratória, essa

hemoproteína tem ganhado destaque em outros eventos biológicos, como a apoptose e até doenças degenerativas e neoplasias.

Importantes trabalhos sobre a estrutura de citocromo *c* foram descritos por Dickerson e Timkovich (1975), Nicholls (1974) e são referências de estudos até o presente momento. Por volta de 1960, muitos trabalhos também descrevem a influência da associação da hemoproteína com membranas fosfolípídicas na sua atividade como a de Kimelberg e Lee (1969), Quinn e Dawson (1969), Vanderkooi et al (1973), Teissie (1981), Mustonen et al. (1987), entre outros.

1.2. Citocromo *c*

O citocromo *c* (cit *c*) respiratório é uma hemoproteína periférica encontrada associada à superfície externa da membrana interna da mitocôndria, onde desempenha o papel de transportador de elétrons na cadeia respiratória. É considerada uma proteína relativamente pequena, por apresentar uma massa molecular de cerca de 12,4 kDa. Assim como a maioria das proteínas mitocondriais, o citocromo *c* é codificado por um gene nuclear, e não pelo DNA mitocondrial. O apocitocromo *c*, precursor do holocitocromo *c*, não apresenta peptídeo sinal e é sintetizado pelos ribossomos livres no citosol. Então é translocado para a mitocôndria, onde se liga a receptores específicos da membrana externa, permitindo sua passagem para o espaço entre membranas. Um único grupo heme é então covalentemente ligado a apoproteína pela enzima heme liase que, por pontes tioéster, une os grupos vinil do heme aos dois resíduos de cisteínas 14 e 17 da cadeia polipeptídica, formando assim, o holocitocromo *c* (KORB, NEUPERT, 1978; HENNIG, NEUPERT, 1981; ZIMMERMANN, HENNIG, NEUPERT, 1981, NICHOLSON, KOHLER, NEUPERT, 1987).

1.3. Hemoproteínas

Hemoproteínas são proteínas que apresentam o grupo prostético heme. O grupo heme pertence à classe das porfirinas (Protoporfirina IX), sendo constituído por quatro anéis de pirrol unidos por pontes metilênicas e apresenta o íon ferro como metal coordenante no centro do anel porfirínico. A **Figura 1** abaixo mostra a estrutura da Protoporfirina IX.

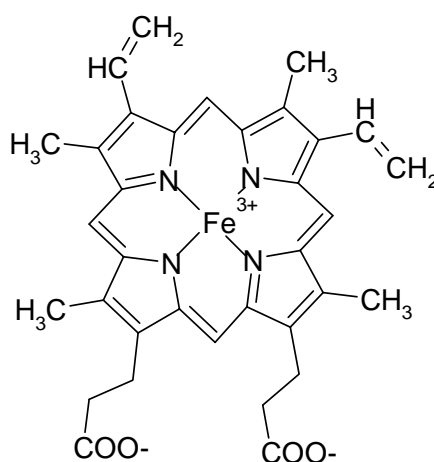


Figura 1. Estrutura do grupo heme.

As hemoproteínas encontradas nos organismos vivos são: a hemoglobina, a mioglobina, as peroxidases, tais como HRP (horseradish peroxidase) e catalase, os citocromo-P₄₅₀ e citocromos respiratórios. A hemoglobina é responsável pelo transporte de O₂ dos pulmões para os tecidos enquanto que a mioglobina está relacionada ao armazenamento de O₂ nos músculos e detoxicação de NO (FLÖGEL et al., 2000; COOPER, 1999). As peroxidases estão envolvidas na degradação de peróxidos. O citocromo-P₄₅₀, encontrado no retículo

endoplasmático, está envolvido na hidroxilação do carbono ω de ácidos graxos, utilizando as moléculas de NADPH e O_2 . No fígado, citocromo-P₄₅₀ também participa da hidroxilação de compostos orgânicos nocivos ao organismo de modo a possibilitar sua eliminação renal. Os citocromos respiratórios são encontrados na membrana interna da mitocôndria da maioria dos organismos aeróbicos e anaeróbicos facultativos e integram a cadeia transportadora de elétrons (BROWN, 1992; HINKLE, et al., 1995; JUNGE, LILL, ENGLEBRECHT, 1997; TRUMPOWER, B. L. GENNIS, 1994; RICH, 2003; HOSLER, FERGUSON-MILLER, MILLS, 2006; NAVARRO, BOVERIS, 2007). O potencial de óxido-redução de citocromo *c*, em solução, é de 250 mV (RODKEY, BALL, 1950).

1.4. Classes de citocromo

Os citocromos são divididos em três classes: *a*, *b* e *c*. Cada grupo de citocromo apresenta o heme ligado covalentemente a cadeia polipeptídica por ligantes diferentes. Os citocromos do tipo *b* contêm a protoporfirina IX, enquanto que os citocromos que contêm o heme *a* apresentam uma longa cauda hidrofóbica de unidades de isopreno ligada à porfirina, além de um grupo formil no lugar de um grupo metil, encontrada nos hemes *b* e *c*. O grupo heme dos citocromos tipo *c* difere-se da protoporfirina IX, pois os grupos vinil estão ligados ao átomo de enxofre dos resíduos de cisteína da proteína por pontes tioéster. A **Figura 2** mostra os tipos de heme e seus ligantes (DICKERSON, TIMKOVICH, 1975).

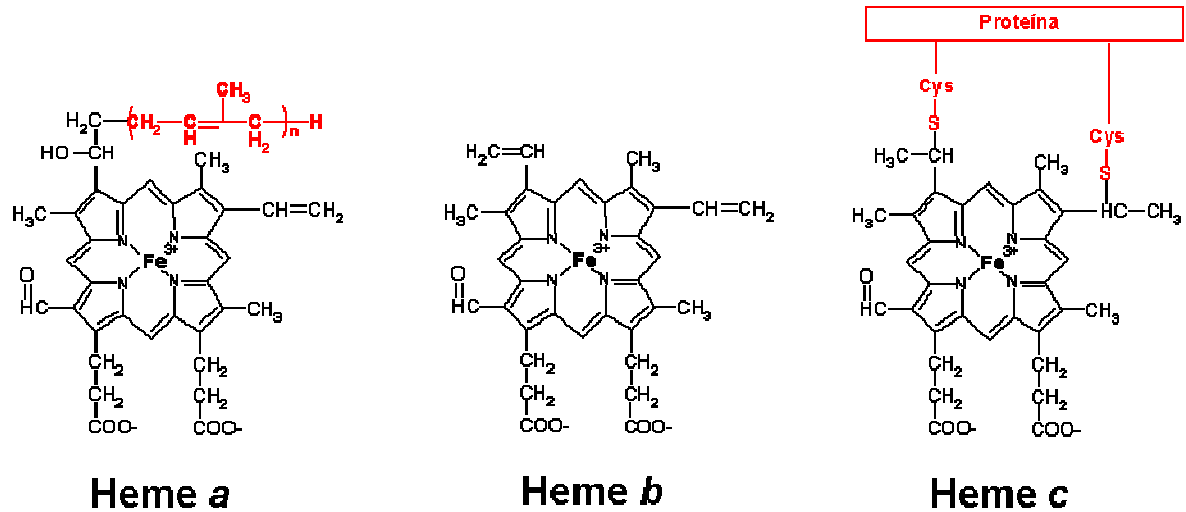


Figura 2. Estrutura de heme *a*, *b* e *c*. Heme *a* apresenta uma longa cauda hidrofóbica de isopreno ligada na porfirina; heme *b* contém a protoporfirina IX, também encontrada na hemoglobina e mioglobina; heme *c* apresenta os grupos vinil ligados as sulfidrilas dos resíduos de cisteína.

Os diferentes grupos heme foram caracterizados de acordo com seus espectros de absorvância a luz visível. De modo geral, os citocromos apresentam 3 bandas características no espectro de absorvância de luz visível (**Figura 3**), mas que diferem pelos valores de comprimento de onda dos picos de α , β e γ (**Tabela 1**).

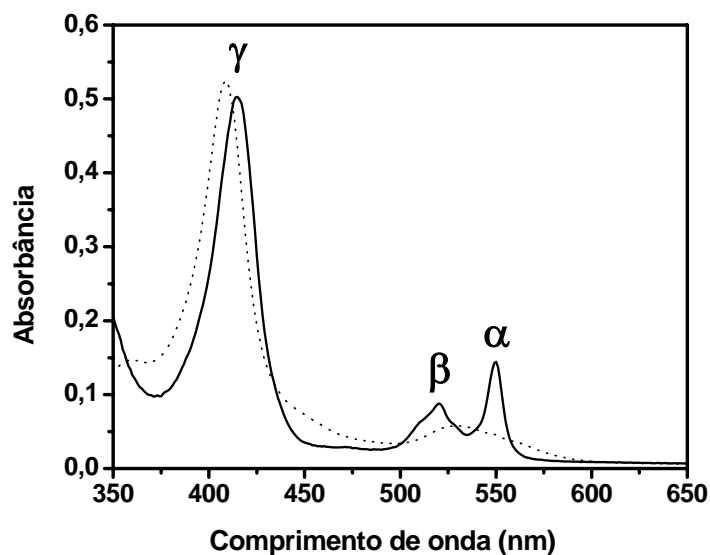


Figura 3. Espectro de absorvância luz visível de citocromo *c* de coração de cavalo nos estados de oxidação Fe^{3+} e Fe^{2+} . Linha cheia: citocromo *c* Fe^{3+} ; linha pontilhada: Fe^{2+} , ambas medidas foram realizadas utilizando a proteína em tampão HEPES 10 mM pH 7,4, 25°C.

Tabela 1: Comprimento de onda dos picos de absorção das principais classes de citocromos e oxiemoglobina (DICKERSON, TIMKOVICH, 1975).

Proteína	Banda de absorção		
	α (nm)	β (nm)	γ (nm)
Citocromo <i>a</i>	592 – 604	-----	439 - 443
Citocromo <i>b</i>	555 - 567	526 - 546	408 - 449
Citocromo <i>c</i>	550 - 558	521 - 527	415 - 423
Oxiemoglobina	577	542	415

As bandas α , γ e β representam a excitação dos elétrons do anel porfírico. A banda γ (também denominada de Soret) absorve próxima da região violeta do espectro, 400-415 nm, a banda β absorve na região ocorre região do verde 520-546 nm e a banda α absorve na região

do amarelo 550-604 nm, na forma reduzida (Fe^{2+}), enquanto que na forma oxidada (Fe^{3+}) apresenta uma única banda (banda Q) com pico máximo por volta de 530 nm (DICKERSON, 1975).

1.5. Mitocôndria

Estrutura e função de proteínas estão relacionadas a sua localização celular e hidrofobicidade. Muitas proteínas são específicas de certas membranas celulares, que apresentam uma composição característica, uma vez que os lipídios não estão distribuídos aleatoriamente entre as membranas da célula. A mitocôndria possui uma complexa estrutura formada por duas membranas (interna e externa), **Figura 4**, que se diferem em função e composição química. Ela contém seu próprio DNA e RNA e sintetiza apenas cerca de 10 % da massa total de proteínas encontrada nela, sendo o restante, codificada por genes nucleares, sintetizadas no citoplasma e translocadas para dentro da mitocôndria. O mesmo ocorre com os lipídios de membrana, em que uma parte origina do retículo endoplasmático, e outra é sintetizada pela própria organela.

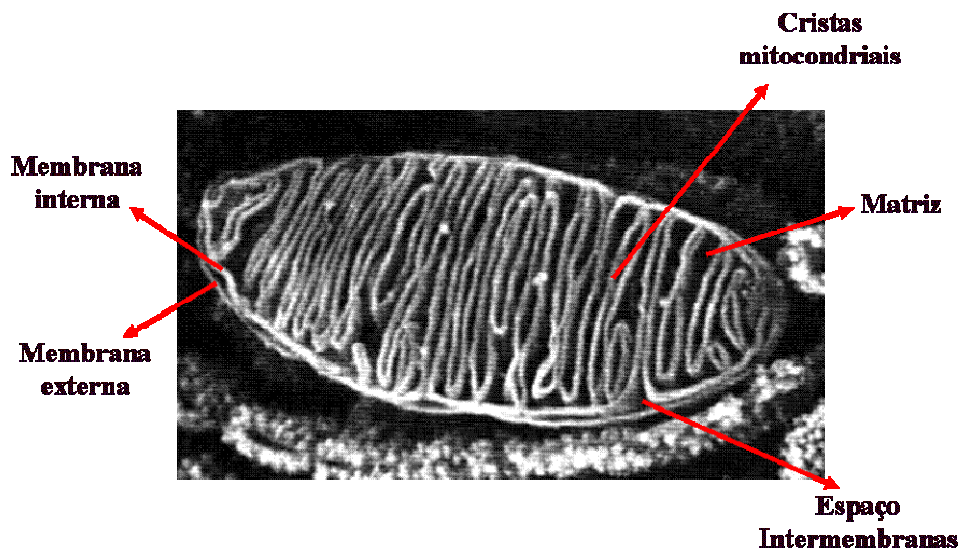


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura de mitocôndria de pâncreas de rato. Organização interna da mitocôndria (TANAKA, 1987).

1.6. Membrana mitocondrial

Uma das características da composição lipídica mitocondrial é a alta porcentagem de cardiolipina encontrada e baixas concentrações de esfingolipídios, como mostra a **Tabela 2** (ZAMBRANO, FLEISCHER, FLEISCHER, 1975; KHANDWALA, KASPER, 1971).

A composição fosfolipídica da membrana externa mitocondrial apresenta uma alta razão fosfolipídio/proteína em relação à membrana interna. O alto conteúdo de cardiolipina é encontrado na face interna, uma vez que esse fosfolipídio é sintetizado nesta membrana, valores mostrados na **Tabela 3** (COLBEAU, NACHBAUR, VIGNAIS, 1971; GUARNIERI, STECHMILLER, LEHNINERG, 1971; CHENEVAL et al., 1985; SAUNIER, LEVY, 1971).

Tabela 2: Composição lipídica de membranas celular (de fígado de rato) (ZAMBRANO, FLEISCHER, FLEISCHER, 1975; KHANDWALA, KASPER, 1971).

Porcentagem de fosfolipídio total			
	Mitocôndria	Membrana Plasmática	Membrana Nuclear
Cardiolipina	18	1	4
Fosfatidiletanolamina	35	23	13
Fosfatidilcolina	40	39	55
Esfingomielina	1	16	3
Fosfatidilinositol	5	8	10
Fosfatidilserina	1	9	3
Colesterol (mg/mg proteína)	0,003	0,128	0,038

Tabela 3: Composição lipídica de membranas interna e externa mitocondrial (de fígado de rato) (COLBEAU, NACHBAUR, VIGNAIS, 1971; GUARNIERI, STECHMILLER, LEHNINERG, 1971; CHENEVAL et al., 1985; SAUNIER, LEVY, 1971).

Porcentagem de fosfolipídio total		
	Membr. Interna	Membr. Externa
Cardiolipina	14-23	3-10
Fosfatidiletanolamina	32-39	20-35
Fosfatidilcolina	38-45	44-59
Esfingomielina	1-2	2-4
Fosfatidilinositol	2-7	5-20
Proteína (μg lipídio/ mg proteína)	155-310	280-600

Cardiolipina é conhecido por ser um fosfolípido essencial para manutenção da estrutura e função de várias proteínas envolvidas na bioenergética mitocondrial. A perda do conteúdo de cardiolipina, alterações na cadeia acil, e/ou peroxidação da cardiolipina têm sido associado a disfunções mitocondriais em múltiplos tecidos em uma variedade de condições patológicas, incluindo isquemia, hipotireoidismo, processo de envelhecimento, entre outros (CHICCO, SPARAGNA, 2006; SEN et al., 2006).

A **Figura 5** mostra a estrutura dos principais glicerofosfolípidios encontrados em membranas biológicas e a **Tabela 4** mostra a carga líquida da cabeça polar dos respectivos fosfolípidios (GURR, HARWOOD, 1991).

Tabela 4. Carga líquida dos principais glicerofosfolípidios em pH 7,0 (GURR, HARWOOD, 1991).

Lípido	Grupo Fosfato	Base	Carga Líquida
Fosfatidilcolina	-1	+1	0
Fosfatidiletanolamina	-1	+1	0
Fosfatidilglicerol	-1	0	-1
Fosfatidilserina	-1	0	-1
Fosfatidilinositol	-1	0	-1
Cardiolipina	-2	0	-2

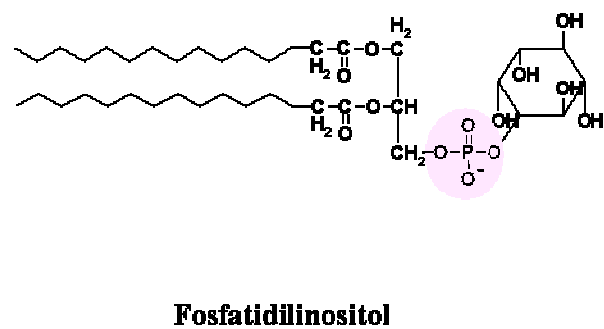
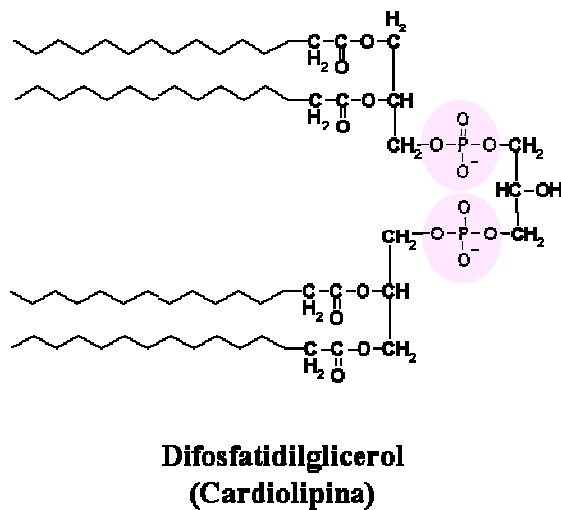
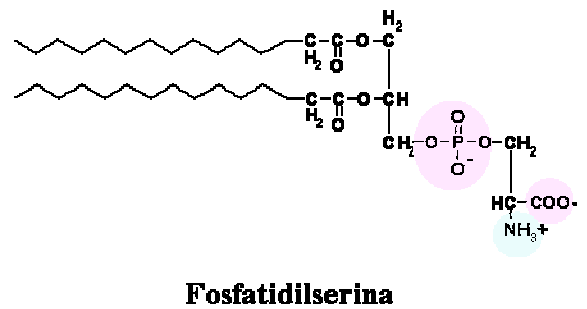
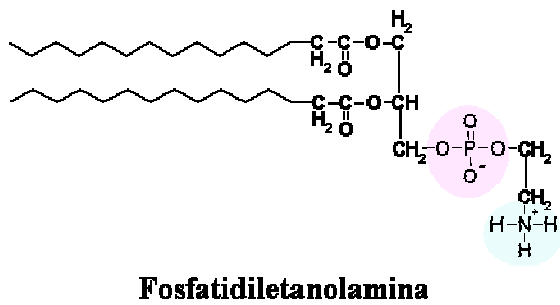
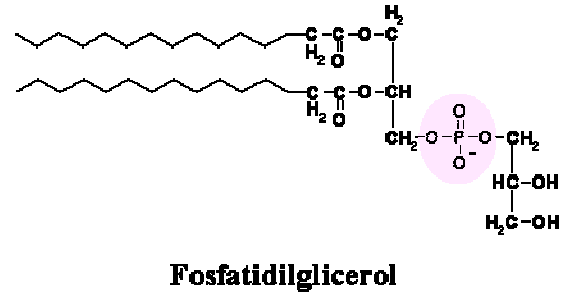
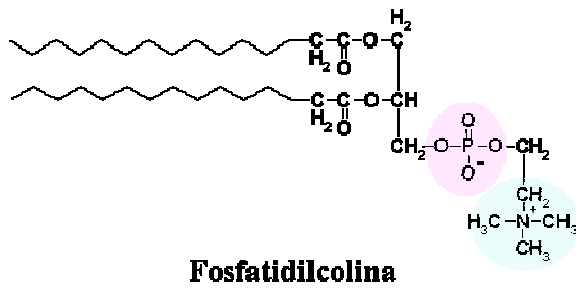


Figura 5. Estrutura dos glicerosfolipídios: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, cardiolipina e fosfatidilinositol. Em azul, região de carga positiva, em rosa, região de carga negativa.

1.7. Inibidores mitocondriais

A taxa de consumo de oxigênio por uma suspensão de mitocôndrias é uma medida sensível da atividade da cadeia de transporte de elétrons e pode ser controlada pela adição de inibidores da cadeia ou substratos. Dentre os compostos geralmente utilizados na literatura estão:

- Rotenona e amital: inibidores do Complexo I;
- Antimicina A: inibidor do Complexo III;
- Cianeto de potássio, monóxido de carbono e azida sódica: inibidores do Complexo IV;
- Oligomicina: inibidor da ATPase (ou ATP-sintase).

A **Figura 6** mostra o esquema do transporte de elétrons pela cadeia transportadora acoplada a produção de ATP, indicando os seus respectivos inibidores e substratos (BARRIENTOS, MORAES, 1999; TYLER et al., 1968). A síntese de ATP, promovida pelo gradiente eletroquímico, depende da impermeabilidade da membrana interna. Contudo, compostos como 2,4-dinitrofenol (DNP) e carbonilcianeto-p-trifluorometoxi fenil-hidrazona (FCCP) têm sido descritos como agentes desacopladores, permitindo que o transporte de elétrons continue sem que haja a fosforilação oxidativa, por dissipar o gradiente de prótons. Na presença destes compostos, eles captam prótons do espaço entre membranas (local mais acidificado), difundem-se na membrana interna mitocondrial e liberam para a matriz (local mais alcalino), criando uma rota alternativa da passagem de prótons do espaço entre membranas para a matriz sem promover a síntese de ATP (BROWN, 1992; HINKLE, et al., 1995; TRUMPOWER, B. L. GENNIS, 1994;).

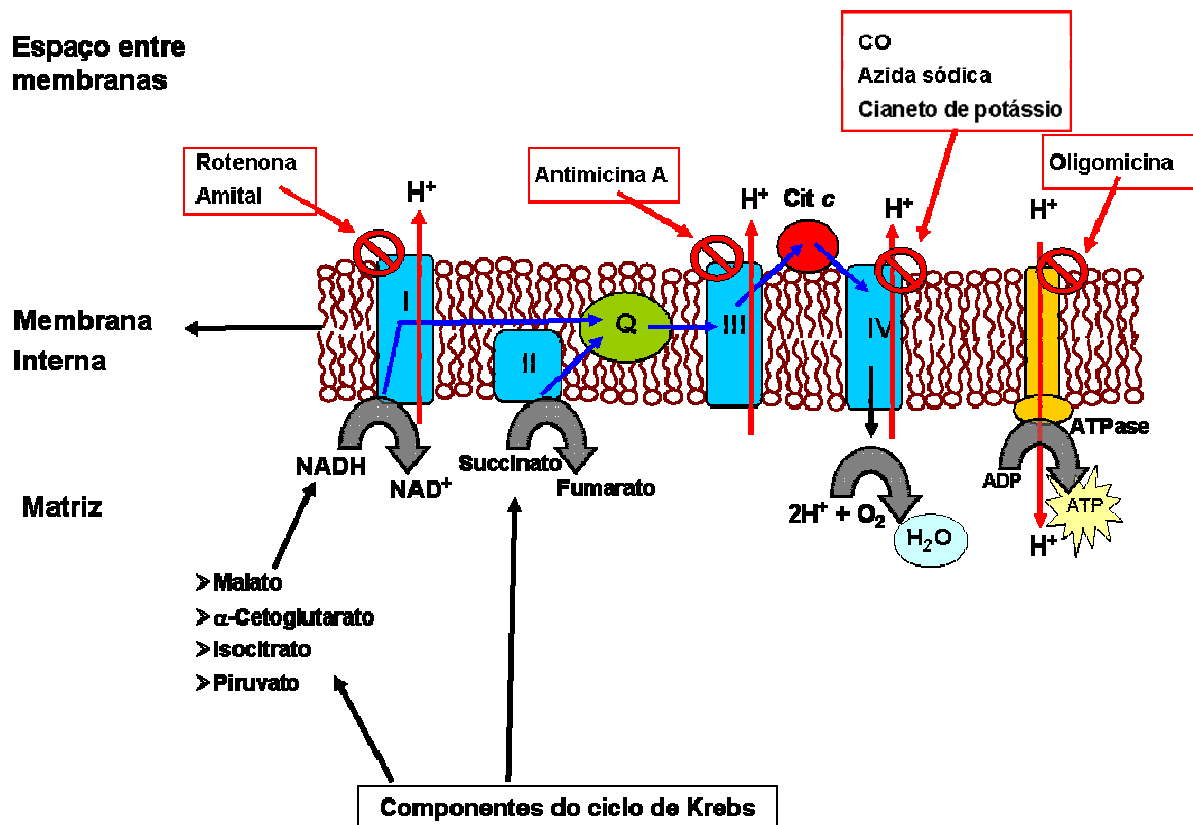


Figura 6. Componentes da cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa e seus inibidores. O fluxo de prótons está representado pela seta azul; complexos I, III e IV, em azul; fosforilação oxidativa pela ATPase (em amarelo); o fluxo de elétrons entre os complexos está representado pela seta preta. Q representa a coenzima Q.

1.8. Estrutura de citocromo *c*

O citocromo *c* apresenta um único grupo heme ligado covalentemente a uma cadeia polipeptídica de 103 a 113 resíduos de aminoácidos. De modo geral, a estrutura secundária da proteína apresenta conteúdos alfa-hélices, que estão envoltas ao grupo heme, como mostra **Figura 7A**, sendo considerada na literatura como uma proteína esférica. O átomo de ferro do grupo heme encontra-se hexacoordenado, com a quinta e sexta posição ocupada pela histidina 18 e metionina 80, respectivamente (**Figura 7B**). A presença de Met80 na sexta coordenação

do ferro hemínico mantém no estado de baixo-spin (DICKERSON, TIMKOVICH, 1975). A sexta coordenação, do átomo de ferro com a Met 80, é conhecida por ser uma ligação estável, contudo pode ser facilmente quebrada pela alteração de pH, de temperatura e presença de ligantes, tais como CN^- e N_3^- , alterando o estado de spin do grupo heme para alto-spin (OSHEROFF et al., 1980; WUTHRICH, AVIRAM, SCHEJTER, 1971).

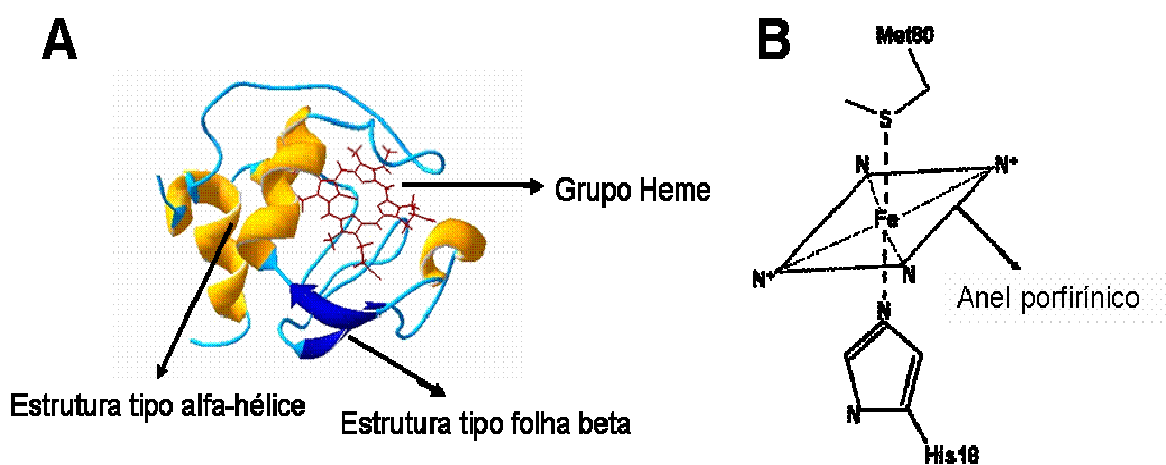


Figura 7. Representação da estrutura tridimensional de citocromo *c* (cavalo) em solução aquosa (A) e coordenação do átomo de ferro do grupo heme com a metionina e histidina da cadeia polipeptídica de citocromo *c* (B). A figura 7 A foi elaborada no programa Swiss-PDB Viewer utilizando dados, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=2554674>, número de identificação **1AKK**. Acesso em: 24 de jan. 2007.

A seqüência de citocromo *c* apresenta um alto conteúdo de resíduos de lisina, sendo assim considerada como uma proteína básica em pH neutro, com um ponto isoelétrico de pH 10,5 (PINHEIRO, 1994; NICHOLLS, 1974). Por exemplo, citocromo *c* de cavalo apresenta 19 resíduos de lisina, 3 histidinas e 2 argininas, correspondendo cerca de 23 % do total de aminoácidos (**Tabela 5**). Devido ao alto teor de resíduos básicos, a transição alcalina de citocromo *c* de cavalo apresenta um valor de pK aparente alto, entre 8,8 a 9,2, dependendo da força iônica do meio (WALLACE, 1984; OSHEROFF et al., 1980). Enquanto que a transição ácida da proteína apresenta um valor de pK aparente por volta de 2,5 (MYER, SATURNO,

1990; ELÖVE, RODER, BHUYAN, 1994). Análises de cristalografia de raio-X de cit *c* Fe³⁺ (de coração de cavalo) descrevem como sendo uma proteína esférica com um diâmetro de cerca de 28 Å (SHIPLEY, LESLIE, CHAPMAN, 1969).

Estudos comparativos sobre a importância dos dois resíduos de histidina 26 e 33, encontrados na maioria das seqüências de aminoácidos de citocromo *c* de vertebrados e invertebrados, mostraram que sua substituição por outro tipo de aminoácido influencia significativamente a estabilidade da proteína. Pela técnica de mutação pontual sítio dirigida, esses trabalhos demonstraram que, a substituição da His26 (invariante) por uma valina ou tirosina causou na queda da estabilidade global da proteína pelo fato da valina ou tirosina não pode formar interação do tipo ponte de hidrogênio com os resíduos de asparagina 31 e prolina 44. Mutações nos resíduos de histidina 33 e 39 por tirosina e lisina, respectivamente, não apresentaram efeito significativo na estabilidade estrutural da proteína, contudo, a substituição da histidina 33 por fenilalanina, resultou no aumento da estabilidade global da proteína, devido à interação hidrofóbica entre o aminoácido e o grupo heme. (QIN et al., 1995; SINIBALDI et al., 2003; SINIBALDI et al., 2006).

Tabela 5: Comparação da seqüência de aminoácidos de citocromo *c* de 7 espécies.

Espécie		Seqüência				
Homem	-1	M	GDVEKGGKIF	IMKCSQCHTV	EKGGKHKVGP	30
Cavalo	-1		GDVEKGGKIF	VQKCAQCHTV	EKGGKHKVGP	30
Levedura	-6	MTEFKA	GSAKKGATLF	KTRCLQCHTV	EKGGPHKVGP	30
Atum	-1		GDVAKGGKTF	VQKCAQCHTV	ENGGKHKVGP	30
Estrela do mar	-1	M	GQVEKGGKIF	VQRCAQCHTV	EKAGKHKVGP	30
Drosophila	-5	MGVPA	GDVEKGGKLF	VQRCAQCHTV	EAGGKHKVGP	30
Girassol	-9	MASFAEAPA	GNPTTGEKIF	KTKCAQCHTV	EKGAGHKVGP	30
Homem	30	NLHGLFGRKT	GQAPGYSYTA	ANKNKGIIWG	EDTLMEYLEN	70
Cavalo	30	NLHGLFGRKT	GQAPGFTYTD	ANKNKGITWK	EETLMEYLEN	70
Levedura	30	NLHGIFGRHS	GQAEGYSYTD	ANIKKNVLWD	ENNMSEYLTN	70
Atum	30	NLWGLFGRKT	GQAEGYSYTD	ANKSKGIVWN	NDTLMEYLEN	70
Estrela do mar	30	NLNGILGRKT	GQAAGFSYTD	ANRNKGITWK	NETLFEYLEN	70
Drosophila	30	NLHGLIGRKT	GQAAGFAYTD	ANKAKGITWN	EDTLFEYLEN	70
Girassol	30	NLNGLFGRQS	GTTAGYSYSA	GNKNKAVIWE	ENTLYDYLLN	70
Homem	70	PKKYIPGTKM	IFVGIKKKEE	RADLIAYLKK	ATNE	104
Cavalo	70	PKKYIPGTKM	IFAGIKKKTE	REDLIAYLKK	ATNE	104
Levedura	70	PKKYIPGTKM	AFGGLKKEKD	RNDLITYLKK	ACE	103
Atum	70	PKKYIPGTKM	IFAGIKKKGE	RQDLVAYLKS	ATS	103
Estrela do mar	70	PKKYIPGTKM	VFAGLKKQKE	RQDLIAYLEA	ATK	103
Drosophila	70	PKKYIPGTKM	IFAGLKKPNE	RGDLIAYLKS	ATK	103
Girassol	70	PKKYIPGTKM	VFPGPKKPQE	RADLIAYLKT	STA	113

Região em amarelo corresponde aos aminoácidos básicos.

Fonte: disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 27 de jan. 2007. Número de identificação das espécies: homem (*Homo sapiens*) NP061820; levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) CAA89576; estrela do mar (*Asterias Rubens*) P00029; drosophila (*Drosophila melanogaster*) AAA2837; girassol (*Helianthus annuus*) AAR30955.

Estudos de modificação química nos resíduos de lisina na estrutura de cit *c*, trabalhos têm apontado como domínio de interação de cit *c* com citocromo *c* redutase (do complexo III), provavelmente as lisinas 13, 72, 86, 27 e 87 (em ordem decrescente de importância), sendo que as modificações na posição 13 e 72 demonstraram maior influência na atividade da proteína na transferência de elétrons. Para o reconhecimento e atividade com o citocromo *c* oxidase, foram apontados os resíduos 13, 72, 86 e 27, em ordem decrescente de importância (NICHOLLS, 1974; KOPPENOL, MARGOLIASH, 1982; PELLETIER, KRAUT, 1992).

1.9. Modificação química de citocromo *c* por DEPC

Dietilpirocarbonato (C_2H_5OCO)₂O, abreviado como DEPC, também denominado como anidrido etoxifórmico, dietiloxidiformado, ou dietildicarbonado é um conhecido agente químico modificador preferencial de grupos histidil muito utilizado para demonstrar a importância de resíduos de histidina no sítio ativo de proteínas (MILES, 1977; MCGINNITY et al., 1996; BOSSHARD, BÄNZIGER, HASLER, 1984). Ele também apresenta capacidade de agir sobre resíduos de lisina (MILES, 1977; MINAMI, ISLAM, FUNATSU, 1998; HONDAL et al., 2001). A reação promovida pelo DEPC envolve a carboxilação, também descrita como etoxiformilação, da cadeia lateral do resíduo de aminoácido, como mostra a **Figura 8**, levando ao acréscimo de massa cerca de 72 Da. O processo é dependente de pH, pois a reação é desfavorecida quando o resíduo de histidina ou lisina encontram-se no estado protonado (HOLBROOK, INGRAM, 1973; HONDAL et al., 2001).

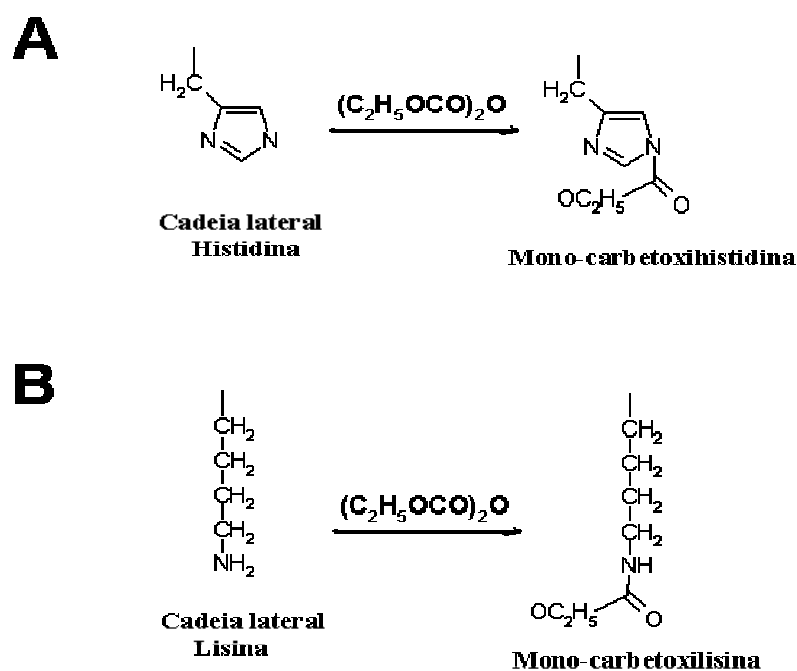
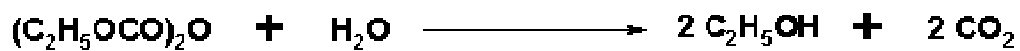


Figura 8. Reação de carboxilação da cadeia lateral de histidina (A) e lisina (B) pelo DEPC.

O número de resíduos de histinas modificadas pode ser calculado pela diferença de absorção molar de N-carboxihistidina em 240 nm, $\Delta\epsilon_{240\text{nm}} = 3200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Excesso de DEPC também pode sofrer hidrólise, conforme mostra o esquema a seguir (MILES, 1977).

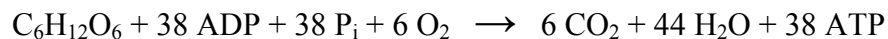


1.10. Funções de citocromo *c*

1.10.1. Transportador de elétrons na cadeia respiratória

A respiração celular é um processo exergônico que consiste na oxidação das coenzimas NADH e FADH₂ pelos componentes da cadeia respiratória com aproveitamento da energia liberada para a formação de um gradiente eletroquímico de prótons cuja dissipação libera energia para a síntese de ATP. As coenzimas NADH e FADH₂ reoxidadas na cadeia respiratória carregam equivalentes redutores retirados de combustíveis energéticos como a glicose e os ácido graxos livres.

No caso da glicose, o processo pode ser resumido na seguinte estequiometria:



onde P_i é fosfato inorgânico.

A oxidação da glicose pela via aeróbica, engloba três estágios:

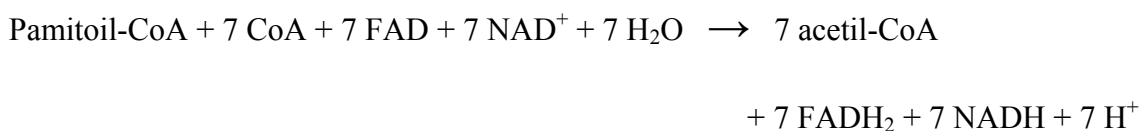
- **Glicólise:** onde uma molécula de glicose é convertida em 2 moléculas de piruvato.
Localização celular: citosol;
- **Ciclo do ácido cítrico:** onde o grupo acetila do acetil-CoA, que pode ser proveniente da oxidação do piruvato resultante da glicólise, gera 2 moléculas de CO₂, 3 NADH, 1 FADH₂ e 1 GTP. Localização celular: matriz mitocondrial;
- **Transporte de elétrons e fosforilação oxidativa:** etapa em que os elétrons das coenzimas reduzidas NADH e FADH₂ atravessam uma série de centros redox inseridos nos complexos protéicos da cadeia de transporte de elétrons e, por final reduzem a molécula de O₂, formando a molécula de H₂O. Durante a transferência de elétrons pela cadeia, prótons são translocados da matriz mitocondrial para o espaço

entre membranas, gerando o gradiente eletroquímico necessário para a produção de ATP. Localização celular: membrana interna mitocondrial e espaço entre membranas.

No caso dos ácidos graxos livres, a oxidação de um ácido graxo dentro da mitocôndria, envolve uma série de reações da rota da β -oxidação (EATON, BARLETT; POURFARZAM, 1996; DOWHAN, 1997). No caso de um ácido graxo saturado, a primeira etapa da β -oxidação, é dividida em 4 reações:

- Desidrogenação dos carbonos α e β por acil-CoA desidrogenase, reduzindo uma molécula de FADH_2 ;
- Hidratação pelo enoil-CoA hidratase da dupla ligação;
- Desidrogenação do L- β -hidroxiacil-CoA resultante da β -hidroxiacil-CoA com NAD ligado, formando NADH;
- Clivagem dependente de CoA pela tiolase do β -cetoacil-CoA resultante com a formação de acetil-CoA e um acil-CoA graxo diminuído de dois carbonos.

Os produtos gerados da oxidação de um ácido graxo do tipo palmitoil (16 carbonos), por exemplo, após essa primeira etapa, é resumida na equação seguinte:



Na segunda etapa da β -oxidação, as moléculas de acetil-CoA, FADH_2 e NADH, produzidas na primeira etapa, são oxidadas e reduzidas no ciclo do ácido cítrico, como descrito na oxidação da glicose. A reação global final para a oxidação completa do ácido palmítico graxo até CO_2 e ATP é resumido na equação a seguir:



Em ambos os casos, oxidação da glicose e ácido graxo, a oxidação das coenzimas NADH e FADH₂ envolve a transferência de seus elétrons pelos complexos I, II, III, IV, coenzima Q (CoQ ou também denominada como ubiquinona) e citocromo *c*. O Complexo I, formado por proteínas ferro-enzofre e uma molécula de mononucleotídeo de flavina, transfere os elétrons a partir do NADH para a CoQ e, a energia dos elétrons é utilizada para o bombeamento de prótons da matriz para o espaço entre membranas. O Complexo II, composto por proteínas ferro-enzofre, a enzima succinato-desidrogenase e citocromo *b*₅₆₀, transfere os elétrons vindo do FADH para a CoQ. A CoQ, reduzida complexos I e II, se difunde pela bicamada lipídica transferindo os elétrons para o Complexo III. Este, também denominado como citocromo *bc*₁ por ser formado pelos citocromos do tipo *b* e *c*₁ e um centro ferro-enzofre, reduz duas moléculas de citocromo *c* por captação de elétrons de uma molécula de CoQH₂. Essa passagem de elétrons pelo Complexo III promove a translocação de 4 prótons da matriz para o espaço entre membranas. Citocromo *c*, diferentemente de outros citocromos da cadeia respiratória, é uma proteína periférica localizada na face externa da membrana interna da mitocôndria, transferindo os elétrons vindo do citocromo *c* redutase (do Complexo III) para o citocromo *c* oxidase (do Complexo IV). O Complexo IV (também denominado citocromo *c* oxidase), composto pelos citocromos do tipo *a* e *a*₃, um átomo de cobre (Cu_B) e um centro de dois átomos de cobre (Cu_A), oxida 4 moléculas de citocromo *c* e reduz duas moléculas de O₂, formando 2 H₂O além de promover o bombeamento de prótons da matriz para o espaço entre membranas. A diferença no gradiente de prótons (H⁺), entre a matriz mitocondrial e o espaço entre membranas, decorrente do bombeamento de prótons da cadeia respiratória, gera um potencial eletroquímico, ou transmembrana, teoria quimiosmótica (MITCHELL, 1977), e é utilizado no processo de fosforilação oxidativa para síntese de ATP

(BROWN, 1992; HINKLE, et al., 1995; JUNGE, LILL, ENGLEBRECHT, 1997; TRUMPOWER, B. L. GENNIS, 1994; WIKSTROM, KRAB, SARASTE, 1981; NAVARRO, BOVERIS, 2007). A **Figura 9** mostra o bombeamento de prótons pela cadeia respiratória e o acoplamento da fosforilação oxidativa.

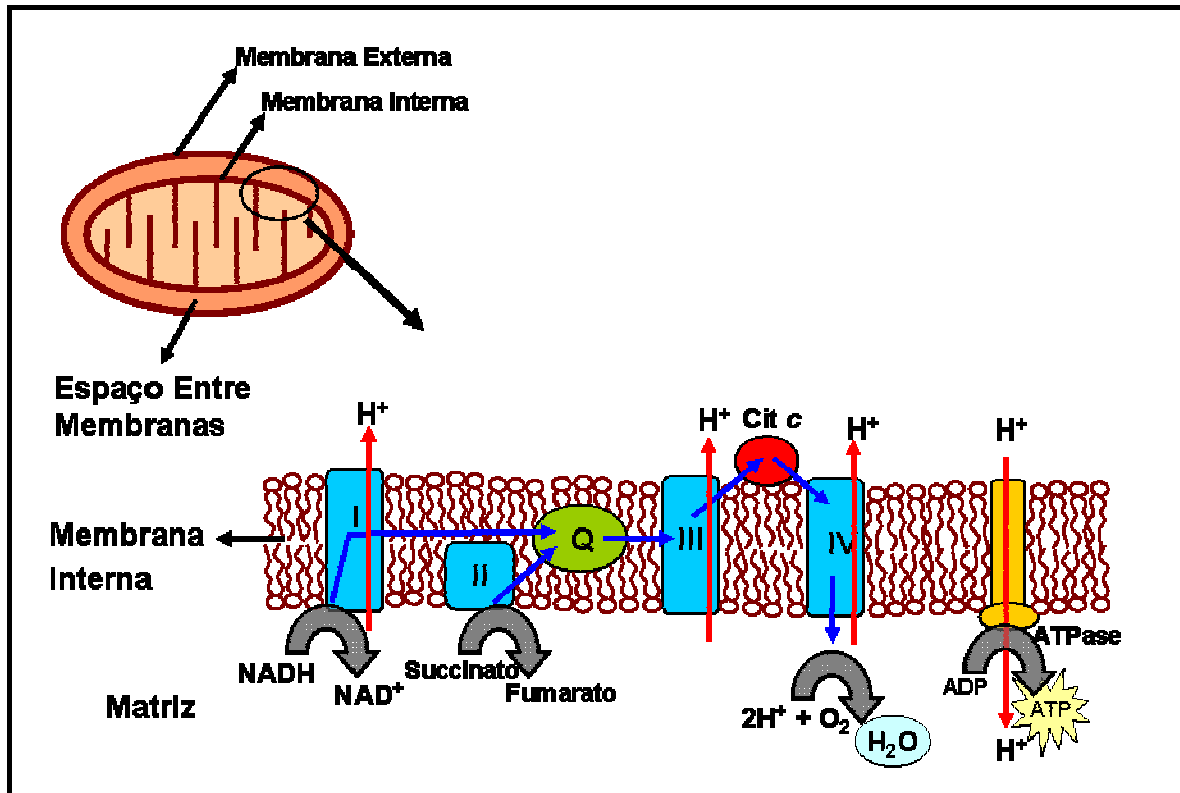


Figura 9. Componentes da cadeia transportadora de elétrons. O fluxo de prótons está representado pela seta vermelha; complexos I, III e IV, em azul; fosforilação oxidativa pela ATPase (em mostarda); o fluxo de elétrons entre os complexos está representado pela seta azul. Q representa a coenzima Q.

1.10.2. Citocromo c como mediador de apoptose

O processo de apoptose é descrito como um tipo de morte programada da célula, sendo necessário no desenvolvimento e funcionamento de órgãos e tecidos de um organismo. Em vista de sua relevância na homeostasia do organismo, a regulação molecular de apoptose

tem sido o alvo de muitos trabalhos, pois também é um dos fatores cruciais nos estudos de diversas doenças, tais como câncer, na qual células são resistentes a apoptose, e doença de Alzheimer, na qual se encontra uma desordem no processo de morte celular (MATTSON, CHAN, 2003; KIM et al., 2005).

O disparo do processo de apoptose pode ocorrer por vários estímulos celulares, como a interação de algumas citocinas (fator de necrose tumoral e FAS, por exemplo) com receptores específicos de morte celular, toxinas, estresse oxidativo, alteração no nível de cálcio celular, liberação de citocromo *c* respiratório (pela mitocôndria) para o citosol, entre outros (LIU, KIM, YANG, 1996; LI et al., 1998). A demonstração de que a cascata apoptótica envolve ativação de caspases promovida por citocromo *c* demonstra que esta proteína desempenha um papel mais amplo nas células além do transporte de elétrons na cadeia respiratória. Eventos relacionados decorrentes de estresse oxidativo celular e perda de potencial de membrana, tais como indução do poro de permeabilidade de transição por Ca^{2++} , produção de peróxido de hidrogênio e terapia fotodinâmica, são conhecidos como fatores de indução de apoptose e desligamento de citocromo *c* da membrana mitocondrial (CROMPTON, 1999; LENAIZ, 1998; DE GIORGI et al., 2002; MATROULE et al., 2001; SUGAWARA et al., 2002; KOWALTOWSKI, CASTILHO, VERCESI, 2001; KOWALTOWSKI, VERCESI, FISKUM, 2000; KOWALTOWSKI, VERCESI, 1999a; BARROS, NETTO, KOWALTOWSKI, 2003; KOWALTOWSKI et al., 1999b). A **Figura 10** resume algumas das principais vias descritas na literatura relacionadas na ativação da cascata apoptótica.

O envolvimento de citocromo *c* na ativação da cascata apoptótica é decorrente de seu desligamento da membrana interna mitocondrial e liberação para o citosol, no qual interage com o fator de ativação de protease apoptótica (APAF-1) e ativa a caspase-9 para formar o apoptossoma. Este, por sua vez, cliva e ativa outras caspases, como a caspase-3 e -7, degradando proteínas e promovendo a morte celular programada (STRASSER, O'CONNOR,

DIXIT, 2000; LIU et al., 1996). Trabalhos mais recentes descrevem que o APAF-1 encontra-se de forma inativada na célula por apresentar uma molécula de dATP ligada e que, a associação com citocromo *c* induz a hidrólise de dATP para dADP iniciando assim, o processo de formação do apoptossoma (KIM et al., 2005; YU et al., 2005).

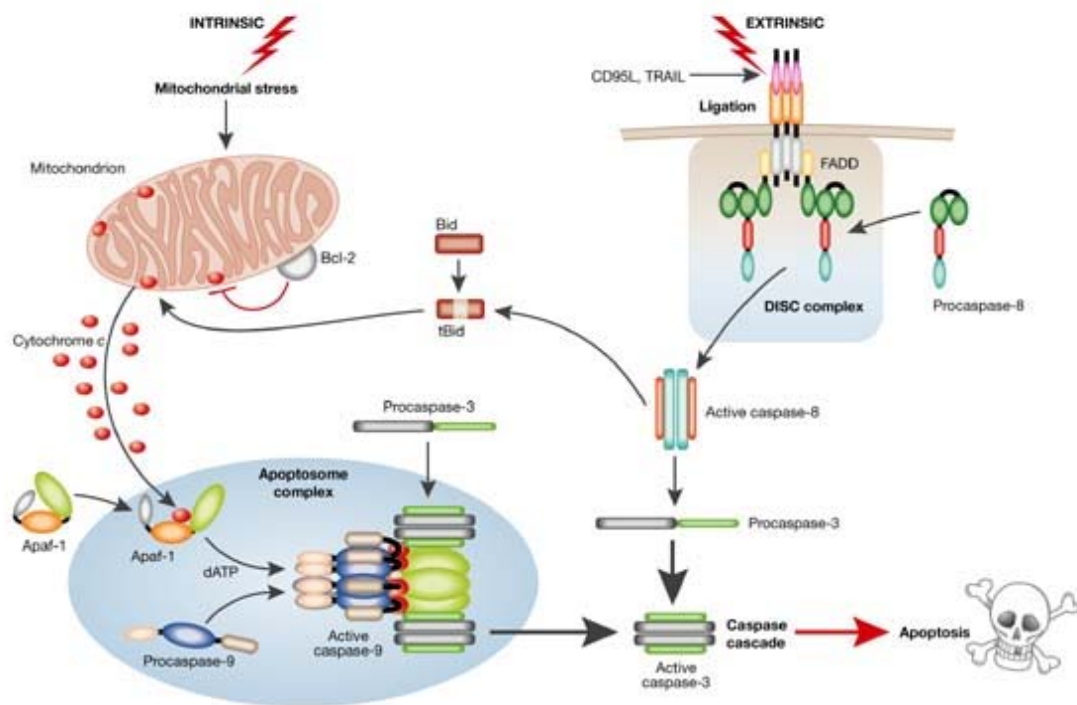


Figura 10. Vias gerais do início da cascata apoptótica por ativação de caspases. Via intrínseca (Intrinsic), induzida por stress mitocondrial que promove a liberação de cit *c* (cytochrome *c*) para o citosol, ativando a caspase-9 pelo complexo apoptossoma. Via extrínseca (Extrinsic), envolve a ativação do receptor específico de morte celular (por exemplo: FADD, Fas-associated death domain protein), ativando a caspase-8 que logo, ativa a caspase-3, resultando na morte celular (MacFARLANE, 2004).

O mecanismo de liberação de cit *c* da membrana interna mitocondrial, considerado uma etapa chave para o processo de apoptose, ainda não está claro na literatura. Trabalhos têm descrito que a liberação de cit *c* para o citosol pode envolver duas vias, Ca^{2+} -dependente ou Ca^{2+} -independente. Na primeira via, o aumento da concentração de Ca^{2+} mitocondrial promove a abertura do poro de transição de permeabilidade, resultando na perda da matriz

mitocondrial, ruptura da membrana mitocondrial externa e liberação de cit *c* (KOWALTOWSKI, VERCESI, FISKUM, 2000; MATTSON, CHAN, 2003). A segunda é regulada por proteínas da família Bcl-2 que consistem de membros proapoptóticos, que promovem a liberação de proteínas mitocondriais para o citosol, exemplos: Bid, Bax e citocromo *c*, e, membros antiapoptóticos, que pode atuar inibindo a liberação de proteína mitocondriais, como Bcl-2 e Bcl-x_L (YANG et al., 1997; KLUCK et al., 1997; OTT et al., 2002; WOLTER et al., 1997).

Boehning e colaboradores (BOEHNING et al., 2003) e Matton e Chan (MATTSON, CHAN, 2003) descrevem que uma pequena quantidade de citocromo *c* liberado da mitocôndria pode ligar ao receptor do retículo endoplasmático, denominado receptor de inositol-1,4,5-trifosfato (InsP₃) e promover a liberação de cálcio. Esse cálcio liberado promove o desligamento em massa de citocromo *c* de todas mitocôndrias da célula, iniciando assim, o processo de apoptose.

A capacidade de citocromo *c* exibir funções distintas dentro da mitocôndria e no citosol é decorrente da sua localização celular que, por ser uma proteína periférica, interage com a face externa da membrana interna da mitocôndria (NICHOLLS, 1974; DICKERSON, TIMKOVICH, 1979).

1.10.3. Atividade oxidase e peroxidase de citocromo *c*

Citocromo *c*, no estado Fe³⁺, apresenta o ferro hemínico hexacoordenado e, por isso, alegava-se que esta proteína não poderia exibir atividade peroxidase. Contudo, estudos espectroscópicos de UV-visível (acompanhando a absorbância em 695 nm) e NMR demonstraram que a sexta coordenação do átomo de ferro hemínico com enxofre da Met80,

pode ser facilmente perdida por variações de pH, força iônica e temperatura (OSHEROFF et al., 1980; WUTHRICH, AVIRAM, SCHEJTER, 1971) tornando esta proteína capaz de atuar como uma peroxidase. De fato, a atividade peroxidase/oxidase de citocromo *c* sobre aldeídos (NANTES et al., 1995; NANTES et al., 1998a), β -dicetonas (NANTES et al., 1998a), hidroperóxidos (NANTES et al., 1998b; BARR, MASON, 1995; CADENAS, BOVERIS, CHANCE, 1980; NOGUCHI, NIKI, 1995) e ácidos graxos (IWASE et al., 1996; IWASE et al., 1998; SAILER, VIAGGI, NUSSE, 1997) tem sido descrita na literatura. Citocromo *c* e outros citocromos da cadeia respiratória têm sido descritos na literatura como capazes de promover peroxidação de membranas mitocondriais quando expostas ao estresse oxidativo (RADI, TURRENS, FREEMAN, 1991; BARR, MASON, 1995). Em presença de peróxido de hidrogênio, citocromo *c* pode promover a peroxidação de fosfatidilcolina (RADI, TURRENS, FREEMAN, 1991; RADI, BUSH, FREEMAN, 1993) bem como de cardiolipina.

A capacidade de citocromo *c* de oxidar difenilacetaldéido (DPAA) induz a formação de espécies excitadas que levaram a danos oxidativos na mitocôndria, sendo detectados pela perda do potencial de membrana e inchamento mitocondrial (NANTES et al., 1995). Danos na fração lipídica de membranas, proteínas e no DNA mitocondrial foram descritas como decorrente da oxidação aeróbica de DPAA por citocromos mitocondriais (ALMEIDA et al., 1999).

A atividade peroxidase de citocromo *c* sobre DPAA e 3-metilacetoacetona (MAA) é significativamente afetada pela presença e natureza de interfaces carregadas negativamente proporcionadas por micelas e lipossomos (NANTES et al., 1998). MAA é oxidado por cit *c* somente em presença de lipossomos de dicetilfosfato (DCP), por ser um sistema mais eficiente em promover o deslocamento da sexta coordenação do ferro hemínico com a Met80, enquanto que lipossomos de DCP, PCPECL e micelas de lisofosfatidiletanolamina aceleram a oxidação de DPAA.

A reação de cit *c* sobre hidroperóxido é importante para sua atividade pró-oxidante, gerando radicais peroxil, alcoxil e alquil capazes de atuarem na propagação de danos biológicos (BARR, MASON, 1995; DAVIES, 1988) e, também para inativação do próprio cit *c*. Essa atividade também é modulada pela associação de cit *c* com membranas carregadas (NANTES et al., 2000).

1.11. Associação de citocromo *c* com membranas fosfolipídicas

A associação de citocromo *c* com a membrana interna mitocondrial é um ponto crucial na atividade da proteína, tanto como transportador de elétrons na cadeia respiratória, quanto no desencadeamento da cascata apoptótica e atividade oxidase/ peroxidase. Trabalhos descrevem que essa associação influencia ainda na estrutura da proteína (NANTES et al., 2001; ZUCCHI et al., 2003; HILDEBRAND, STOCKBURGER, 1989a; de JONGH, KRUIJFF, 1992; ZHANG, ROWE, 1994) e, pode induzir um rearranjo estrutural dos componentes lipídicos da membrana (De KRUIJFF, CULLIS, 1980b; BIRRELL, GRIFFIT, 1976; HEIMBURG, HILDEBRANDT, 1991; HEIMBURG, BILTONEN, 1994). Diante disto, muitos trabalhos têm sido direcionados para a interação de cit *c* com fosfolipídios.

A interação de cit *c* com membranas modelo, lipossomos ou vesículas lipídicas e monocamadas, carregadas negativamente, pode promover alterações conformacionais no conteúdo de α -hélice, no estado de spin do ferro hemínico e levar a perda da sexta coordenação do ferro hemínico com o resíduo Met 80 (NANTES et al., 2001; ZUCCHI et al., 2003; HILDEBRAND, STOCKBURGER, 1989; de JONGH, de KRUIJFF, 1992). Zhang e Rowe sugeriram que a interação de citocromo *c* com membranas induz perda da estabilidade estrutural da proteína e possível penetração parcial dela na bicamada lipídica, por meio de

medidas de calorimétricas, observaram a queda na temperatura de denaturação de citocromo *c*, de 82 para 50 graus Celsius, quando ligado a vesículas carregadas negativamente dioleoylphosphatidylglycerol (DOPG) em pH 7,8, (ZHANG, ROWE, 1994).

Métodos de espectroscopia por *stopped-flow*, monitorando-se a fluorescência intrínseca do triptofano 59 (de cit *c*) e absorbância da banda Soret, e medidas de dicroísmo circular (CD) foram utilizadas para investigar estrutura e a cinética de interação de cit *c* com vesículas de fosfatidilserina dioleoil (DOPS). Como resultados, observou-se uma perda da estrutura empacotada nativa de cit *c*, em presença de vesículas de DOPS, na taxa de $\sim 1,5 \text{ s}^{-1}$, que é muito mais rápido (em ordem de magnitude) do esperado na ausência de vesículas. Os autores atribuem o aceleração do desdobramento da proteína devido ao decréscimo do pH efetivo encontrado na superfície da membrana carregada negativamente, promovendo a interação eletrostática e hidrofóbica entre proteína e lipídio (PINHEIRO et al., 1997).

O desligamento de cit *c* da membrana interna mitocondrial para desencadear eventos no citosol promovendo a apoptose implica na existência de interações reversíveis entre a proteína e a bicamada lipídica. Portanto, a natureza e especificidade da interação de cit *c* com bicamadas lipídicas é o foco de vários estudos. Ambas as interações eletrostática e hidrofóbica são descritas como importantes fatores na associação de cit *c* com membranas fosfolipídicas (KIMELBERG, LEE, 1969; QUINN, DAWSON, 1969; STEINEMANN, LÄUGER, 1971; VANDERKOOI, ERECINSKA, CHANCE, 1973; TEISSIE, 1981; MUSTONEN et al., 1987; KOZARAC, DHATHATHREYAN, MIIBIUS, 1988; JORI, TAMBURRO, AZZI, 1974; VINCENT, KON, LEVIN, 1987; VINCENT, LEVIN, 1988; HILDEBRANDT, STOCKBURGER, 1989a; HILDEBRANDT, STOCKBURGER, 1989b; de JONGH, de KRUIJFF, 1990; SOUSSI et al., 1990; SPOONER, WATTS, 1992; BROWN, WÜTHRICH, 1977; HAVERSTICK, GRASER, 1989; LEE, KIM, 1989; WÜTHRICH, AVIRAM, SCHEJTER, 1971; PINHEIRO, 1994; RYTÖMAA, MUSTONEN,

KINNUNEN, 1992; RYTÖMAA, KINNUNEN, 1994; RYTÖMAA, KINNUNEN, 1995; TUOMINEN, WALLACE, KINNUNEN, 2002; GORBENKO, MOLOTKOVSKY, KINNUNEN, 2006; KALANXHI, WALLACE, 2007; PICCOTTI et al., 2004).

Rytömaa e colaboradores, utilizando vesículas fosfolipídicas modelo, mostraram a existência de dois sítios distintos na estrutura de cit *c*, denominados como sítio A e sítio C (**Figura 11A**), que são responsáveis pela associação com bicamadas lipídicas. O sítio A é um sítio de interação eletrostática, constituído de resíduos de aminoácido básicos, provavelmente Lys72 e Lys73. O sítio C é um outro sítio de interação de cit *c* com lipídio que envolve alta afinidade por fosfolipídios acídicos protonados (RYTÖMAA, MUSTONEN, KINNUNEN, 1992; RYTÖMAA, KINNUNEN, 1994; RYTÖMAA, KINNUNEN, 1995; TUOMINEN, WALLACE, KINNUNEN, 2002). Segundo Rytömaa e colaboradores, o sítio C é composto por resíduo de aminoácido invariante Asn52, em cit *c* de coração de cavalo, como o resíduo que se liga a fosfolipídios acídicos protonados via pontes de hidrogênio. Enquanto este sítio está envolvido na interação de cit *c* com o grupo fosfato da cabeça do fosfolipídio, a cauda acil do fosfolipídio, provavelmente cardiolipina (GORBENKO, MOLOTKOVSKY, KINNUNEN, 2006; PICCOTTI et al., 2004; KALANXHI, WALLACE, 2007), pode enterrar no canal hidrofóbico da proteína. Em cit *c*, este canal é formado por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, estendidos de forma linear, localizados a partir da superfície da proteína em direção a cavidade do heme, como mostra a **Figura 11 B** (RYTÖMAA, MUSTONEN, KINNUNEN, 1992; RYTÖMAA, KINNUNEN, 1995).

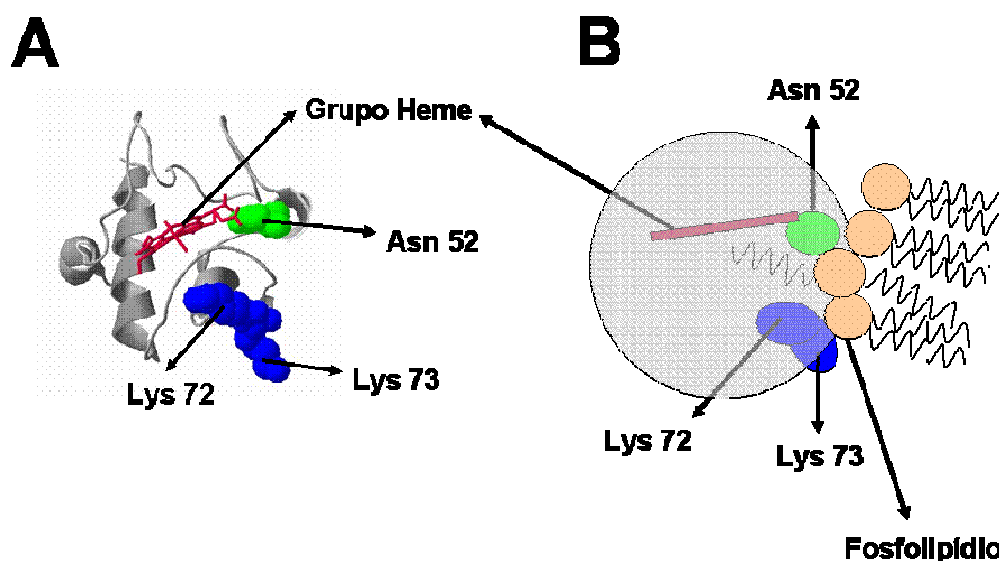


Figura 11. Posicionamento dos sítios A (Lys 72 e 73) e C (Asn 52) na estrutura de citocromo *c* (cavalo) tridimensional (A); Interação de citocromo *c* com fosfolípidios via sítio A e C e, ancoramento da proteína via interação lipídio estendida (B). A figura 11 A foi elaborada no programa Swiss-PDB Viewer utilizando dados, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=2554674>, número de identificação 1AKK. Acesso em: 03 de abril 2006.

Estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) têm apontado uma evidente correlação entre a natureza da cadeia acil do lipídio e os estados de spin de cit *c* interagindo com diferentes tipos de membranas lipídicas (ZUCCHI et al., 2003), corroborando com a proposta de interação hidrofóbica do tipo lipídio estendida, ou seja, a penetração de uma das cadeias acil do fosfolípido no interior da proteína.

Kostrzewa e colaboradores (KOSTRZEWA et al., 2000) determinaram a localização de cit *c* spin-marcado na membrana, usando agentes paramagnéticos, e foi demonstrado que esta proteína não penetra no interior da membrana, como sugerem outros grupos de pesquisa (de KRUIJFF, CULLIS, 1980a; de KRUIJFF, CULLIS, 1980b), e que a interação eletrostática ocorre no lado oposto à região onde estão situados os resíduos Lys86, Lys87 e Lys72 (KOSTRZEWA et al., 2000; SUGAWA et al., 2002). Entretanto, na superfície externa da membrana interna da mitocôndria, os agregados de aminoácidos com cadeias laterais carregados positivamente, como o sítio A, são importantes para o reconhecimento e ligação

com os cit *c* redutase e oxidase (NICHOLLS, 1974; PELLETIER, KRAUT, 1992). Assim, a caracterização dos sítios de cit *c* que interagem com a membrana e com as proteínas vizinhas da cadeia respiratória continua sendo um desafio.

1.12. Transferência de energia pela ressonância da fluorescência

A técnica de fluorescência por transferência de energia pela ressonância da fluorescência é empregada na literatura como uma forma de monitorar a interação de citocromo *c* com bicamadas lipídicas (MUSTONEN, 1987; RYTÖMAA, MUSTONEN, KINNUNEN, 1992; RYTÖMAA, KINNUNEN, 1995; DOMANOV, MOLOTKOVSKY, GORBENKO, 2005).

A eficiência da transferência de energia ressonante depende da distância entre um fluoróforo doador e o acceptor de elétrons. Essa teoria, descrita por Forster, mostra que a eficiência da transferência (*E*) é dependente do inverso da sexta potência da distância entre o doador e o acceptor (*R*):

$$\mathbf{E} = \frac{1}{\left\{ 1 + (R/R_0)^6 \right\}} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde R_0 é a distância de Forster ou distância crítica para a transferência, que depende das características do par doador/acceptor (FORSTER, 1948; STRYER, 1978).

A associação de cit *c* com membranas modelo tem sido estudada utilizando a transferência de energia pela ressonância da fluorescência entre fosfolipídios derivados, contendo o fluoróforo pireno (doador), e o grupo heme (acceptor) da estrutura de cit *c*.

O grupo pireno, ligado a um fosfolípido, exibe um espectro de emissão de fluorescência na região de 360 a 550 nm com excitação em 344 nm, apresentando dois picos característicos, um de monômero (M, com pico em 398 nm) e um de excímero (E, 475 nm), como mostra a **Figura 12**.

Quando a molécula de cit *c* interage com a membrana contendo esse tipo derivado de fosfolípido fluorescente, o grupo heme capta a energia vinda do grupo heme, resultando na supressão (*quenching*) de fluorescência. Contudo, se a interação é reversível, ocorrendo a liberação de cit *c* da membrana, pelo aumento da força iônica ou presença de nucleotídeos, há um aumento da intensidade de fluorescência (MUSTONEN et al., 1987; RYTÖMAA, MUSTONEN, KINNUNEN, 1992; RYTÖMAA, KINNUNEN, 1995; TUOMINEN et al., 2001). Devido ao pequeno tamanho de cit *c* a distância média entre o grupo heme e marcador fluorescente doador, no caso de uma cadeia pirenodecanoil, é aproximadamente de 20 Å. Essa distância permite um acoplamento eficiente dipolo-dipolo quando o citocromo *c* está associado ao lipossomo (KINNUNEN et al., 1994).

Trabalhos também tem relacionado a queda dos valores da razão de excímero/monômero, do grupo pireno, ao processo de fusão de vesículas fosfolipídicas. A razão E/M depende da taxa de colisões entre os grupos pirenos, refletindo assim, a difusão lateral e a concentração do fluoróforo na membrana (SCHENKMAN et al., 1981; CARMONA-RIBEIRO, YOSHIDA, CHAIMOVICH, 1985; MUSTONEN, KINNUNEN, 1993).

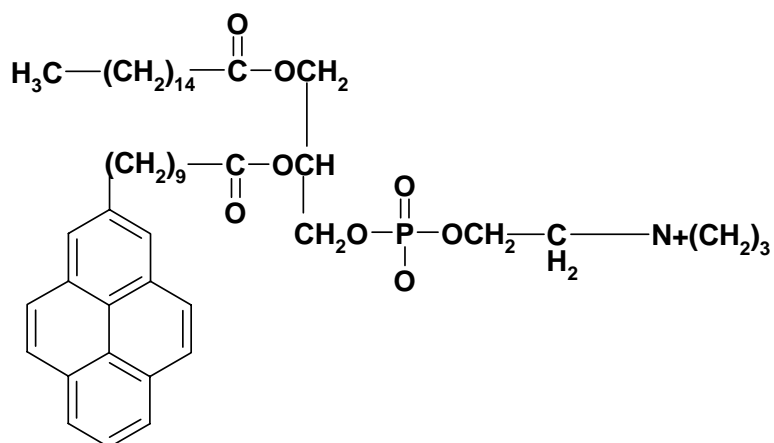
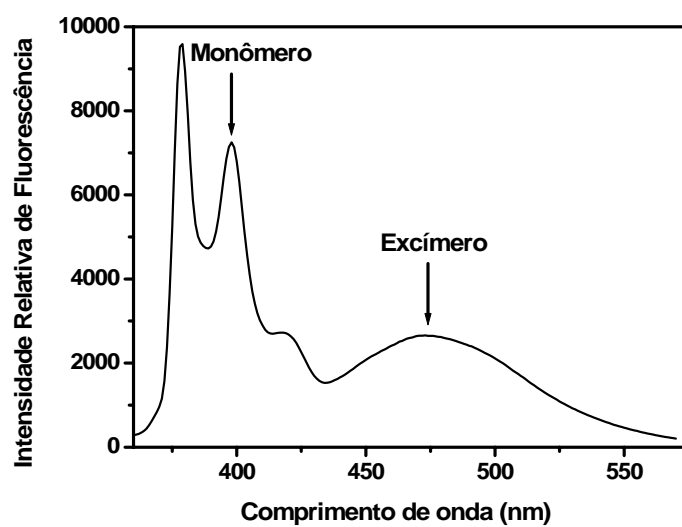
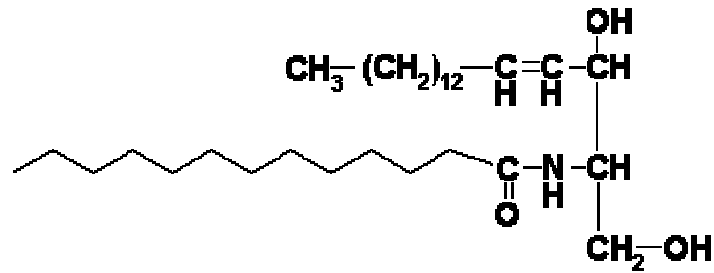


Figura 12. Espectro de fluorescência e estrutura química de PPDPC (1-palmitoyl-2-[10-(pyren-1-yl)decanoyl]-*sn*-glycerol-3-phosphocholine). Espectro obtido com excitação em 344 nm, em pH 7,4.

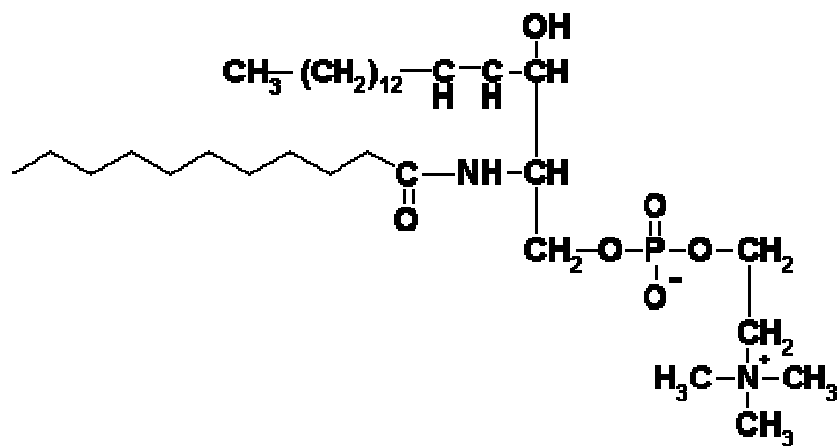
1.13. Citocromo *c* e esfingolipídios como mediadores de apoptose

A literatura tem apontado dois tipos de mecanismos para o efeito proapoptótico de ceramidas: a formação de canais na membrana mitocondrial externa e a interação com citocromo *c* na membrana mitocondrial interna.

Ceramidas são *N*-acil derivados do amino álcool esfingosina. Nesta classe de lipídios, o grupo acil ligado ao amino grupo da esfingosina é predominantemente ácido esteárico e nervônico (MORRISON, 1969). A fórmula estrutural geral das ceramidas e esfingomielina é mostrada na **Figura 13**. A esfingomielina é o principal lipídeo componente da bainha de mielina (BOYER, 1983; SVENNERHOLM et al., 1972).



Ceramida



Esfingomielina (contendo o grupo colina)

Figura 13. Estrutura geral de ceramida e esfingomielina.

De uma forma interessante, a formação de canais na membrana por ceramidas tem sido demonstrada em sistemas modelo da membrana mitocondrial externa (SISKIND, KOLESNICK, COLOMBINI, 2000; MONTES et al., 2002; SISKIND, KOLESNICK, COLOMBINI, 2002), contudo, estudos com mitocôndrias isoladas apontam para a possibilidade de que o mecanismo seja mais complexo. Assim por exemplo, Ghafourifar e colaboradores (GHAFOURIFAR et al., 1999) demonstraram que, em mitocôndrias energizadas, ceramidas não alteram o potencial de membrana mitocondrial, qualquer que seja o estado de oxidação de citocromo *c*, descartando desta forma, alterações na integridade da

membrana mitocondrial, além de afetar a redução de citocromo *c* por ascorbato. Por outro lado, Henaff e colaboradores (HENAFF et al., 2002) demonstraram a participação de Ca^{2+} na apoptose de músculo cardíaco induzida por ceramida. Neste caso, a inibição do processo por ligantes de cálcio e ciclosporina A também sugerem que a ação de ceramidas não deve se restringir a abertura de canais na membrana mitocondrial externa. Também o fato de que esfingosina 1-P poder atuar como inibidor de apoptose induzida por vários fatores, inclusive ceramidas, aponta para um possível sítio específico de ligação para ceramidas, atuando neste caso, esfingosina 1-P como um inibidor competitivo dado sua similaridade estrutural (CUVILLIER, LEVADE, 2001).

1.13.1. Mecanismo de ação das ceramidas no processo apoptótico

O papel fisiológico de ceramidas e derivados no processo apoptótico ainda permanece controverso (Van BLITTERSWIJK et al., 2003). Pode-se identificar duas correntes tentando explicar a participação de ceramidas no processo apoptótico: uma que postula ceramidas como segundo mensageiro do processo (HANNUN, 1994; BOSE et al., 1995; TESTI, 1996; KOLESNICK, KRONKE, 1998; PERRY, HANNUN, 1998; Von HAEFEN et al., 2002; KROESEN et al., 2003; Van BLITTERSWIJK et al., 2003) e outra que identifica esta categoria de compostos como moduladores da estrutura e dinâmica de membranas (Van BLITTERSWIJK et al., 2003; SISKIND, COLOMBINI, 2000; MONTES et al., 2002).

2. OBJETIVOS

Mapear os resíduos ionizáveis da estrutura de citocromo *c* envolvidos na interação eletrostática com a membrana interna mitocondrial. Estes estudos serão conduzidos em lipossomos modelo da fração lipídica de membrana mitocondrial interna e em mitoplastos previamente depletados de citocromo *c*. Estes estudos incluirão o efeito de fatores que afetam esta interação, como a presença de ceramidas.

Determinar o perfil dos valores de pK_a dos resíduos ionizáveis e seu papel biológico na estrutura de citocromo *c*.

Comparar a afinidade de interação de citocromo *c* nativo (cavalo) com membranas que mimetizam a membrana interna mitocondrial, com a afinidade de outras formas de citocromo *c*, que apresentem alteração em seus resíduos de lisinas e histidinas, uma vez que a cadeia polipeptídica de cit *c* compreende um alto teor de resíduo de aminoácido básico lisina, que é, provavelmente, responsável pela interação eletrostática com o grupo fosfato dos fosfolipídios. Entre as possíveis formas de citocromo *c* a serem estudadas, são: cit *c* quimicamente modificado, por exemplo N-acetilado e carboxilado (por DEPC), ou de outras espécies, por exemplo de atum, que apresenta os resíduos de histidina 33 e lisina 22 (presentes em cit *c* de cavalo) substituídos pelos resíduos de triptofano e asparagina respectivamente.

3. MÉTODO

3.1. MATERIAIS

- Proteínas: citocromo *c* (de coração de cavalo), citocromo *c* N-acetilado, protamina (Protamine) e albumina (bovine serum albumine) foram obtidos pela SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).
- Lipídios: fosfatidilcolina dipalmitoil (DPPC), fosfatidilcolina (de clara de ovo) fosfatidiletanolamina dipalmitoil (DPPE), fosfatidiletanolamina (de clara de ovo), cardiolipina (CL cérebro bovino) e fosfatidilglicerol distearoil (DEPG) foram obtidos pela SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) e Avanti Polar (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL). O fosfolípido marcado 2-(10-(1-pyrene)decanoyl)phosphatidylcholine (PPDPC), para medidas de fusão de vesículas, foi procedente da Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, EUA). Para análises da associação de citocromo *c* com membranas, o fosfolípido PPDPC foi procedente da K&V Bioware (Espoo, Finland).
- Reagentes: HEPES (sódio ou KOH), EDTA, EGTA, ácido ascórbico, dietilpirocarbonato (DEPC), acetonitrila e ácido trifluoracético, (ile⁷)-angiotensin III acetate salt e ACTH (fragment 18-39), MES, N-etilmaleimida, fluoreto de fenilmetilsulfonil, rotenona, succinato, antimicina A, FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone), kit reação de CAF sequencing Grade, ADP e ATP foram obtidos pela SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Sinapinic acid,

benzamidina e α -cyano-4-hydroxycinnamic acid são procedentes da Aldrich (Steinheim, Alemanha). Tripsina, *Sequencing Grade*, é procedente da Promega (Madison, WI). Membrana de diálise Spectrapor com poro de 6000 a 8000 Da procedente da Spectrum Medical Industrie (Houston, TX, EUA). Centricon da marca Millipore Corp. (MA, EUA). Papel filtro Whatman nº 50 e resina CM-32 (Carboxymethyl Cellulose) foram obtidos pela Whatman. TEMED (N,N,N',N' - tetra methylethylenediamine), acrilamida, Bis acrilamida, PSA são procedentes da Bio Rad (Hercules, CA). Membrana de policarbonato de diâmetro de poro de 100 nm, procedente da Nucleopore (Pleasanton, CA) ou Avanti Polar (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL). Kit luceferina-luciferase para medidas de dosagem de ATP (BiOrbit). Sacarose e álcool etílico P.A. são procedentes da Geo-Química (Geo-Química Produtos para Laboratório Ltda., SP, Brasil).

Todos os demais reagentes e materiais utilizados foram de melhor qualidade comercial disponível. As soluções foram preparadas utilizando água deionizada Mili-Q.

3.2. EQUIPAMENTOS

- Espectrofotômetro UV-vis fotodiodo – Modelo Multispec 1501, Shimadzu Scientific Instruments Inc., equipado com termostatizador de células (Columbia, MD, EUA). Foram utilizadas cubetas de quartzo de caminho óptico de 1 cm.
- Espectrofluorímetro – Modelo F2500, Hitachi, equipado com termostatizador de células (Tóquio, Japão).
- Espectrofluorímetro – Para medidas de fluorescência *steady-state*. Modelo LS50B, dotado de sistema de controle de temperatura (PerkinElmer Life Sciences, Massachusetts, USA).
- Espectrômetro de laser – Para medidas de fluorescência *lifetime*. Dotado de sistema termostatizador de células (Photon Technology Internacional, Ontário, Canadá).
- Quimioluminômetro – Modelo AutoLumat LB 953 (EG&G Berthold, Austrália).
- Zeta Plus – Potencial Zeta Analyzer – Modelo Zeta Plus Analyzer, Brookhaven Instruments Corp. equipado com um laser de 570 nm e espalhamento de luz dinâmico a 90° para determinar o tamanho de partículas (Hotsville, NY, EUA).
- Espectrômetro de Massa Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Time-of-Flight (ToF) – Modelo Ettan MALDI-ToF Pro, Amersham Bioscience (Bucks, UK).
- Sonicador Thronton Ultrasonic Processor – Modelo 600 W de potência, dotado com microtip, Sonics & Materials Inc. (Newtonn, C.T., EUA).
- Extruspor Liposo-Fast – Avestin (Ottawa, Canadá).
- Calorímetro – Modelo VP-Differential Scanning Calorimetry (VP-DSC, Microcal, Northampton, MA).

- Oxígrafo - Oxígrafo equipado com um eletrodo do tipo Clark (Gilson Medical Eletronics, Middleton, USA).
- Sistema sensor de SPR – Modelo Spreeta (Texas Instrument) composto por um diodo que emite luz na região do vermelho (840 nm) para excitar a superfície plasmonica formada por um filme de ouro de 50 nm de espessura.
- Agitador (Vórtex) – Modelo M16715, Thermolyne (Iown, EUA).
- Bomba peristáltica – Modelo Pump-1, Amersham Biosciences (Bucks, UK).
- Centrífuga High-Speed Micro Centrifuge – Modelo CF15R, Hitachi (Tóquio, Japão).
- Medidor de pH – Modelo pH/ion analyzer 455, Corning (NY, EUA).
- Purificador de água Mili-Q – Modelo Water System Mili-Q™ (Bedford, MA, EUA).

3.3. PROCEDIMENTOS

Para atingir os objetivos descritos, adotamos as seguintes metodologias:

- Constatar a ocorrência de instabilidade coloidal (fusão ou agregação) de vesículas de PC (fosfatidilcolina), PE (fosfatidilcolina) e CL (cardiolipina) promovida pelo citocromo *c* por meio de medidas de turbidez, espalhamento de luz e determinação do diâmetro das vesículas.
- Monitorar, por meio do aumento de turbidez em 480 nm (região que não apresenta contribuição espectral significativa de citocromo *c*), o efeito de pH na agregação ou fusão de lipossomos de PCPECL na presença de citocromo *c* Fe³⁺.
- Determinar do potencial ζ das vesículas de PCPECL na presença e na ausência de citocromo *c* para caracterizar a distribuição da proteína na superfície da vesícula.
- Estes estudos do efeito de pH serão estendidos para vesículas de PCPECL com diferentes proporções PE/CL com o objetivo de elucidar o possível papel modulador da cardiolipina na formação de fase hexagonal invertida em PE e, desta forma, verificar a interação hidrofóbica na associação de citocromo *c* com membranas.
- Uma vez identificado o efeito de pH na associação de citocromo *c* com membranas que mimetizam a membrana interna mitocondrial, será identificado o grupo ionizável envolvido e traçado o seu perfil de pK_a do grupo ionizável.

- Estudar a influência da interação eletrostática no fenômeno de fusão ou agregação de vesículas mediada por citocromo *c* comparando-se os resultados que serão obtidos com citocromo *c* nativo e citocromo *c* *N*-acetilado em resíduos de lisina, que são os principais grupos responsáveis pela interação da proteína com cargas negativas dos fosfolípidos.
- Estes estudos foram conduzidos em baixa força iônica (HEPES 10 mM) e em força iônica fisiológica (NaCl 150 mM), permitindo desta forma analisar também a influência da interação eletrostática neste fenômeno de instabilidade coloidal.
- Estes estudos acima descritos serão feitos também com citocromo *c* Fe^{2+} , para verificar o efeito do estado redox de citocromo *c* no processo de associação com membranas de PCPECL. Citocromo *c* Zinco-substituído também será utilizado para elucidar se o processo de instabilidade coloidal das vesículas de PCPECL sofre influência de possíveis reações redox do ferro hemínico com a cadeia acil dos fosfolípidos insaturados.
- A ocorrência de fusão ou agregação de vesículas de PCPECL será confirmada pelo uso vesículas marcadas com 2-(10-(1-pirenil)decanoyl)fosfatidilcolina (PPDPC) (SCHENKMAN, 1981; MUSTONEN, 1993), monitorando, por medidas de fluorescência, a razão excímero/monômero em presença de citocromo *c*.
- Será testado o processo de fusão de vesículas de PCPECL com citocromo *c* nativo em comparação com citocromo *c* modificado quimicamente por dietilpirocarbonato (DEPC). DEPC reage com grupos amino desprotonados e, portanto, em pH 7,4, pode

ser usado para reagir seletivamente com histidina ou resíduos de lisina que apresentarem o pK_a diminuído devido à proximidade com outros resíduos carregados positivamente.

- Isolamento de mitoplastos (mitocôndrias desprovidas de membrana externa) de fígado de rato depletados de citocromo *c*. Estes mitoplastos não exibem respiração (consumo de oxigênio). Contudo, a adição de citocromo *c* (0,4 nmol /mg de proteína) ao meio restaura sua capacidade de respiração. Estes experimentos serão realizados sob duas condições: i) em pH ácido (pH 6,2) e em pH alcalino (pH 7,4); ii) utilizando citocromo *c* modificado por dietilpirocarbonato (DEPC), e citocromo *c* de atum em comparação com citocromo *c* nativo. O citocromo *c* de atum apresenta um resíduo de triptofano no lugar da His33 e um resíduo de asparagina no lugar da Lys22, podendo assim ser avaliado o papel destes dois resíduos na interação de cit *c* com membrana mitocondrial.
- Testar a influência de ceramidas e derivados na associação de citocromo *c* com vesículas PCPECL na faixa de pH 7,4-6,2.
- A interação de citocromo *c* nativo com membranas de PCPECL será monitorado por medidas de marcadores fluorescentes em vesículas unilamelares. Esta etapa será realizada em colaboração com o Prof. Paavo Kinnunen da Universidade de Helsinki (Finlândia).
- A investigação do efeito de pH na interação de citocromo *c* nativo com monocamadas lipídicas será também analisada por medidas de SRP (Surface Plasmon Resonance).

- Citocromo *c* de atum, pelo fato de apresentar dois resíduos de triptofano (cavalo apresenta apenas um) nos permitirá monitorar a associação de citocromo *c* com membranas na faixa de pH 7,4-6,2. Para isso, será necessário fazer a remoção do ferro da proteína, que é o responsável pela supressão de sua fluorescência do triptofano. Essas medidas serão conduzidas por meio de fluorescência *steady state* e *lifetime*. Pelo fato deste Trp33 adicional em atum estar localizado próximo a superfície da molécula de citocromo *c*, o ambiente em volta é mais hidrofílico em comparação com o triptofano 59, encontrado próximo ao grupo heme. A natureza do ambiente em volta do resíduo de triptofano geralmente afeta a sua emissão de fluorescência (Van HOLDE, 1988; LAKOWICZ, 1999) podendo desta forma, determinar a possibilidade do resíduo de triptofano encontra-se enterrado na proção hidrofóbica da membrana.

3.3.1. Extração e purificação de citocromo *c* de músculo de atum

A extração de citocromo *c* de músculo de atum foi realizada baseada no trabalho de Brautigam e colaboradores (BRAUTIGAN, FERGUSON-MILLER, MARGOLIASH, 1978) com algumas modificações. 50 g de músculo de atum foram cortados em pequenos pedaços em solução $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18\text{H}_2\text{O}$ 0,3 % (m/v) contendo benzamidina 6,2 mM, N-etilmaleimida 5,5 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,1 mM, EDTA 5 mM (cerca de 120 ml de solução gelada) e homogeneizado em “Potter-Elvehjen” em alta velocidade por cerca de 4 min a 4°C. O pH do homogenizado foi ajustado para 4,5 com 2 N ácido acético ou 2 N de NH_2OH e mantido sob gelo por 30 min. A solução foi centrifugada por 20 min a 8000 X *g* a 4°C e o sobrenadante foi coletado e seu pH ajustado para 8,5 com 2 N de NH_2OH . Esse extrato foi

centrifugada por 20 min a 8000 X g a 4°C e filtrado em papel filtro Whatman nº 50 para diminuir a turbidez da solução. Após a filtração, a solução foi dialisada contra 2 litros de água deionizada (para cada 20 ml de solução) e a água deionizada trocada a cada 6 horas durante um processo de 12 horas. Alíquotas de 40 ml da solução dialisada foram incubadas com cerca de 8 ml de resina de troca iônica CM-celulose 32 (Carboxymethyl Cellulose - Whatman), pré-equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 8,0, por 30 minutos sob leve agitação por inversão. Essa solução foi centrifugada a 580 X g a 4°C por 5 minutos e o sobrenadante descartado. A resina precipitada, contendo citocromo *c* aderido, foi utilizada para montar uma coluna de cerca de e lavada cerca de 3 vezes o volume da coluna com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 8,0 a temperatura ambiente. Cuidadosamente, a coluna foi lavada com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 0,5 M. As frações de 1,0 ml foram recolhidas e mantidas sob gelo. As frações contendo citocromo *c* foram determinadas pelo espectro de Uv-visível no comprimento de onda de 409 nm. Em seguida, foram dialisadas contra 2 litros de água deionizada (para cada 15 ml de solução contendo citocromo *c*) e a água deionizada trocada a cada 4 horas durante um processo de 12 horas.

Após a diálise, as amostras foram liofilizadas, solubilizadas em água deionizada ou tampão HEPES 5 mM pH 7,4 contendo EDTA 0,1 mM, dosadas e conservadas em freeze.

A resina CM-celulose 32, antes de ser utilizada, foi tratada com 0,5 N HCl, numa proporção de 7 g de resina para 100 ml de ácido, sob agitação (~ 150 rpm) por 30 min. A resina foi lavada com água deionizada, cerca de 0,5 litro, e logo depois tratada com 100 ml de NaOH 0,5 N, sob agitação por 30 min. A resina foi então lavada com água deionizada, cerca de 0,5 litro, e depois tratada com 0,5 N HCl, 100 ml de ácido, sob agitação por 30 min. Após o último tratamento, ela foi lavada intensamente com água deionizada e tampão fosfato de sódio 20 mM pH 8,0 até o pH da resina estar entre 7,5 a 8,0 e incubada com o mesmo

tampão por 4 horas (Manual de procedimento de Ion-Exchange Cellulose, Carboxymethyl Cellulose-CM 32 – WHATMAN).

3.3.2. Gel de eletroforese SDS-PAGE

O gel de SDS-PAGE 12,5 % de acrilamida para análise de proteínas foi preparada utilizando-se 2,667 ml de H₂O, 2 ml de tampão *Lower Gel* (18,17 g de Tris, 0,4 g de SDS, 100 ml de H₂O deionizada, pH 8,8), 3,333 ml da solução de Acrilamida (Acrilamida 30 %, Bis Acrilamida 0,8 %), 100 µL de PSA (Amonium Persulfate) 10 %, 20 µL de TEMED–N,N,N',N' - tetra methylethylenediamine (*Bio Rad*). Como *stacking gel*, utilizou-se 1,5 ml de H₂O deionizada, 833 µL de tampão *Upper Gel* (12,12 g de Tris, 0,4 g de SDS, 100 ml de H₂O deionizada, pH 6,8), 834 µL da solução de Acrilamida (Acrilamida 30 %, Bis Acrilamida 0,8 %), 30 µL de PSA (-Amonium Persulfate) 10 %, 15 µL de TEMED. Foi aplicada uma voltagem de 30 miliA por 30 minutos na pré-corrída e 70 miliA por cerca de 2 horas sob o gel de eletroforese, utilizado tampão de corrída contendo 15 g de Tris, 70 g de Glicina (Ácido 2-aminoacético), 5 g de SDS (Sodium dodecyl sulfate) e 1 litro de H₂O deionizada. O gel foi corado pelo método de Coomassie Blue, utilizando uma solução etanol 50 % e ácido acético 10 % para fixar o gel, sob agitação por 10 minutos. Depois, o gel foi retirado da solução fixadora e lavado com uma solução metanol 50 %, ácido acético 5 %, sob agitação por 10 minutos. Retirado da solução de lavagem, o gel foi colocado em uma solução de Coomassie Blue R250, por cerca de 10 minutos, sob agitação branda. Retirado da solução de Coomassie Blue, foi então usado uma solução de descoloração (metanol 50 % , ácido acético 5 %) para revelar as bandas. O gel foi conservado em uma solução de ácido acético 5 %.

3.3.3. Preparo de citocromo *c* base livre (porfirina cit *c*)

O procedimento para preparo de citocromo *c* base livre foi realizada de acordo com Vanderkooi e Erecinska (VANDERKOOI, ERECINSKA, CHANCE, 1975) com mínimas modificações. 6 ml de ácido fluorídrico (anhydrous HF) foram adicionados a 100 mg de citocromo *c* e deixado incubado, sob agitação, por 30 minutos em sistema teflonado e fechado. A solução tornou-se púrpura, indicando que a reação ocorreu. O ácido HF foi removido e a proteína ressuspensa em 3 ml de tampão acetato de amônio 50 mM, pH 5,0. A solução de citocromo *c* base livre foi transferida para membrana de diálise com poro de 6.000-8.000 Da (Spectrapor) e dialisada por 2 horas contra 2 litros de água deionizada gelada (aproximadamente a 5° C). Os 2 litros de água são trocados e as amostras foram dialisadas por mais 2 horas. As amostras foram dosadas utilizando-se o coeficiente de absorção 160 mM^{-1} , no comprimento de onda em 404 nm, e conservadas em freeze. Durante o preparo e manuseio de cit *c*, foi evitada a exposição à luz, uma vez que essa proteína apresenta fotossensibilidade.

3.3.4. Modificação de carboxilação de cit *c* por dietilpirocarbonato (DEPC)

DEPC tem sido descrito na literatura como agente modificador específico de cadeias laterais de histina e lisina quando desprotonadas, pela reação de carboxilação (MILES, 1977; QIN et al., 2002; MCGINNITY et al., 1996). Concentrações variando de 100 a 10.000 μM de DEPC (que correspondiam a 2 μL a 10 μL de estoques de DEPC de 50 mM a 1 M, em álcool etílico P.A., sempre preparado no momento do experimento), foram adicionadas a 1 ml

de solução de cit *c* nativo 100 μM em tampão HEPES 10 mM, ou tampão triplo (ácido acético 10 mM, HEPES 10mM e hidróxido de amônio 10 mM) pH de acordo com o necessário para o experimento. Após encubar por cerca de 1 minuto no gelo, a solução foi transferida para membrana de diálise de poro de 6.000-8.000 Da e dialisada por 2 horas contra 2 litros de água Mili-Q gelado (aproximadamente de 5-8° C). Os 2 litros de água foram trocados e as amostras foram dialisadas por mais 2 horas. Então, foram transferidas para tubos *ependorfs*, a concentração de proteína é determinada, utilizando $\epsilon_{409} = 1,05 \times 10^{-5}$, e conservadas no freezer -20° C.

3.3.5. Preparo de lipossomos

Cada tipo de lipídeo foi pesado, de acordo com a proporção necessária, e dissolvidos em 2 ml de clorofórmio em um tubo Falcon. Após misturar em vórtex por cerca de 1 minuto para obter uma composição homogênea, o solvente é removido com o gás nitrogênio ou argônio, restando assim, um filme de lipídeo na parede do tubo. Este é seqüencialmente mantido sob baixa pressão de vácuo por cerca de 1 hora. O filme lipídico é hidratado com 2 ml de tampão, em pH 7,4 gelado, e misturado em vórtex.

3.3.5.1. Lipossomos preparados por sonicação

Após a hidratação do filme lipídico, a solução foi submetida a sonicação no Sonicador Thronton Ultrasonic Processor (Sonics & Materials Inc., EUA) por 10 ciclos de 1 minuto no gelo, intervalo de 30 segundos, temperatura de 40° a 80° C (dependendo do grau de fluidez da membrana) e amplitude 20 %. Então, a solução foi centrifugada a 8.000 g à 4° C por 10

minutos, para precipitar o titânio liberado pela ponteira do equipamento. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, diluído em tampão para obter a concentração de lipídeo necessária para a medida e o pH ajustado, utilizando HCl ou NaOH para acidificar ou alcalinizar, respectivamente o tampão. Para conservá-la, a solução foi mantida no gelo sob atmosfera de argônio. Depois de hidratado o filme lipídico, a solução foi utilizada no prazo de 24 horas.

3.3.5.2. Lipossomos preparados por extrusão

Para obter vesículas unilamelares (HUNTER, FRISKEN, 1998), a solução de lipídios foi extrusada com o uso do homogenizador de baixo volume Liposo-Fast (Avestin, Ottawa, Canadá). As amostras de lipídio foram sujeitas a atravessar uma membrana de policarbonato (diâmetro de poro de 100 nm, Nucleopore, Pleasanton, CA) por 13 vezes. O pH da solução de lipossomos é então ajustado de acordo com o experimento. Quando foi utilizado lipídio contendo marcador fluorescente, como o PPDPC, foi evitado a exposição dos lipídios à luz durante o procedimento descrito acima. A solução de lipídio foi então diluída para a concentração apropriada para cada experimento. Para conservá-la, a solução foi mantida no gelo sob atmosfera de argônio. Depois de hidratado o filme lipídico, a solução foi utilizada no prazo de 24 horas.

3.3.6. Obtenção de mitoplastos

3.3.6.1. Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato

Fígado de rato, removido de animais sacrificados por deslocamento cervical, foi cortado em pequenos pedaços em tampão de homogeneização HEPES-KOH 10 mM pH 7,4 contendo sacarose 250 mM, EGTA 1 mM à 4° C, em volume de aproximadamente 30 ml. Os pedaços foram lavados no mesmo tampão e homogeneizado em “Potter-Elvehjen” (1 ciclo com 3 passagens do pistilo com rotação de 2.400 rpm, potência de 450 watts). A suspensão foi centrifugada a 580 g por 5 minutos à 4°C, coletou-se o sobrenadante, que é centrifugado novamente a 10.300 g por 10 minutos à 4°C. O pellet resultante foi ressuspensionado em 10 ml de tampão HEPES-KOH 10 mM pH 7,4 contendo sacarose 250 mM, EGTA 0,3 mM e centrifugado a 3.400 g por 15 minutos à 4° C. O pellet final, contendo as mitocôndrias isoladas, foi ressuspensionado com 0,5 ml de tampão HEPES-KOH 10 mM pH 7,4 contendo sacarose 250 mM à 4° C.

3.3.6.2. Dosagem de proteína mitocondrial

A concentração de mitocôndrias foi baseada na concentração de proteína presente, que foi determinada pelo método de Biureto: 10 µl da amostra de mitocôndria foi adicionada em 100 µl de ácido deoxicólico 5 % (m/v) e 1.390 µl de água deionizada. Após agitação em vórtex, foi adicionado 1,5 ml de solução reativo de Biureto, sulfato cúprico 0,15 % (m/v), tartarato de sódio e potássio 0,6 % (m/v) e NaOH 0,75 M. O padrão foi obtido utilizando 50 µl de BSA (bovine serum albumin) 1 % (m/v) adicionado em 100 µl de ácido deoxicólico 5 % (m/v) e 1.350 µl de água deionizada. Após agitação em vórtex, foi adicionado 1,5 ml de solução reativo de Biureto. A absorbância em 540 nm do padrão (A_{BSA}) e a amostra ($A_{amostra}$) foram medidas contra uma linha de base contendo o ácido deoxicólico, água deionizada e solução de reativo de Biureto (CAIN, SKILLETER, 1987; CHANCE, WILLIANS, 1956). O cálculo pode ser resumido pela seguinte equação:

$$\frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{BSA}}} = Y \times 50 = \text{concentração de proteína (mg/ml)} \quad (\text{Eq. 2})$$

3.3.6.3. Preparo de mitoplastos

Mitocôndrias de fígado de rato depletadas da membrana externa e citocromo *c* (mitoplastos) foram preparados conforme descrito pelo Radi e colaboradores (RADI, BUSH, FREEMAN, 1993; PEDERSEN et al., 1978). Mitoplastos foram obtidos por tratamento hipotônico. Mitocôndrias isoladas foram ressuspensas em 30 ml de tampão HEPES 2 mM pH 7,4 contendo KCl 10 mM na concentração de 2 mg/ml de proteína e incubada à 4° C por 30 minutos. Após centrifugação a 12.000 g por 10 minutos à 4° C, o pellet foi ressuspendido em 20 ml de tampão HEPES 2 mM pH 7,4 contendo KCl 150 mM, para depletar os mitoplastos de citocromo *c*, pelo aumento da força iônica do meio. Após centrifugação a 12.000 g por 10 minutos à 4° C, o pellet foi novamente ressuspendido em 10 ml de um tampão de isolamento HEPES-K₂ 10 mM pH 7,4 contendo sacarose 0,3 M, EGTA 1 mM, e albumina de soro bovino (BSA) 0,1 % (m/v). A suspensão foi centrifugada a 12.000 g para completar a remoção da membrana externa. O pellet final foi então ressuspendido em 300 µl de tampão de isolamento. A remoção de citocromo *c* foi confirmada pela restauração do consumo de oxigênio do estado 2, aos valores do controle, pela adição de 0,4 nmol citocromo *c*/ mg proteína aos mitoplastos depletados de citocromo *c*.

3.3.7. Medidas de consumo de oxigênio

Mitocôndrias ou mitoplastos (2 mg proteína) foram incubados em 1,6 ml de tampão HEPES-KOH 10 mM, pH na faixa 7,4 a 6,0 (conforme a necessidade do experimento) contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, EGTA 0,5 mM a 30° C, em presença de substrato respiratório de succinato de potássio 5 mM, rotenona 2,5 μM e, na presença de cit *c*, na faixa de 0,01–0,5 nmol/mg proteína. A respiração de mitocôndrias e mitoplastos foi monitorada polarograficamente, por um oxígrafo equipado com um eletrodo do tipo Clark (Gilson Medical Eletronics, Middleton, USA) acompanhado de termostatizador de células. A taxa de consumo de oxigênio foi medida diretamente no oxígrafo por unidades de tempo. Os parâmetros de cinética de interação de cit *c* com mitoplastos foram determinados usando um sistema de software de regressão não-linear (Grafit v.3.0, Erithacus Software Ltd). Os dados da taxa de respiração em função da concentração de cit *c* foram analisados utilizando a **Eq. 3** que prevê duas formas de interação de cit *c* com membrana de mitoplastos,

$$v = \frac{V_{\max 1}[cytc]}{Ks_{app1} + [cytc]} + \frac{V_{\max 2}[cytc]}{Ks_{app2} + [cytc]} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde, *v* é a taxa de consumo de oxigênio, [cyt *c*] é a concentração de cit *c*, $V_{\max 1}$ é a taxa máxima de consumo de oxigênio de maneira dependente de pH, $V_{\max 2}$ é a taxa máxima de consume de oxigênio de maneira independente de pH, Ks_{app1} é a constante macroscópica de dissociação de cit *c* pelos mitoplastos de maneira dependente de pH e Ks_{app2} é a constante macroscópica de dissociação de cit *c* pelos mitoplastos de maneira independente de pH.

Os dados da influência de pH sobre $1/Ks_{app}$ foram analisados utilizando a **Eq. 4**,

$$\frac{1}{Ks_{app}} = \frac{lim_1 + lim_2 \times 10^{(pH-pKa)}}{10^{(pH-pKa)} + 1} \quad \text{(Eq. 4)}$$

onde, lim_1 representa o limite de $1/Ks_{app}$ em baixos valores de pH, e lim_2 representa o limite de $1/Ks_{app}$ em altos valores de pH.

3.3.8. Dosagem de ATP

A dosagem de ATP produzido pelos mitoplastos e mitocôndrias foi realizado no quimioluminômetro EG&G Berthold AutoLumat LB 953 (Germany) por meio da quimioluminescência utilizando o kit luceferina-luciferase (ATP Monitoring Reagent kit, BiOrbit). As amostras de mitocôndrias ou mitoplastos (1 ml) foram tratadas com 334 µl de HClO₄ 2 M (concentração final 0,5 M), a 4°C. Centrifugadas a 2.000 g por 10 minutos, a 4°C, 100 µl do sobrenadante foram retiradas e neutralizadas com 70 µl de KOH 2 M e acrescida de 0,83 ml de tampão Tris-HCL 100 mM pH 7,75 contendo EDTA 2 mM. Foram usadas soluções de ATP, variando a concentração final de 10⁻³ a 10⁻⁹ mM, como padrões.

3.3.9. Medidas de absorbância UV-Visível

As medidas de aumento de turbidez promovido pela interação de cit *c* com lipossomos foram registrados em um espectrofotômetro fotodiodo Shimadzu Modelo 1501 MultiSpec (Shimadzu Scientific Instruments Inc., Columbia, MD). A resolução espectral foi de 0,5 nm e

as cinéticas foram realizadas com intervalo de leitura de 8 segundo. Foi utilizada cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm para todas as medidas utilizando a concentração de cit *c* inferior a 10 μM.

A linha base foi feita somente com a solução de lipossomos em tampão. A leitura da cinética foi acionada e após 8 segundos, adicionou-se a proteína com uma pipeta automática, e concomitante homogeneização (com acompanhamento em 480 nm, região de menor contribuição espectral da proteína).

3.3.9.1. Determinação de valores de pK_a

Os valores de pK_a de grupos prototrópicos influenciados pela fusão de vesículas foram determinadas pelas medidas de aumento de turbidez dependentes de pH. Os dados de aumento de turbidez (Δ turbidez em 480 nm) em função de pH foram analisados de acordo com a Eq. 5, utilizando o programa *Grafit*.

$$\Delta turbidez = \frac{\lim_1 \cdot 10^{(pH-pK_a)}}{10^{(pH-pK_a)} + 1} \quad (\text{Eq. 5})$$

3.3.10. Medidas de fluorescência

3.3.10.1. Medidas de fluorescência em estado estacionário (*steady-state*)

As medidas foram conduzidas pelo espectrofluorímetro PerkinElmer Life Sciences LS50B, dotado de sistema de controle de temperatura, usando cubetas de quartzo de caminho óptico de 1 cm. As medidas para análise da ligação e desligamento de citocromo *c* em membranas foram monitoradas pela supressão de fluorescência de grupos fluorescentes ligado ao fosfolípídeo (no caso, foi utilizado o fosfolípídeo 1-palmitoyl-2-[10-(pyren-1-yl)decanoyl]-*sn*-glycerol-3-phosphocholine - PPDPC) devido à transferência de energia ressonante entre o marcador e o grupo heme do citocromo *c*. Os experimentos foram realizados utilizando como parâmetros, o comprimento de onda de excitação em 344 nm e a supressão de fluorescência do marcador pireno foi acompanhada pela emissão em 398 nm, a 30°C, fenda de excitação 5 nm e fenda de emissão 5 nm. As medidas para análise da interação de citocromo *c* base livre com membranas foram realizadas utilizando como parâmetros, o comprimento de onda de excitação em 500 nm e o espectro de emissão obtido de 570 a 680 nm, a 30°C, fenda de excitação 10 nm e fenda de emissão 5 nm.

3.3.10.2. Medidas de tempo de vida de fluorescência (*lifetime*)

As medidas foram conduzidas pelo espectrômetro de laser (Photon Technology Internacional, Ontário, Canada). Um conjunto de 500-ps pulsos numa repetição de taxa de 10 Hz foi gerado pelo laser de nitrogênio, bombeando o corante (rhodamine 6G, Merck, em solução metanol 5 mM). 2 ml de amostras foram agitadas por barra magnética em cubetas de quartz e termostatizada a 30°C. As funções de resposta do instrumento foram medidas separadamente usando uma solução aquosa de propileno glicol, acompanhando no comprimento de onda de excitação e emissão em 292 nm e 340 nm respectivamente, fenda de excitação e emissão 15 nm.

3.3.10.3. Determinação de fusão de lipossomos contendo lipídio marcado PPDPC

Para determinar de fusão de lipossomos, 2 ml de solução de vesículas PCPPDPCPECL 50 μM – proporção 43/7/30/20 mol % - em tampão HEPES 10 mM pH 6,2, foram adicionados a 20 ml de solução de vesículas de PCPECL 50 μM - 50/30/20 mol % - em tampão HEPES 10 mM pH 6,2, ambas preparadas por sonicação. A razão de vesículas marcadas/não marcadas é 1/10. Para conservá-la, a solução é mantida no gelo sob atmosfera de argônio. Depois de hidratado o filme lipídico, a solução foi utilizada no prazo de 24 horas. As medidas foram conduzidas no espectrofluorímetro Hitachi, modelo F2500 (Tóquio, Japão), dotado de sistema de controle de temperatura, usando cubetas de quartzo de caminho óptico de 1 cm. Foram utilizadas, como parâmetros, o comprimento de onda de excitação em 344 nm, emissão 394, fenda de excitação 5 nm e fenda de emissão 5 nm a 30°C.

3.3.11. Medidas de determinação do diâmetro médio e do potencial zeta das vesículas de PCECL

O tamanho médio do diâmetro e seu potencial zeta (ζ) de vesículas PCPECL, na ausência e presença de cit *c*, foram determinados por meio de espalhamento de luz dinâmico e microeletroforese de laser-Doppler, respectivamente, utilizando o Zeta Plus-Zeta Potencial Analyzer (Brookhaven Instruments Corp., Holsville, NY), equipado com um laser de 570 nm e espalhamento de luz dinâmico de 90°, para medidas de tamanho de partícula. Os valores de tamanho e o potencial Zeta (ζ) das vesículas foram calculados a partir de 10 medidas

independentes com desvio médio menor que 5 %. O potencial Zeta (ζ) foi determinado a partir da mobilidade microeletroforética em água pura pela equação de Smoluchowski:

$$\zeta = \mu\eta/\varepsilon \quad (\text{Eq. 6})$$

onde η é a viscosidade do meio, μ é a mobilidade eletroforética e o ε é a constante dielétrica do meio.

As medidas foram feitas a 25° C, e as amostras de lipossomos na ausência e presença de cit *c* preparadas previamente no dia anterior à leitura e, incubadas overnight sob atmosfera de argônio a 15° C. A concentração final de lipídio foi de 0,25 mM, para medidas de tamanho médio do diâmetro das vesículas, e 1,0 mM, para análises de potencial Zeta, em 5 mM de tampão HEPES.

3.3.12. Espectrometria de massa por MALDI-ToF (*Mass-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*)

Os espectros de massa foram obtidos pelo Ettan MALDI-ToF Pro, que poderia ser operado no modo linear ou “*reflecton*”, usando de modo *reflecton* harmônico, aumenta-se a resolução do espectro. A voltagem foi previamente ajustada em 20 kV.

As amostras de citocromo *c* (nativo ou carboxilado por DEPC, de 50 a 100 μ M) foram misturadas em solução saturada (10 mg/ml) de *sinapinic acid* (SA) em acetonitrila (ACN) 50 % e ácido trifluoracético (TFA) 0,5 %, em várias proporções proteína: matriz (1:1; 1:5; 1:10; e 1:20), e aproximadamente 0,5 μ L dessa mistura foi aplicada sobre a placa de aço inox do equipamento. Os dados foram analisados usando o software Ettan MALDI-ToF Pro.

A digestão triptica de citocromo *c*, nativo ou carboxilado, foi feita por meio da incubação de 18.000 ng da proteína com 200 ng de tripsina (*Sequence Grade* - Promega), mantendo-se a relação tripsina/proteína de 1: 90 (ng/ng), em tampão bicarbonato de amônio 20 mM pH 7,8, por 15 horas a 37°C.

A reação de digestão foi parada adicionando-se 30 µl de solução ACN 50 % e TFA 0,5 % e, essa amostra foi então liofilizada e solubilizada em 10 µl de água deionizada.

A solução contendo os peptídios foi misturada com uma solução de 5 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid em acetonitrila 50 %, trietilamina 0,025 % (v/v), em várias proporções proteína: matriz (1:1; 1:5; 1:10; e 1:20) e aproximadamente 0,5 µL da solução foi aplicada sobre os slides de aço inox para análise no MALDI. A calibração no modo reflectron, foi conduzida usando (ile⁷)-angiotensin III acetate salt e ACTH (fragment 18-39). Os dados foram analisados pelo software Ettan MALDI-ToF Pro.

O sequenciamento de fragmentos peptídicos de citocromo *c*, quimicamente modificado com DEPC, para identificação dos resíduos de aminoácidos carboxilados foi realizado pela reação de CAF (Chemically assisted fragmentation) usando o kit de sequenciamento Ettan™ CAF™ MALDI (Amersham Biosciences). Esse método visa introduzir uma carga negativa no peptídeo via um grupo ácido sulfônico que, de modo eficaz, modifica a região n-terminal do peptídeo criando uma única série de íons carregados ao dobro. Melhorando assim a resolução do espectro PSD (*post-source decay*) resultante simplificando a interpretação da única série de íons presente e estes dados podem ser então interpretados pelo programa Ettan para prever a seqüência da proteína.

O preparo da amostra para a análise de sequenciamento seguiu o protocolo descrito no manual Ettan CAF MALDI Sequencing Kit. Após a liofilização da amostra de cit *c* digerida por tripsina, alíquota de 5 µl solubilizada em TFA 0,1 % atravessou cerca de 5 vezes em µZT (ponteira contendo a resina C₁₈ Zip Tip, Millipore Corp.), pré-lavada com ACN 50 %, TFA

0,5 % e pré-equilibrada com TFA 0,1 % cerca de 5 vezes. A μ ZT, contendo os fragmentos peptídicos de cit *c* foi lavada com 10 μ l da solução de modificador de lisina e mantida esta mesma solução por overnight. Após a incubação, a solução de modificador de lisina foi descartada, a μ ZT lavada com água deionizada e então foi lavada com uma solução de reagente de CAF cerca de 10 vezes e depois incubada por 3 minutos com essa solução. A μ ZT foi lavada com a mesma solução contendo 1 μ l da solução de parada, depois lavada com solução TFA 0,1 % e a amostra foi eluída em ACN 80 %, TFA 0,5 %. A amostra foi liofilizada e solubilizada em 10 μ l de água deionizada. A solução contendo os peptídeos foi misturada com uma solução de 5 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid em acetonitrila 50 %, TFA 0,5 %.

3.3.13. Medidas de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR – *Surface Plasmon Resonance*)

O instrumento conta com um módulo central constituído de uma cela de SPR adquirida da Texas Instrument, que possui um diodo como fonte de excitação em 840 nm para excitar uma superfície de ouro de espessura ~ 50 nm. O sistema está acoplado com um software de controle e aquisição de dados. As soluções e amostras foram injetadas por uma bomba peristáltica (modelo Tris, Isco) usando um fluxo aproximado de $2,7 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$.

3.3.13.1 Preparo da monocamada lipídica

A superfície de ouro foi lavada com ácido nítrico concentrado (por cerca de 30 segundos) e enxaguado com água MiliQ. Então incubada overnight com solução de tiol (0,0077 gramas Octadodecanotiol - SIGMA + 9 ml etanol PA, concentração final de 2,5 mM). Após encubação, a superfície foi lavada com etanol PA (cerca de 70 ml), água MiliQ (cerca de 120 ml) e o tampão necessário para o experimento.

Por último, a superfície foi incubada com a solução de lipossomos (concentração final de 2 mM, pH 7,4 em presença de NaCl 150 mM) por cerca de 2 horas. Depois, lavada com o mesmo tampão sem NaCl.

Nessas medidas de SPR, um sensor de SPR consiste de um substrato óptico transparente coberto por um fino filme de ouro. Frequentemente, o metal (ouro, no caso) é coberto com algo a mais o qual irá interagir com a partícula a ser estudada, como por exemplo, o dodecanotiol. A luz que atravessa o substrato e reflete na interface entre o substrato e o meio a ser analisado gera um ângulo incidente ou faixa de intensidade de luz refletida especularmente. Para certos comprimentos de onda e ângulos de incidência, parte da energia incidente vai gerar uma onda plasmônica de superfície que irá atravessar ao longo da interface entre a camada de ouro e a solução a ser analisada (**Figura 14**). A perda dessa energia é observada como uma leve atenuação da refletividade, conhecida como efeito de ressonância plasmônica de superfície. Os ângulos e comprimentos de onda em que isto ocorre variam extremamente e sensivelmente com o índice de refração (RI), ou também denominado de constante de complexo dielétrico do meio em contato com a superfície de metal do sensor de SPR (JUNG et al., 1998).

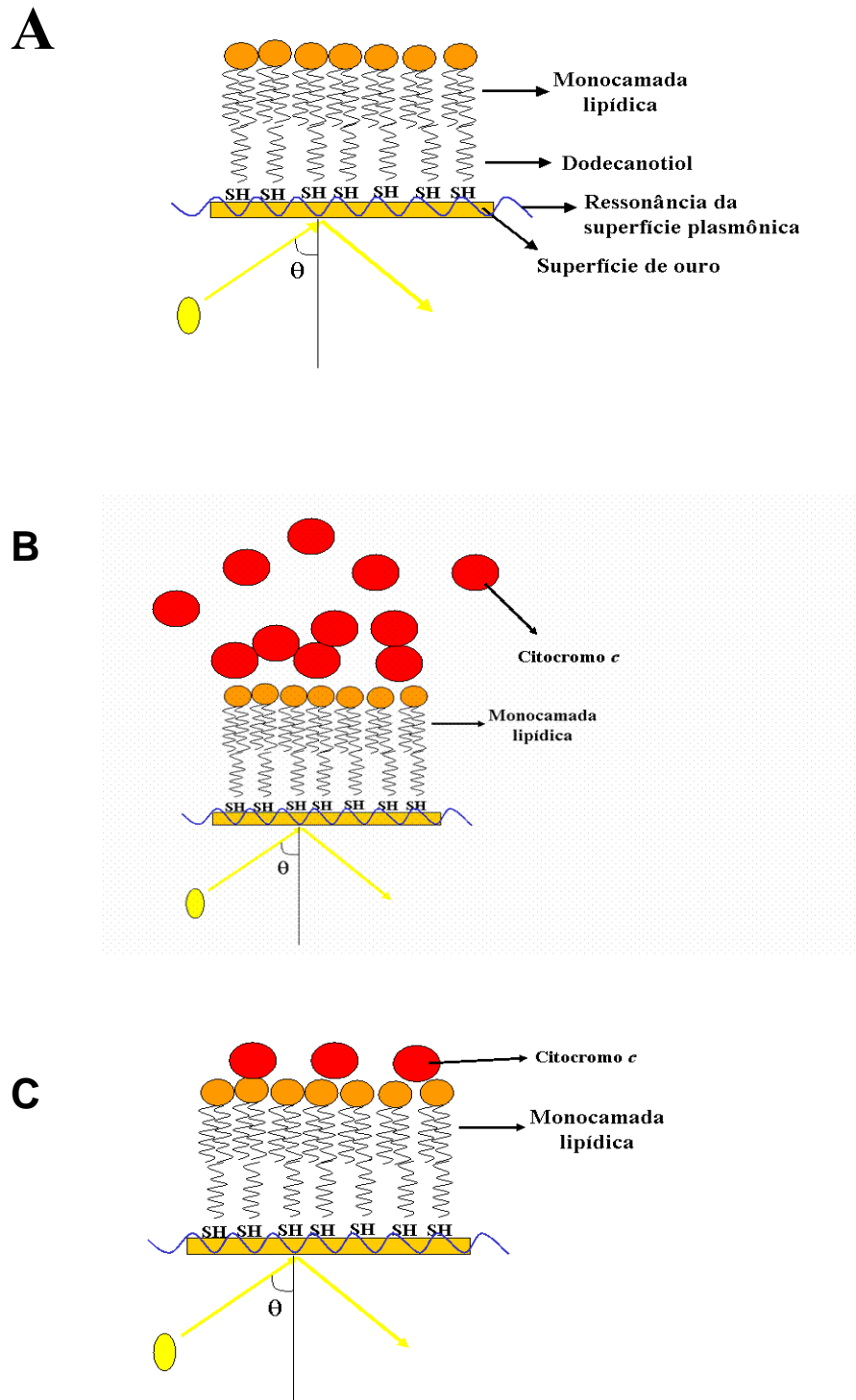


Figura 14. Diagrama esquemático do funcionamento da interface de um espectrômetro de SPR. (A) Superfície de ouro do sensor coberta por uma monocamada de dodecanotiol e uma de fosfolípideo. A luz incide nesta superfície formando um ângulo de mínima reflectividade (θ) e parte da energia forma a ressonância plasmônica de superfície. **(B)** Após a injeção de citocromo. **(C)** Após lavagem com tampão.

As **figuras 14 e 15** ilustram o funcionamento de um sensor de SPR, a interação de citocromo *c* com a monocamada lipídica quando a amostra é injetada (**Figura 14 B**), lavagem dessa superfície com tampão (**Figura 14 C**) e lavagem com tampão de alta força iônica (**Figura 15**).

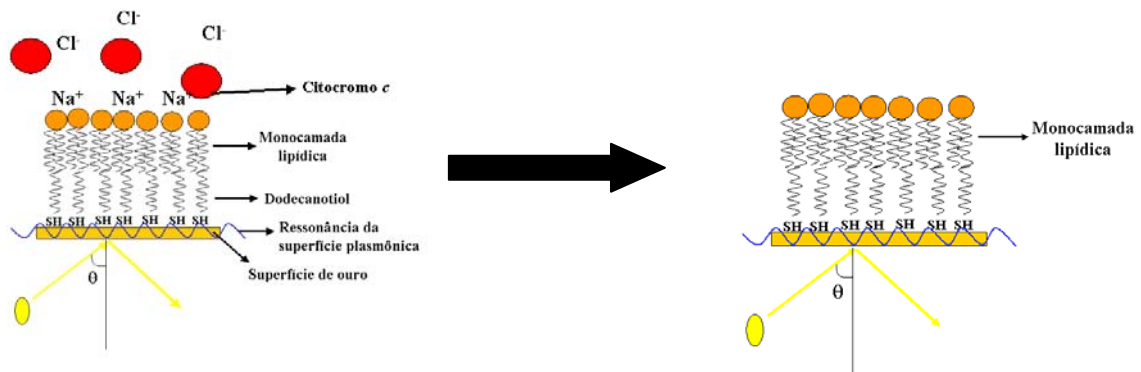


Figura 15. Esquema demonstrando a lavagem da superfície contendo a monocamada lipídica para remoção de citocromo *c* por meio da alta força iônica.

3.3.14. Medidas de *Differential Scanning Calorimetry* (DSC)

As medidas de DSC foram efetuadas no VP-Differential Scanning Calorimetry (VP-DSC, Microcal, Northampton, MA). Concentração final de proteína foi de 100 μM e lipídio total 13,32 mM, preparados pelo extrusor com membrana de poro de 100 nm (razão lipídio/proteína = 133,2). Antes de iniciar as medidas, as amostras foram deaeradas, com a encubação em baixa pressão sob agitação, por cerca de 30 minutos a 25°C, em ordem para evitar a formação de bolhas de ar durante as medidas.

4. RESULTADOS

A caracterização de um novo sítio na estrutura de citocromo *c* para interação com membrana mitocondrial interna foi feita por meio de estudos com sistemas modelo de membrana, vesículas PCPECL, e por meio de mitoplastos depletados de citocromo *c*.

4.1. Sistemas modelo: vesículas de PCPECL E PCPEPG

4.1.1. Efeito de pH na instabilidade coloidal de vesículas fosfatidilcolina/ fosfatidiletanolamina/ cardiolipina (PCPECL) e fosfatidilcolina/ fosfatidiletanolamina/ fosfatidilglicerol (PCPEPG) promovido pelo citocromo *c*

O efeito de pH na interação de citocromo *c* com vesículas que mimetizam a membrana interna da mitocôndria (PCPECL) foi monitorado por espectroscopia de UV-visível, espectrofluorimetria e espalhamento de luz.

A **Figura 16** mostra o aumento de turbidez, em função de pH, promovido pela interação de citocromo *c* nativo (Fe^{3+}) com vesículas de PCPECL, na proporção 50: 30: 20 mol %. O aumento de turbidez foi acompanhado em 480 nm, por ser um comprimento de onda que não apresenta contribuição espectral significativa da proteína, permitindo assim analisar somente a turbidez do meio na faixa de pH de 7,4 a 6,2. A faixa de pH para estudo (7,4 - 6,2) foi escolhida por corresponder àquela normalmente encontrada no espaço entre membranas em diferentes condições, tais como respiração (estado acoplado da mitocôndria) ou, na presença de inibidores da cadeia respiratória ou agentes desacopladores de mitocôndria

(NICHOLLS, FEGUSON, 1992; ERNSTER, 1992). Como controle, foi observado o aumento de turbidez em função de pH das vesículas PCPECL e PCPEPG, na ausência de proteína, na faixa de pH de 2,5 a 8,0 (**Figura 17**).

Na **Figura 17**, a análise da curva de turbidez em função de pH, na presença de cit *c*, revela duas fases de transição dependentes de pH. A primeira ocorre por volta de pH 3,0, o que indica que a estrutura do cit *c* nativo é crucial para a indução de fusão de vesículas, pois abaixo desse pH ocorre a desnaturação da proteína (MYER, SATURNO, 1990; ELÖVE, RODER, BHUYAN, 1994), ocorrendo a perda da sexta coordenação do ferro hemíco com a Met80, abertura do espaço que envolve o grupo heme. A segunda transição ocorre em pH $6,95 \pm 0,08$ em presença de vesículas de PCPECL e, pH $7,19 \pm 0,01$ para vesículas de PCPEPG. Os valores de pK_a foram obtidos por ajuste de regressão não linear pela (**Eq. 5**, no item Métodos) dos dados de turbidez na faixa de pH 6,0 a 8,0.

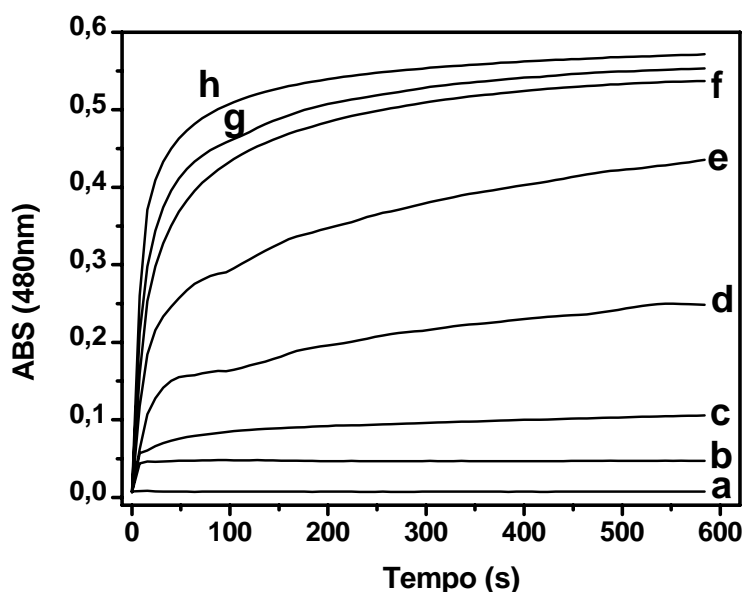


Figura 16. Efeito do pH na fusão de lipossomos PCPECL na presença de citocromo *c* Fe^{3+} monitorado pelo espectrofotômetro UV-vis. Experimentos feitos nas seguintes condições: HEPES 10 mM, 30° C, cit *c* 4 μ M, lipossomos de PCPECL 0,25 mM, na proporção 50/30/20 mol %. (a) lipossomos na ausência de cit *c* em pH 6,2 e na presença em pH 7,4 (b); 7,2 (c); 7,0 (d); 6,8 (e); 6,6 (f); 6,4 (g) e 6,2 (h).

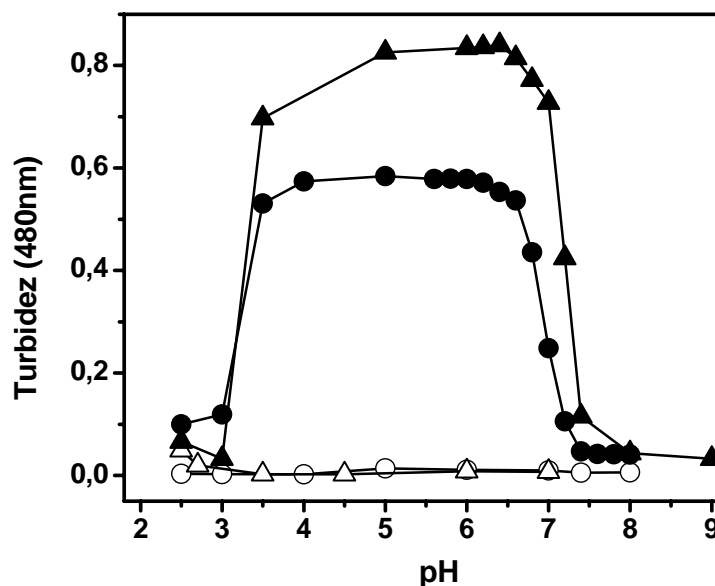


Figura 17. Efeito do pH na fusão de lipossomos PCPECL e PCPEPG na presença e ausência de citocromo *c*, monitorado pelo espectrofotômetro UV-vis. Experimentos feitos nas seguintes condições: HEPES 10 mM, 30° C, cit *c* 4 μ M, lipossomos de PCPEPG ou PCPECL 0,25 mM, na proporção 50/30/20 mol %. Lipossomos PCPECL (círculos abertos) e PCPEPG (triângulos abertos) na ausência de proteína. Lipossomos PCPECL (círculos fechados) e PCPEPG (triângulos fechados) na presença de cit *c*, após 582 segundos.

O aumento de turbidez em função de pH promovida por cit *c* decorre do aumento de tamanho das vesículas. A **Tabela 6** compara o diâmetro das vesículas de PCPECL na presença e na ausência de cit *c* obtido por espectroscopia de espalhamento de luz. O decréscimo de pH, na ausência da proteína, leva a uma pequena mudança no diâmetro das vesículas (de 61 nm para 76 nm), entretanto, na presença de cit *c*, o decréscimo de pH leva a um aumento drástico no tamanho do diâmetro das vesículas (de 54 nm para 1030 nm).

Tabela 6. Efeito de pH no tamanho de lipossomos de PCPECL na presença e ausência de citocromo *c* monitorado pelo Zeta Plus

Condições experimentais	pH 7,4	pH 6,8	pH 6,2
PCPECL	61,1nm ±0,3	69,9nm ±0,2	76,2nm ±1,0
PCPECL + cit <i>c</i>	54,0nm ±0,4	104,0nm ±2,5	1030,4nm ±17,8

Experimentos feitos nas seguintes condições: HEPES 10 mM, 25° C, cit *c*, quando presente, 4 μM, lipossomos PCPECL 0,25 mM, na proporção 50/30/20 mol %.

4.1.2. Determinação da causa do aumento da turbidez em função de pH promovido por cit *c*

Os resultados de aumento de turbidez induzido por cit *c*, monitorados por meio de espectrofotômetro, indicam a ocorrência de instabilidade coloidal decorrente de fusão ou formação de agregados de vesículas fosfolipídicas. Para determinação da causa do aumento de turbidez em vesículas de PCPECL, promovido por cit *c*, o aumento do tamanho médio das vesículas foi comparado com a queda da razão excímero/monômero (E/M) nestas vesículas contendo fosfolípido marcado 2-(10-(1-pyrene)decanoyl)phosphatidylcholine (PPDPC).

Nos experimentos controle, vesículas de PCPECL contendo 7 mol % de PPDPC foram misturadas a um excesso de 10 vezes de vesículas de PCPECL sem o lipídeo marcado. Após incubação de 2 horas a 30° C em HEPES 10 mM, tanto em pH 7,4 quanto em 6,2, a razão E/M não foi afetada (dado não mostrado). A adição de cit *c* a estas vesículas marcadas gerou uma queda da razão E/M de 0,25 para 0,13 após 440 segundos de incubação em pH 6,2 (**Figura 18**). Em pH 7,4 na presença de cit *c*, a razão E/M manteve-se constante em função do tempo e próximo a 0,25.

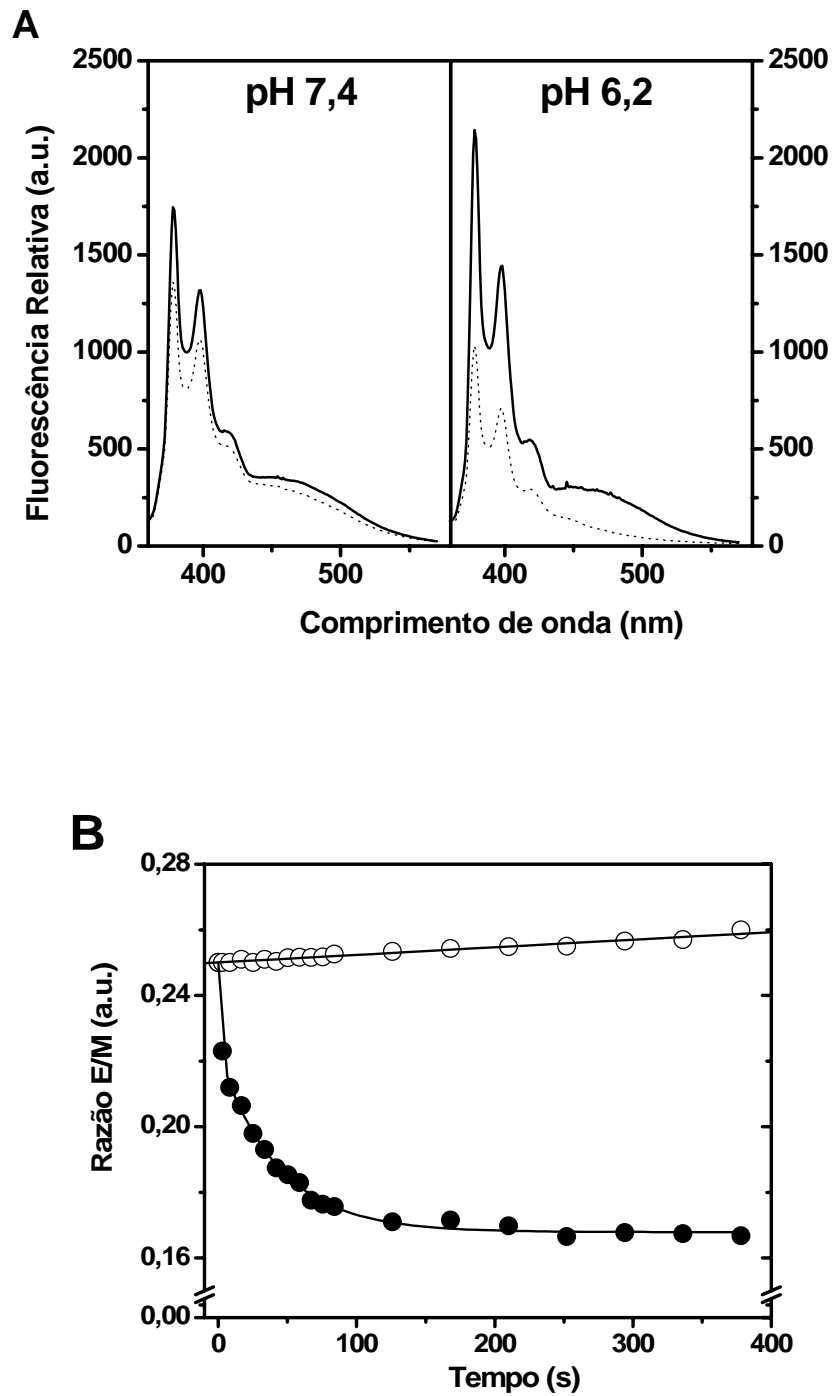


Figura 18. Espectros de emissão de fluorescência de lipossomos PCPPDPCPECL associados a citocromo *c*. Lipossomos PCPECL contendo 7 mol % PPDPC associados a cit *c* em pH 7,4 e 6,2. (A) Linha fina cheia: lipossomos associados com cit *c* no tempo zero; linha pontilhada: lipossomos associados com cit *c* após 440s. (B) Monitoração da razão E/M versus tempo. Experimentos feitos com lipossomos de PCPPDPCPECL 50 μ M, na proporção 43/7/30/20 mol %, (vesículas de PCPPDPCPECL: PCPECL = 1: 10), incubadas a 30°C em tampão HEPES 10 mM, cit *c* 0,9 μ M.

4.1.3. Identificação de grupos ionizáveis específicos com $pK_a \sim 7,0$

O efeito de pH na associação de cit *c* com fosfolipídios acídicos tinha sido descrito na literatura (RYTÖMAA, KINNUNEN, 1995; TUOMINEN et al., 2002; RYTÖMAA, MUSTONEN, KINNUNEN, 1992). Dois sítios de interação de cit *c* com bicamadas lipídicas foram identificados e denominados como: sítio A, que interage eletrostaticamente com a cabeça desprotonada de fosfolipídios acídicos e, o sítio C, que interage com a cabeça protonada do fosfolipídio acídico via pontes de hidrogênio. Quando ligado ao fosfolipídio acídico via sítio C, a interação de cit *c* com membrana não é influenciada pelo aumento da força iônica do meio. A associação de cit *c* com fosfolipídios acídicos via sítio C é favorecida em valores ácidos de pH. Entretanto, na faixa de 8-29 mol % de CL em vesículas PCCL, os valores de pK_a para a cardiolipina foram descritos entre 4,0 a 5,5, e resultados similares foram obtidos com vesículas contendo fosfatidilglicerol (PG) no lugar de CL (RYTÖMAA, KINNUNEN, 1995). Assim, em nossas condições experimentais, com o conteúdo máximo de cardiolipina 20 mol %, o pK_a da CL não poderia estar acima de 5,0 e o protonamento da cardiolipina não poderia ser relacionado ao pK_a observado para a fusão das vesículas.

Para excluir a possibilidade de que o valor de pK_a 6,95 (**Figura 19**) seja correspondente à ionização da cabeça polar de fosfolipídios, foram realizados experimentos para determinar a carga líquida da superfície das vesículas ou seja, seu potencial zeta (ζ) (dado não mostrado). Caso o valor de pK_a obtido fosse devido a ionização da cabeça de fosfolipídios, o potencial zeta (ζ) das vesículas de PCPECL deveriam variar significativamente na faixa de 6,2 a 7,4. Contudo, em nossos experimentos, não houve variação significativa nos valores de potencial ζ de lipossomos na ausência de cit *c*, nesta faixa de pH, mantendo-se o potencial zeta constante e próximo a -100 mV, devido a presença de fosfolipídios acídicos. Na presença de cit *c*, o potencial ζ manteve-se constante porém

próximo a -50 mV na mesma faixa de pH, indicando que a proteína está eletrostaticamente ligado nas vesículas, uma vez que o cit *c* apresenta uma carga líquida positiva em pH neutro (KOPPENOL, MARGOLIASH, 1982; RYTÖMAA, MUSTONEN, KINNUNEN, 1992).

A especificidade de cit *c* para induzir o processo de fusão de lipossomos dependente de pH e foi demonstrada por meio da comparação entre a capacidade de uma outra proteína básica, protamina (SANDERS, GROUPI, BROWNING, 1980) e uma proteína ácida, albumina, de promover a fusão de vesículas de PCPECL em função de pH. Protamina exibiu a mesma eficiência para promover instabilidade coloidal em vesículas de PCPECL, tanto em pH 7,4 quanto em 6,2, ou seja, de maneira independente de pH, enquanto que a albumina não induziu a fusão de lipossomos nesses valores de pH, como mostra a **Figura 19**. Sendo assim, somente cit *c* promoveu fusão de vesículas de PCPECL de forma dependente de pH.

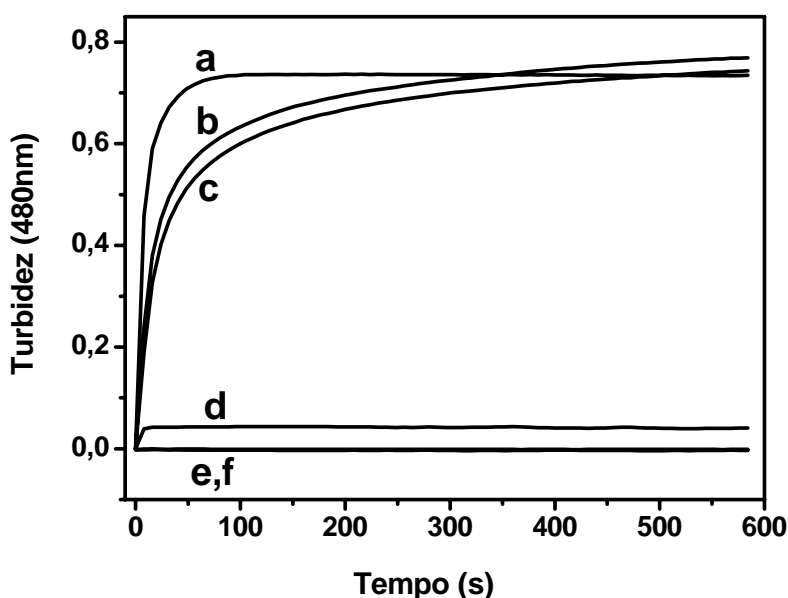


Figura 19. Capacidade de citocromo *c*, protamina e albumina de induzir fusão de vesículas de PCPECL. Experimentos foram feitos a 30°C, na presença de vesículas de PCPECL 0,25 mM, na proporção 50/30/20 mol %, 4 μM das seguintes proteínas: (a) cit *c*, em pH 6,2, (b) protamina, pH 7,4, (c) protamina, pH 6,2, (d) cit *c*, pH 7,4, (e) albumina pH 7,4 e (f) em pH 6,2.

Dados de nosso laboratório têm demonstrado que a associação de citocromo *c* com interfaces carregadas negativamente também é modulado pelo estado de valência do ferro hemínico (NANTES et al., 2001). Contudo, o processo de fusão de vesículas observado em nossos experimentos não depende do estado de oxidação do ferro hemínico, como mostra a **Figura 20**, em que foram realizados experimentos utilizando citocromo *c* Fe^{2+} e citocromo *c* Zn-substituído em valores de pH 7,4 e 6,2. Ambas as formas de citocromo *c* acima citadas tiveram o mesmo efeito de cit *c* Fe^{3+} na presença de vesículas de PCPECL.

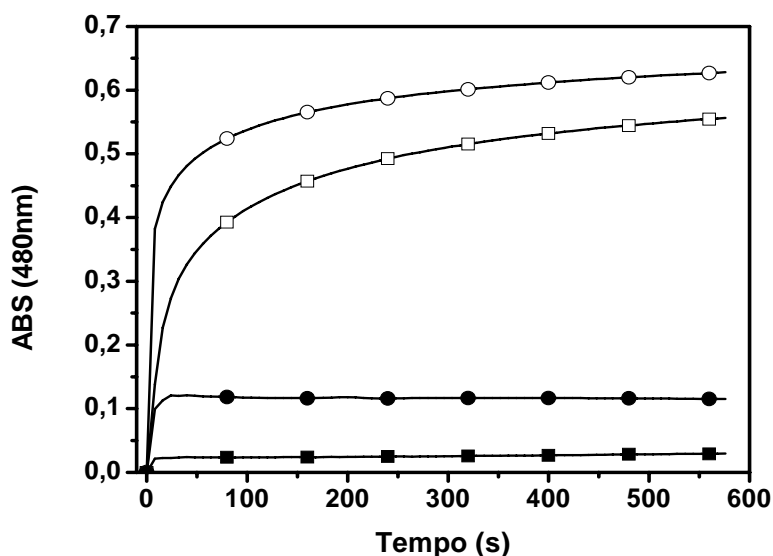


Figura 20. Efeito do pH na fusão de lipossomos PCPECL na presença de citocromo *c* reduzido (Fe^{2+}) e Zn-substituído monitorado pelo espectrofotômetro UV-vis. Experimentos feitos nas seguintes condições: HEPES 10 mM pH 7,4 (símbolo fechado) e 6,2 (símbolo aberto), 30° C, lipossomos de PCPECL 0,25 mM, na proporção 50/30/20 mol %, em presença de citocromo *c* Fe^{2+} (quadrados) e Zn-substituído (círculos) 4 μM .

Considerando a possibilidade de que o $\text{p}K_a = 6,9$, observado na **Figura 17**, possa ser atribuída a resíduos de aminoácidos da proteína, o grupo imidazol de resíduos de histidinas seria o provável grupo ionizável, devido ao fato de possuir um $\text{p}K_a$ intrínseco de 6,04. Contudo, agrupamentos de resíduos de lisina, onde ocorre proximidade de grupos carregados

positivamente, poderiam levar a um decréscimo significativo no valor de pK_a destes grupos. Dessa forma, uma análise da estrutura de cit *c* revelou que, em uma região situada no lado oposto aos sítios A e C, encontra-se um agrupamento de resíduos carregados positivamente composto por Lys22, Lys25, Lys27, His26 e His33 (**Figura 21**).

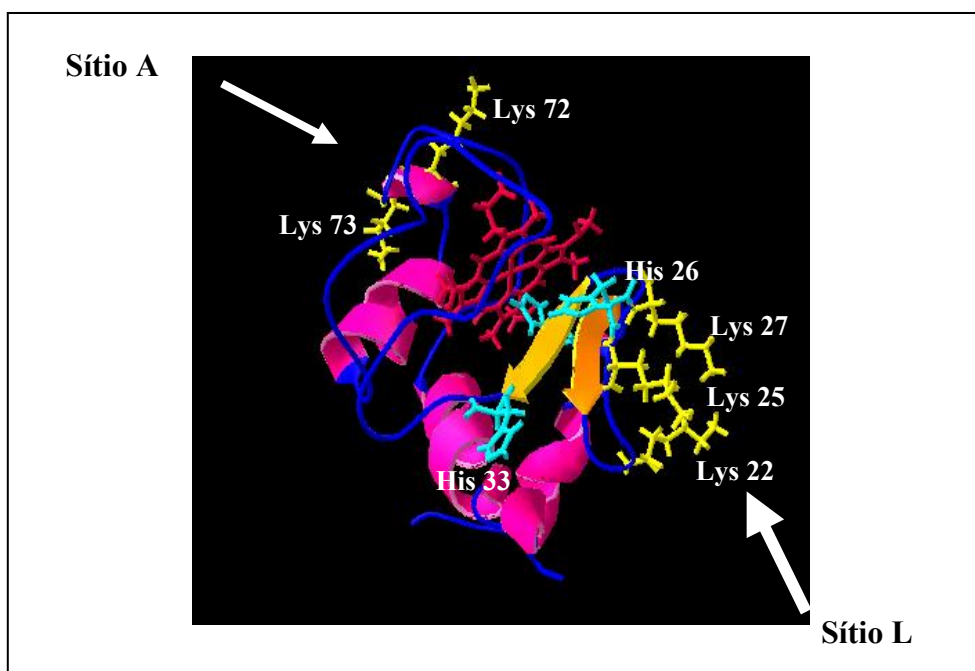


Figura 21. Representação da estrutura tridimensional de citocromo *c* (cavalo) em solução aquosa. A estrutura tridimensional foi elaborada pelo programa Swiss-PDB Viewer. A seta indica o agrupamento de resíduos carregados positivamente posicionados de modo confluentes, localizado no lado oposto aos sítios A e C.

Nesta região, as cadeias laterais dos resíduos de lisina estão em posição confluyente, o que favorece o decréscimo no valor de pK_a de suas cadeias laterais. Assim, esta região poderia ser um provável sítio de interação com fosfolipídios ácidos em pH 6,2 e não em pH 7,4, pois em pH 7,4 estes resíduos estariam no estado desprotonado (não carregado). Ao contrário, as cadeias laterais dos resíduos de Lys72 e Lys73 do sítio A estão em posição divergente, o que sugere um valor de pK_a alto para estas cadeias laterais. Para confirmar esta proposta,

dietilpirocarbonato (DEPC) foi utilizado para promover modificação química dos aminoácidos de citocromo *c* que apresentassem imidazol ou amino grupos desprotonados em pH 7,4.

4.1.4. Modificação química em resíduos de aminoácido específicos de citocromo *c* por dietilpirocarbonato - DEPC

As análises de espectroscopia de massa pelo MALDI-ToF de citocromo *c* carboxilado por DEPC revelaram que o tratamento de citocromo *c* nas razões proteína/DEPC de 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4 levaram a modificação de um, dois, três e quatro resíduos de aminoácidos, respectivamente (**Figura 22 A** mostra os valores da massa molecular de citocromo *c* de cavalo nativo, 12.384 na sua forma ionizada $[M + H]^+$ e 6.174 na forma $[M + 2H]^{2+}$ obtidas pelo MALDI-ToF). As **Figura 22 B, C, D e E** mostram o espectro de massa de citocromo *c* tratado com dietilpirocarbonato (DEPC) nas razões proteína/modificador 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4, respectivamente. Considerando que a modificação química de cada cadeia lateral por DEPC leva a um acréscimo de massa de 72,06 Da (QIN et al., 2002), podemos quantificar o número de resíduos de aminoácidos modificados de acordo com a **Tabela 7**.

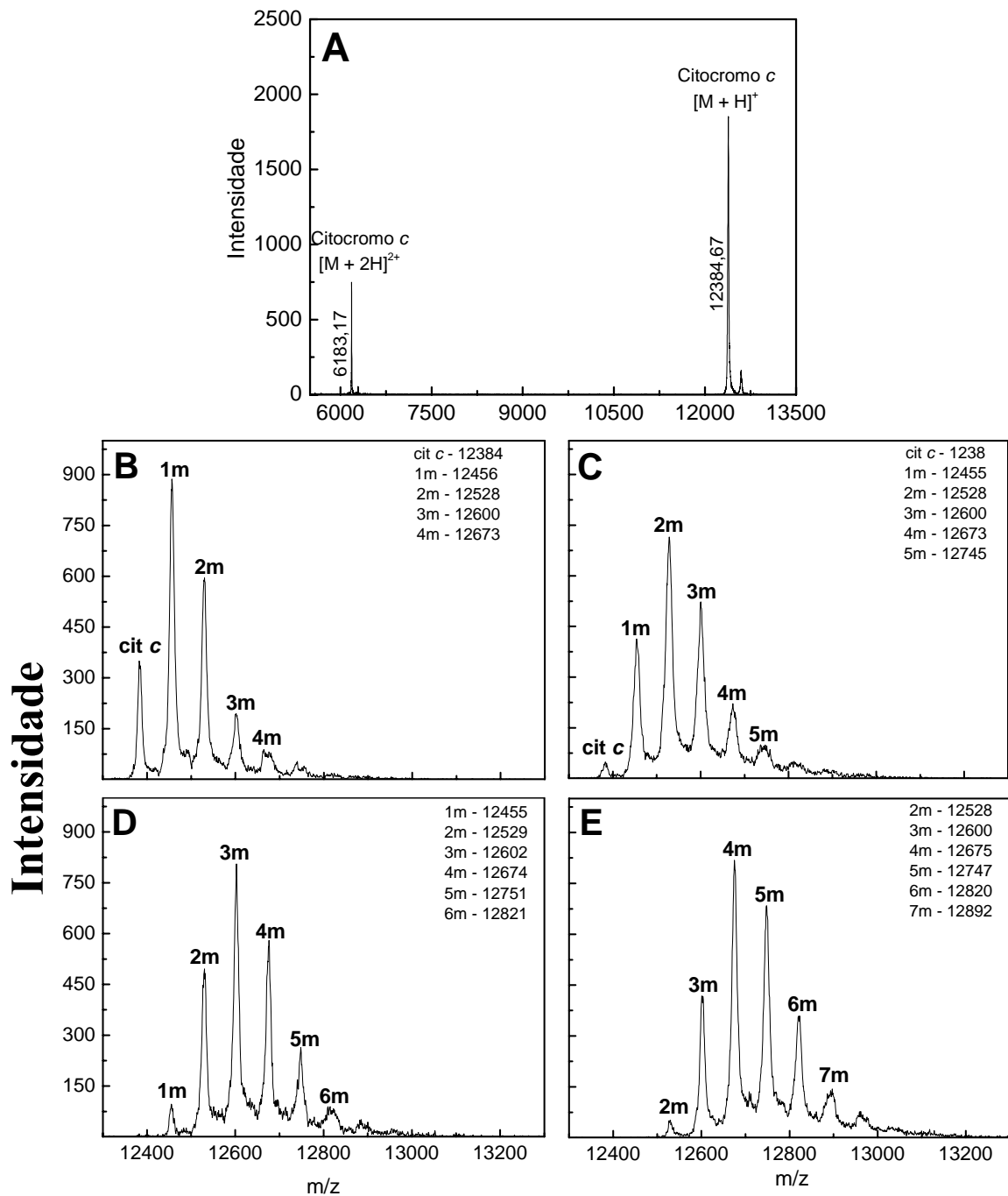


Figura 22. Espectros de massa (MALDI-ToF) de citocromo *c* nativo e após tratamento com DEPC. Cit *c* nativo (A) e tratado com DEPC nas seguintes razões DEPC/proteína: 1 (B), 2 (C), 3 (D) e 4 (E) em HEPES 5 mM pH 7,4, a 5°C e dialisado. As amostras foram misturadas em volume igual de solução saturada (10 mg/ml) de sinapinic acid (SA) em acetonitrila 50 % e ácido trifluoracético 0,5 %, e aproximadamente 0,5 μ L dessa mistura foi aplicada sobre os slides de aço inox para análise no MALDI.

Tabela 7: Massa previstas de citocromo *c* carboxilado por DEPC

	m/z
1 m (1-mono-carboxilação)	12.456 Da
2 m (2-mono-carboxilação)	12.528 Da
3 m (3-mono-carboxilação)	12.600 Da
4 m (4-mono-carboxilação)	12.672 Da
5 m (5-mono-carboxilação)	12.744 Da
6 m (6-mono-carboxilação)	12.816 Da
7 m (7-mono-carboxilação)	12.888 Da

Constatada a modificação de citocromo *c* por DEPC, a fusão de vesículas de PCPECL foi acompanhada na presença de citocromo *c* nativo e tratado com DEPC nas razões proteína/modificador 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4, de modo a avaliar o número mínimo de resíduos que precisam ser modificados para que a fusão de vesículas não mais ocorra (**Figura 23**).

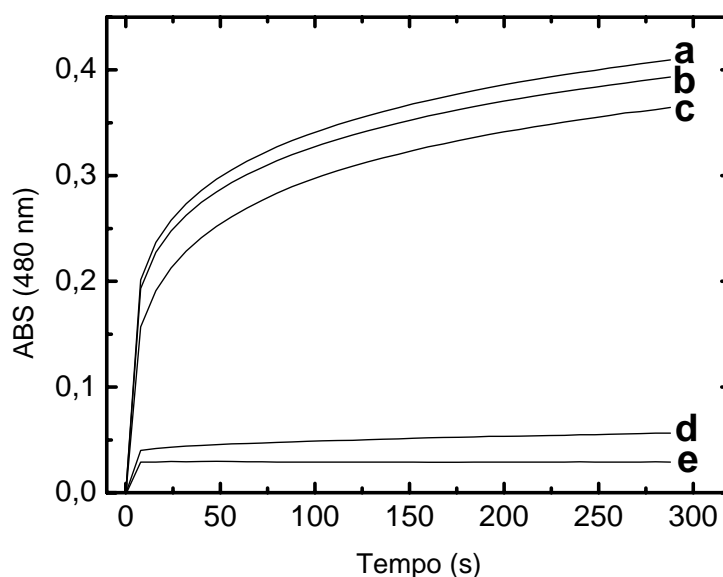


Figura 23. Efeito de citocromo *c* modificado pelo DEPC na indução de fusão de lipossomos PCPECL. Lipossomos PCPECL na presença de cit *c* nativo (**a**) e tratado com DEPC em HEPES 5 mM pH 7,4, nas razões proteína/modificador 1:1 (**b**), 1:2 (**c**), 1:3 (**d**) e 1:4 (**e**). Experimentos feitos nas seguintes condições: HEPES 10 mM pH 6,2, 30° C, citocromo *c* 4 μ M, lipossomos PCPECL 0,25 mM - na proporção 50/30/20 mol %.

O efeito de pH no tratamento de citocromo *c* com DEPC também foi estudado. A **Figura 24** (painel da esquerda) mostra o efeito protetor do pH durante o tratamento de cit *c* com excesso molar de 3 vezes DEPC. Após o tratamento com DEPC, a amostra de cit *c* foi dializada e então, foi verificada sua capacidade de induzir fusão de vesículas de PCPECL. A fusão foi determinada de acordo com o aumento de turbidez em 480 nm, após 10 minutos de incubação de cit *c* tratado com DEPC na presença de lipossomos em pH 6,2. Este resultado foi comparado com a curva de pH para a fusão de vesículas de PCPECL promovida pelo citocromo *c* nativo na mesma faixa de pH (círculos fechados). A **Figura 24** também demonstra que os pronunciados efeitos de pH na alteração de turbidez induzida pelo cit *c* contrastam significativamente com a completa ausência de efeito de pH quando citocromo *c* *N*-acetilado foi utilizado para promover a fusão de vesículas (triângulos fechados). O valor de $pK_a = 6,75 \pm 0,07$ obtido para o efeito de pH no tratamento de cit *c* com DEPC na proporção 1:3 (círculos abertos) na presença de vesículas de PCPECL em pH 6,2, foi próximo ao valor de $pK_a (6,95 \pm 0,08)$ obtido para a fusão de vesículas PCEPCL promovida pelo cit *c* nativo. Esses resultados sugerem que, ao contrário da *N*-acetilação que bloqueia todos os resíduos de lisina em cit *c*, a carboxilação de cit *c* bloqueou apenas os grupos ionizáveis com pK_a por volta de 6,9 que estão envolvidos na interação com bicamadas lipídicas e responsáveis pelo processo de fusão de lipossomos.

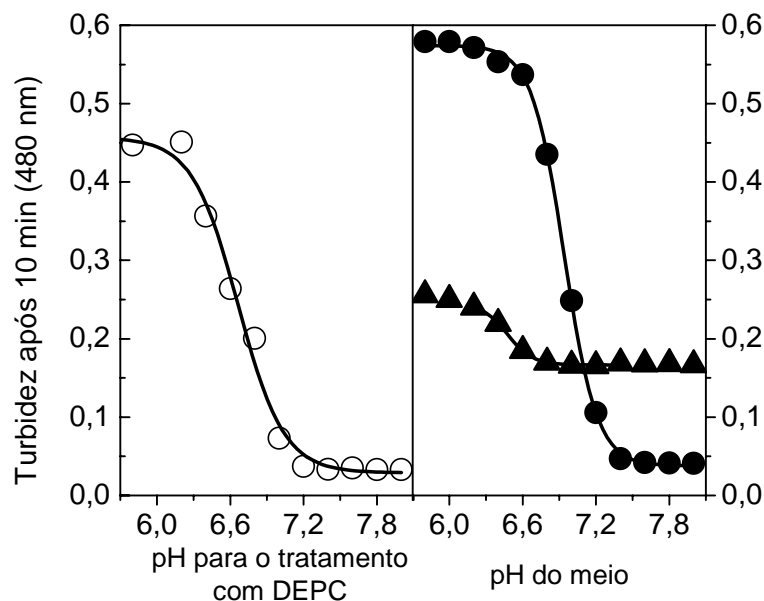


Figura 24. Efeito da carboxilação e *N*-acetilação na capacidade de cit *c* de induzir fusão de vesículas de PCPECL. O painel da esquerda mostra o efeito protetor do pH durante o tratamento de cit *c* com DEPC. Após o tratamento com DEPC, a amostra de cit *c* foi dializada e então, foi verificada sua capacidade de induzir fusão de vesículas de PCPECL. A fusão foi determinada de acordo com o aumento de turbidez em 480 nm, após 10 minutos de incubação de cit *c* tratado com DEPC na presença de lipossomos em pH 6,2. O painel da direita mostra o efeito de pH na turbidez do meio contendo vesículas de PCPECL incubadas com cit *c* nativo (círculos fechados) e *N*-acetilado (triângulos fechados) por 10 min. Os experimentos foram feitos a 30° C, na presença de vesículas de PCPECL 0,25 mM, na proporção 50/30/20 mol %, e 4 μM de cit *c* nativo ou quimicamente modificado.

As análises de espectroscopia de massa de MALDI-ToF dos fragmentos obtidos da digestão com tripsina de citocromo *c*, modificado com excesso molar de 3 vezes DEPC, tratado em pH 7,4, revelaram modificações nos fragmentos 26-38, 80-87 e 14-22 (**Tabela 8**). Nesta tabela, o fragmento peptídico 80-87 (marcado com um asterisco) exibe uma massa compatível com mono-carboxilação e a modificação apontada para a Lys87, pois o fragmento peptídico 80-86 não apresentou nenhuma modificação. O fragmento peptídico 14-22 (marcado com um asterisco) também exibe uma massa compatível com mono-carboxilação. Este fragmento inclui dois resíduos de aminoácidos que poderiam ser modificados por DEPC: His18 e Lys22. Entretanto, His18 encontra-se inserida no interior da proteína e ainda, His18 é um ligante do átomo de ferro do grupo heme na quinta posição de

coordenação. Consequentemente, qualquer modificação química nesta histidina iria promover uma drástica alteração no espectro de UV-visível de cit *c*, o que não ocorreu. Os espectros de UV-visível de cit *c* nativo e modificado com DEPC são idênticos (dados não mostrados), revelando que a His18 não foi modificada e, DEPC provavelmente não altera a estrutura de cit *c* de modo significativo, não sendo detectável pelos espectros. Na **Tabela 8**, o fragmento peptídico 26-38 (marcado com um asterisco) também exibe uma massa compatível com mono-carboxilação. Este fragmento contém dois resíduos de histidinas: His26 e His33. Entretanto, este fragmento foi seqüenciado via kit de sequenciamento Ettan™ CAF™ MALDI e a carboxilação foi localizada na Lys27. Portanto, Lys22, Lys27 e Lys87 devem ser os resíduos de aminoácidos predominantemente modificados quando cit *c* foi tratado com excesso molar de 3 vezes DEPC. O resíduo de His33 carboxilado foi detectado somente em amostras tratadas com excesso molar de 5 vezes DEPC. A carboxilação de His33 foi encontrada no fragmento que compreende os resíduos de aminoácidos 28-38 (TGNLHGLFG), **Tabela 8**. Este fragmento exibe um peso molecular de 1240,5, correspondendo à adição de massa de 72 unidades a massa de 1168,5.

A digestão com tripsina de cit *c* tratado com excesso molar de 6 vezes DEPC revelou modificações também nos fragmentos 39-53 e 56-72. Neste caso, modificações em Lys 39, 53, 60 e 72 são possíveis. Quando excesso molar de DEPC era acima de 6, fragmentos contendo duas modificações concomitantes foram também detectadas. Sob essas condições, fragmentos contendo simultaneamente Lys27 e His33 carboxiladas e fragmentos contendo simultaneamente Lys79 e Lys86 foram detectados (dados não mostrados).

A identificação do número e dos resíduos de aminoácidos carboxilados na estrutura de citocromo *c*, envolvidas nesse processo de fusão, foi feita por MALDI-ToF. Análises de espectroscopia de massa, por MALDI-ToF, de citocromo modificado pelo DEPC em pH 7,4, em diferentes razões DEPC/cit *c*, de 1 a 100, revelaram que no máximo 12 resíduos de

aminoácidos de citocromo *c* puderam ser modificados por DEPC nestas condições (**Figura 25**, círculos abertos).

A digestão tríptica dessas amostras identificou, no máximo 11 aminoácidos carboxilados (**Figura 25**, círculos fechados). Os aminoácidos carboxilados identificados pela digestão tríptica foram os seguintes: Lys22, Lys27 e Lys87 na razão DEPC/cit $c = 3$; Lys22, Lys27, His33 e Lys87 onde a razão DEPC/cit $c = 5$; Lys22, Lys27, His33, Lys87, Lys39 e/ou 53, Lys60 e/ou 72 na razão DEPC/cit $c = 6$; Lys22, Lys27, His33, Lys87, Lys39 e/ou 53, Lys60 e/ou 72, Lys79 e 86 onde a razão DEPC/cit $c = 9$; Lys22, Lys27, His33, Lys87, Lys39 e/ou 53 e/ou 55, Lys60 e/ou 72, Lys79 e 86 na razão DEPC/cit $c = 50$ (**Figura 25 e Tabela 8**).

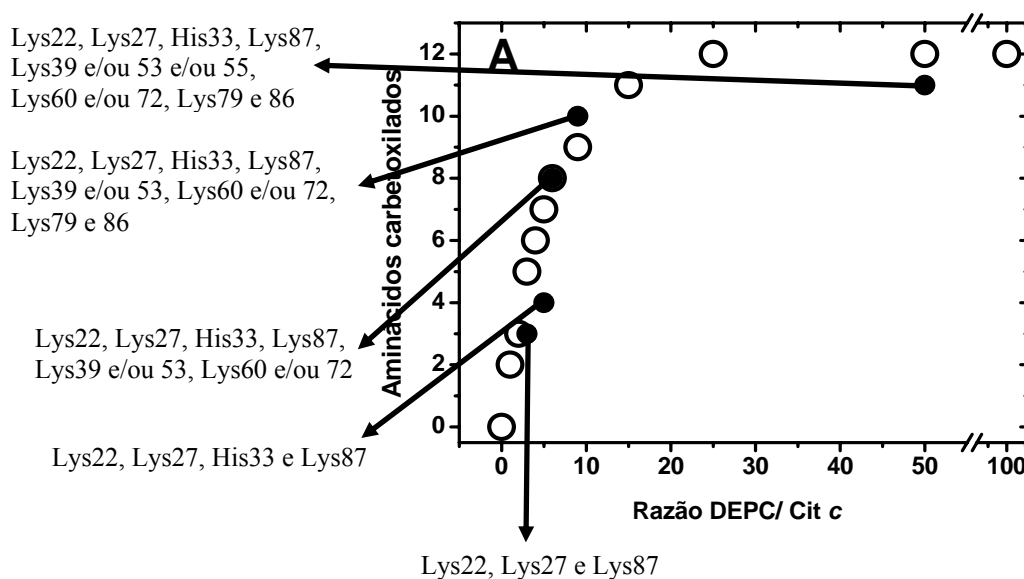


Figura 25. Efeito da razão DEPC/cit *c* no número de aminoácidos carboxilados. Efeito da razão DEPC/cit *c* no número de resíduos de aminoácidos carboxilados. Círculos abertos representam o número máximo de aminoácidos modificados detectados na amostra; círculos fechados representam o número máximo de resíduos de aminoácidos carboxilados identificados nos fragmentos trípticos das amostras.

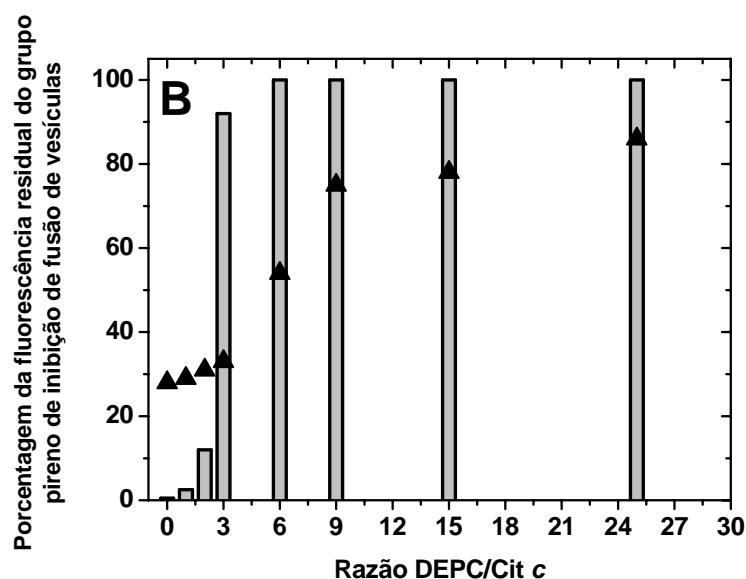


Figura 26. Efeito da razão DEPC/cit *c* na ligação de lipossomos PCPECL e na porcentagem correspondente de inibição de fusão de vesículas detectada após a adição de cit *c* nativo ou carboxilado. A ligação de cit *c* em lipossomos PCPECL foi monitorada pela porcentagem de fluorescência residual (em 398 nm) do grupo pireno de lipossomos PCPECL marcados (em triângulo) e a porcentagem correspondente de inibição de fusão de vesículas detectada após a adição de cit *c* nativo ou carboxilado. O aumento de fluorescência residual indica o desfavorecimento da interação cit *c* com vesículas PCPECL.

Todas as amostras de cit *c* foram testadas com relação a sua habilidade de interagir com fosfolipídios ácidos, por meio da supressão de fluorescência do grupo pireno, e induzir fusão de vesículas em pH 6,2, por meio da queda da razão excímero/monômero de fluorescência do grupo pireno. A **Figura 26** mostra o efeito do número da carboxilação em cit *c* no desfavorecimento da fusão de vesículas (barras abertas) e na habilidade da proteína em ligar a vesículas de PCPECL (triângulos fechados). Para as razões DEPC/cit *c* 1, 2; 3 e 4, a porcentagem de inibição de fusão foi de 2,5 %, 12 %, 92 % e 100 %, respectivamente (barras abertas). Embora cit *c* tratado com DEPC na razão proteína/modificador de 1: 3 não foi capaz de promover a fusão de vesículas de modo significativo em pH 6,2, ele ainda é capaz de ligar em fosfolipídios ácidos, como averiguado pela baixa porcentagem de fluorescência residual do grupo pireno (**Figura 26**, triângulos fechados). Como esperado, quando modificações foram detectadas nos fragmentos contendo Lys72, a capacidade dessa

amostra em ligar a vesículas PCPECL foi significativamente menor. Este resultado sugere que a população significativa de moléculas de cit *c* que exibe a Lys72 carboxilada foi encontrada somente em amostras tratadas com excesso molar de DEPC acima de 5.

Como esperado, quando modificações nos fragmentos contendo Lys72 eram detectadas, a capacidade de ligação em vesículas de PCPECL foi significativamente diminuída. Esse resultado sugere que uma população significativa de moléculas de cit *c* exibe a Lys72 carboxilada somente em amostras tratadas com excesso molar de DEPC de 5 vezes. Embora medidas de MALDI-ToF não sejam quantitativas, esses resultados presentes na **Figura 25** mostraram que, neste caso, a detecção pelo MALDI-ToF de resíduos modificados foi correlacionadas com a quantidade da população com tais resíduos modificados na amostra. De acordo com análises de espectrometria de massa MALDI-ToF, cit *c* tratado com excesso molar de 3 vezes DEPC, a condição que inibe significativamente a capacidade de fusão de vesículas de PCPECL, exibe predominantemente uma população contendo três resíduos de aminoácidos carboxilados e apresenta, populações com no máximo de 5 a 6 modificações (**Figura 22**). Entretanto, como mostrado, análises de espectrometria de massa MALDI-ToF de fragmentos obtidos da digestão de cit *c* (tratado com DEPC na razão DEPC/cit *c* 3) com tripsina pode identificar somente três resíduos de aminoácidos: Lys22, Lys27 e Lys87 (**Tabela 8**). Além disso, citocromo *c* foi modificado quimicamente em uma condição que permitisse obter uma amostra mais homogênea. A **Figura 27 A** mostra que o tratamento de cit *c* com excesso molar de 15 vezes DEPC em pH 5,25 inibiu a fusão de vesículas por cerca de 85 %. Análises de MALDI-ToF desta amostra revelaram dois picos principais (cerca de 85 % da área) exibindo uma e duas modificações (**Figura 27 B**).

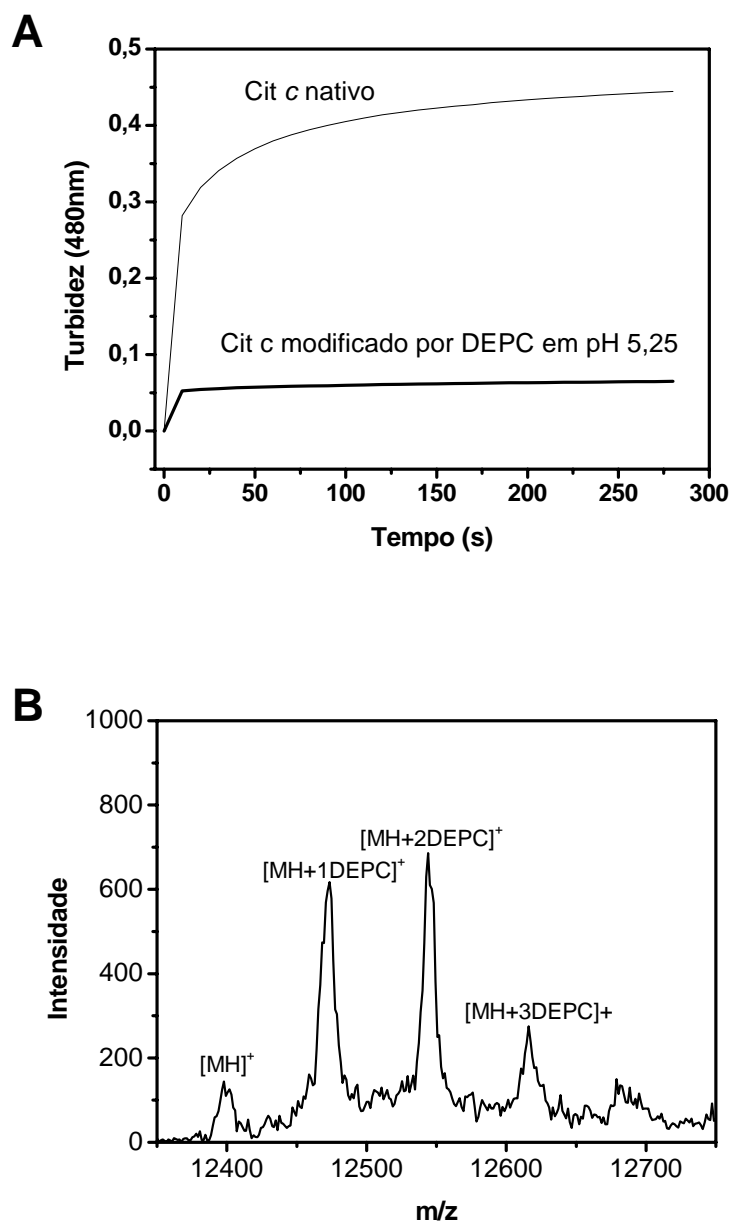


Figura 27. (A) Efeito da carboxilação de cit *c* na promoção de turbidez do meio contendo vesículas de PCPECL. Experimentos feitos: HEPES 10 mM pH 6,2, 30° C, lipossomos PCPECL 0,25 mM - na proporção 50/30/20 mol %. citocromo *c* 4 μM nativo (linha fina) ou tratado com excesso molar de 15 vezes DEPC em tampão acetato pH 5,25 (linha grossa). **(B) Análise de MALDI-ToF de cit *c* carboxilado.** O cit *c* foi reagido com excesso molar de 15 vezes DEPC em tampão acetato 10 mM, pH 5,25, em temperatura ambiente por 2 minutos.

A digestão trípica desta amostra revelou modificações nos resíduos Lys27 e/ou His26 e His33 (**Tabela 8**). Os resultados obtidos com o tratamento de cit *c* com excesso molar de 3 vezes DEPC, em pH 7,4, e com 15 vezes excesso molar, em pH 5,25, estão de acordo com a

proposição de que há uma região na estrutura de cit *c* localizada no lado oposto ao sítio A, denominada como sítio L em que está envolvida em promover fusão de vesículas em baixos valores de pH. Considerando que o sítio L está localizado no lado oposto ao sítio A na estrutura de citocromo *c* (TAKANO, DICKERSON, 1981), como mostra a **Figura 28**, uma vez que o cit *c* está ligado eletrostaticamente a vesículas de PCPECL de um lado, o outro sítio está disponível para interagir uma outra vesícula, assim, favorecendo o processo de fusão. Entretanto, a ocorrência de fusão de vesículas é favorecida pela presença de fase hexagonal invertida (HII). A importância da fase hexagonal invertida é evidente pelo fato de que a fusão de vesículas mediada por cit *c* em pH ácido foi desfavorecida em vesículas que não continham fosfatidiletanolamina.

Tabela 8: Massa dos fragmentos peptídicos de *cyt c* nativo e modificado por DEPC detectados pelo MALDI-ToF

Rank da proteína selecionada: 1 Expectation: 0.000 Coverage: 79.8 pl: 9.7 Mass: 11.55 kDa Matched peptides: 13 Measured peptides : 17. Protein information: gi|117963|sp|P00006|CYC_BOVIN – Cytochrome *c*

Meas. Mass	Ave/	Comp. Mass	Error (m/z)	Res. start	Res. end	M. cut	Meas. Mass	Peptide sequence
Native <i>cyt c</i>			Isotopic					
DEPC 1:3 <i>cyt c</i>								
1349.744	Mono	1349.719	0.0246	89	99	1	1350.629	TEREDLIAYLK
1632.717	Mono	1632.812	-0.0950	9	22	1	1633.637	IFVQKCAQCHTVEK
1597.770	Mono	1597.774	-0.0038	39	53	1	1598.620	KTGQAPGFSYTDANK
1167.681	Mono	1167.615	0.0661	28	38	0	1168.493	TGPNLHGLFGR
1295.748	Mono	1295.710	0.0378	28	39	1	1296.755	TGPNLHGLFGRK
1432.826	Mono	1432.769	0.0573	26	38	1	1505.682*	HKTGPNLHGLFGR*
1470.667	Mono	1470.690	-0.023	40	53	0	1470.609	TGQAPGFSYTDANK
2080.155	Mono	2080.019	0.1360	56	72	1	2081.162	GITWKEETLMEYLENPK
778.275	Mono	778.441	-0.1666	80	86	0	779.282	MIFAGIK
907.370	Mono	906.536	0.834	80	87	1	979.374*	MIFAGIKK*
1711.740	Mono	1711.817	-0,0761	40	55	1	1712.802	TGQAPGFTYTDANKNK
1622.791	Mono	1622.786	0.0047	61	73	1	1623.804	EETLMEYLENPKK
1091.435	Mono	1091.623	-0.1880	92	100	1	1092.602	EDLIAYLKK
1018.411	Mono	1018.450	-0.039	14	22	0	1090.335*	CAQCHTVEK*
963.333	Mono	963.528	-0.1944	92	99	0	964.341	EDLIAYLK
603.218	Mono	603.338	-0.21197	56	60	0	604.301	GITWK
635.360	Mono	634.39	0.970	9	13	0	635.014	IFVQK

* Massa dos fragmentos peptídicos compatíveis com mono-carboxilação. Os dados foram obtidos com descrito no item Experimental. O número do resíduo é baseado na sequência da proteína madura.

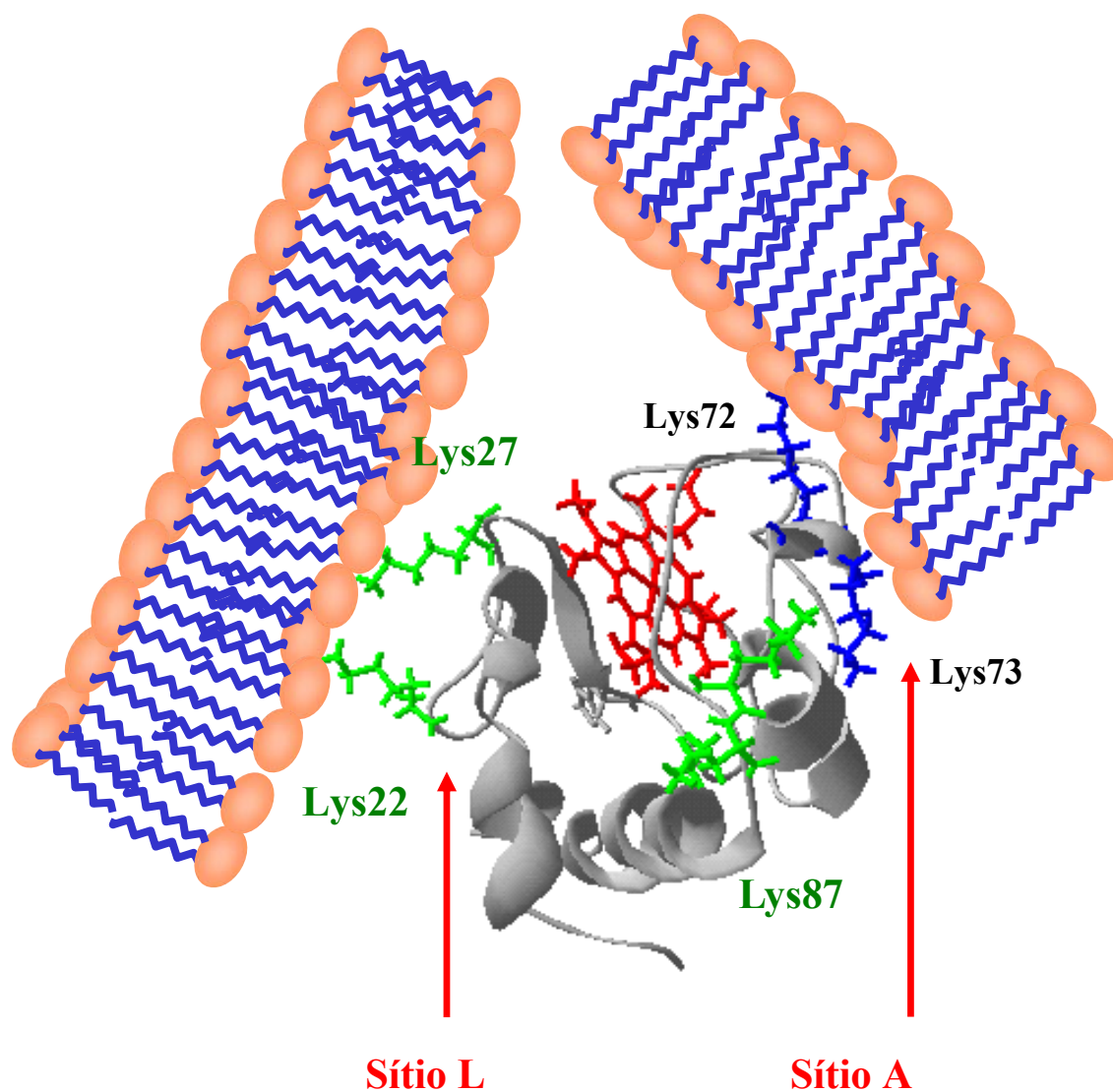


Figura 28. Estrutura de cit *c* oxidado de coração de cavalo em meio aquoso. As setas indicam o sítio L, formado principalmente por Lys22 e 27, e o sítio A, Lys86, 72 e 73, que interagem com a bicamada lipídica de duas vesículas (KAWAI, et al., 2005).

A importância da fase hexagonal invertida (HII) na fusão de vesículas de PCPECL mediada pelo cit *c* foi reforçada pela presença de PE insaturado de ovo em induzir o processo de fusão mediada pelo cit *c* quando comparada com os resultados obtidos com PE saturada (Figura 29).

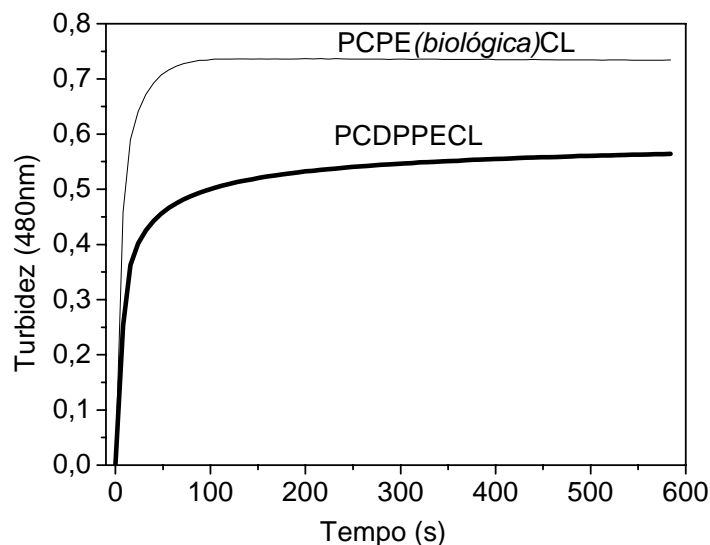


Figura 29. Aumento de turbidez na presença de vesículas de PCPECL contendo DPPE (linha sólida grossa) e PE biológica (linha sólida fina) em pH 6,2 na presença de cit *c*. Os experimentos foram feitos a 30° C, HEPES 10 mM e cit *c* nativo 4 μM.

Como previamente proposto, durante a fusão, a conformação estendida de moléculas PE poderia também ser favorecidas pelo sítio de contato entre duas vesículas em proximidade, levando ao *estendimento* das cadeias acil da molécula do fosfolípido em direções opostas, isto é, imersas dentro de duas bicamadas opostas enquanto a cabeça polar é mantida na interface. Assim, somente cit *c* possui a estrutura e a distribuição de resíduos carregados necessários para induzir fusão de vesículas de PCPECL de modo regulada pela ionização dos aminoácidos do sítio L e, considerando o alto grau de conservação na estrutura tridimensional de cit *c* este fenômeno é, provavelmente, correlacionado com os eventos biológicos na mitocôndria.

4.1.5. Estudo do perfil dos valores de pK_a dos aminoácidos envolvidos nos sítios A e L na estrutura de citocromo *c*

Uma vez caracterizado o sítio L de cit *c*, procuramos completar o estudo traçando o perfil completo de pK_a de citocromo *c*. Conforme já foi apresentado, o sítio L de citocromo *c*, identificado na primeira etapa do projeto, compreende um agregado de resíduos de aminoácidos básicos envolvendo os resíduos de lisina 22, 25 e 27 e os resíduos de histidina 26 e 33. Os resíduos de aminoácidos do sítio L estão localizados no lado oposto aos sítios A e C descritos anteriormente na literatura.

O sítio L é dependente de pH para a associação de citocromo *c* com membranas que mimetizam a membrana interna mitocondrial e, o posicionamento de seus resíduos é um importante fator que determina o valor de pK_a dos aminoácidos que o compõem. Para continuar a caracterização da estrutura de citocromo *c* no que concerne ao perfil dos valores de pK_a de seus aminoácidos, foi utilizada a espectroscopia de massa pelo MALDI-ToF MS de citocromo *c* nativo e modificado quimicamente por DEPC.

A **Figura 30** mostra a quantidade de aminoácidos carboxilados em função da razão DEPC/citocromo *c* obtido em diferentes valores de pH.

A partir do pH de tratamento de 7,5 até 11,5 o ponto de saturação, isto é, a razão DEPC/citocromo *c* necessária para atingir o número máximo de resíduos modificados (**Figura 30**, círculos fechados) ou para atingir o número máximo de resíduos na população predominante (**Figura 30**, círculos abertos), variou de 40/1 a 50/1. Abaixo de pH 7,5, a saturação não foi atingida nem mesmo na razão 100/1.

A **Figura 31** mostra o número de aminoácidos carboxilados da população predominante em função do pH de tratamento com DEPC na razão 50/1.

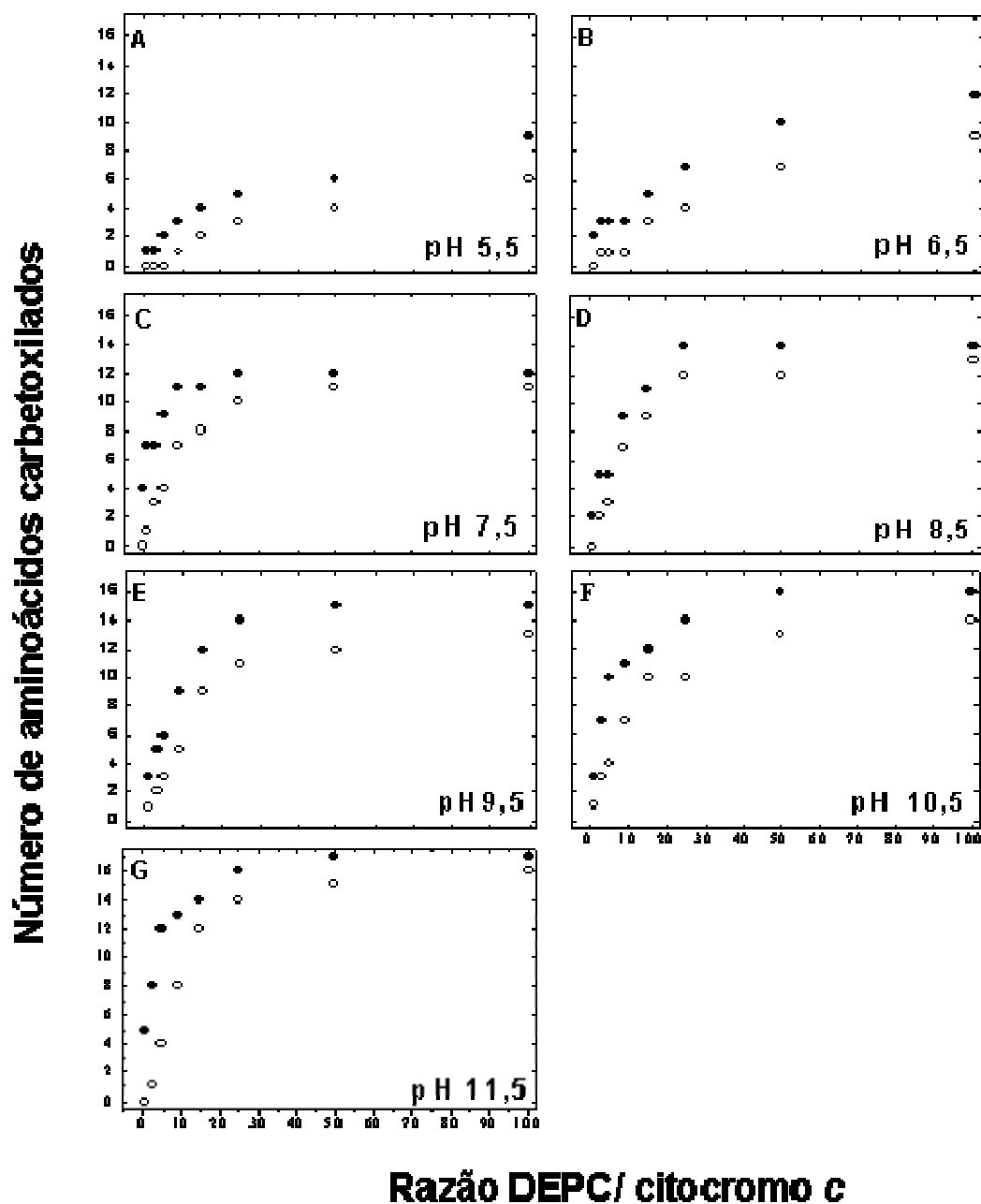


Figura 30. Efeito da razão DEPC/ citocromo *c* no número de aminoácidos carboxilados na estrutura de citocromo *c* na faixa de pH 5,5 a 11,5. Círculos fechados representam o número máximo de aminoácidos modificados por DEPC presente na amostra e, círculos abertos, número de aminoácidos modificados da população predominante presente na amostra. Experimentos feitos nas seguintes condições: citocromo *c* 100 μ M em tampão triplo 30 mM (ácido acético 10 mM, HEPES 10 mM e hidróxido de amônio 10 mM) pH 5,5 (A), 6,5 (B), 7,5 (C), 8,5 (D), 9,5 (E), 10,5 (F) e 11,5 (G) reagido com excesso molar de DEPC 1, 3, 5, 9, 15, 25, 50 e 100 vezes.

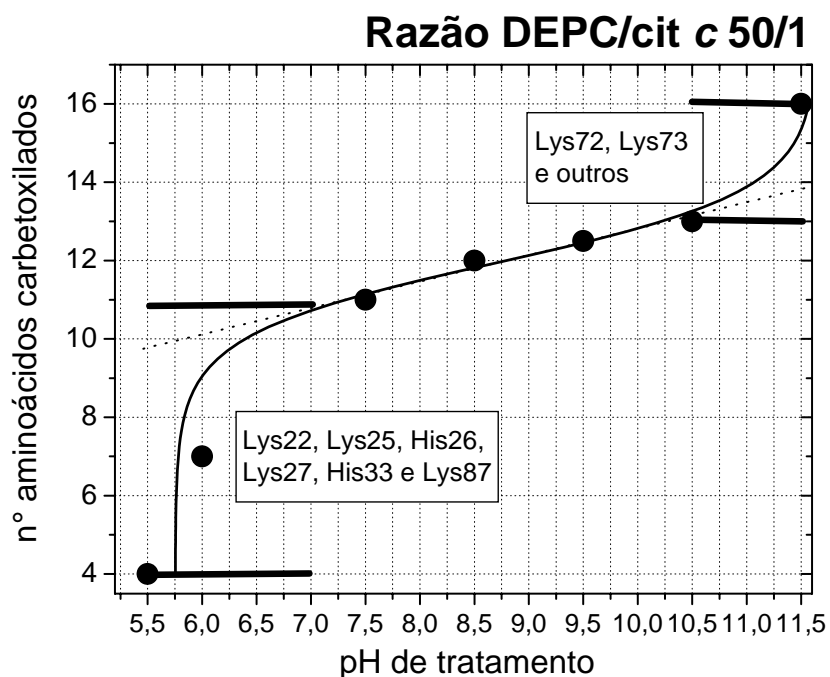


Figura 31. Efeito de pH de tratamento no número de aminoácidos modificados na estrutura de cit *c*, na razão DEPC/cit *c* 50/1. Experimentos feitos nas seguintes condições: citocromo *c* 100 μ M em tampão triplo 30 mM (ácido acético 10 mM, HEPES 10 mM e hidróxido de amônio 10 mM) na faixa de pH 5,5 a 11,5, reagido com excesso molar de DEPC 50 vezes.

A curva de pH apresentada na **Figura 31** mostra um ponto de inflexão em torno de pH = 8,7 que é próximo à transição alcalina do citocromo *c*, que ocorre no pH = 9,2 (WALLACE, 1984; OSHEROFF et al., 1980; HOANG et al., 2003). A transição alcalina de cit *c* é descrita como uma alteração estrutural da proteína decorrente da substituição da sexta coordenação do ferro hemínico com a Met80 por um outro grupo, por exemplo resíduo de lisina. Podemos observar que a variação de pH 5,5 a 7,0 (aumento de 1,5 unidade de pH) leva um aumento de 6 resíduos de aminoácidos. Portanto, esta faixa de pH deve englobar a um aumento da modificação de aminoácidos do sítio L mais a Lys87 que foi identificada na digestão trípica quando o tratamento foi feito nesta faixa de pH. Entre pH 7,0 e 10,5 (3,5 unidades de pH), ocorre um aumento de apenas três modificações sugerindo que poucos resíduos básicos de

citocromo *c* possuem pK_a nesta faixa de pH. Entre pH 10,5 e 11,5 (1 unidade de pH) temos aumento de três modificações, indicando que nesta faixa também ocorre um desprotonamento de um número significativo de resíduos básicos. Embora citocromo *c* de cavalo tenha 24 resíduos básicos (19 lisinas e 3 histidinas e 2 argininas), o número máximo de modificações encontradas foi de 16 resíduos, mas não podemos nos esquecer que o número de modificações depende não só do pK_a do grupo como de sua acessibilidade para reagir com DEPC. Também foi testada a capacidade desses citocromo *c* carboxilados, descritos na **Figura 31**, de ligar em vesículas que mimetizam a membrana mitocondrial PCPECL via sítio L. O aumento de turbidez do meio, acompanhado em 480 nm, foi utilizado como um indicativo de que o citocromo *c* promovia fusão das vesículas, por ter a capacidade de ligar-se a duas vesículas via sítios A e L ao mesmo tempo em pH 6,2. A **Figura 32** mostra o efeito da carboxilação de citocromo *c* na sua capacidade em promover a fusão de vesículas PCPECL.

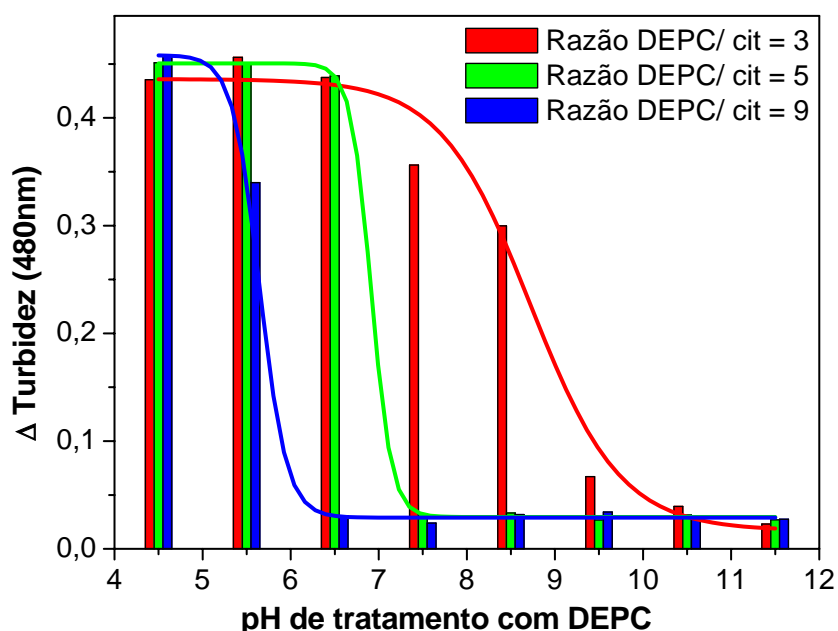


Figura 32. Capacidade de citocromo *c* carboxilado em promover fusão de vesículas PCPECL. Experimentos foram feitos a 30°C, na presença de vesículas de PCPECL 0,25 mM, na proporção 50/30/20 mol %, em HEPES 10mM pH 6,2, citocromo *c* 4 μM, após incubado por 600 segundos.

O citocromo *c* tratado com DEPC na razão DEPC/cit *c* 3/1 apresenta perda da capacidade de indução de fusão de vesículas de PCPECL quando o pH de tratamento está acima de 9,5 e, o ajuste sigmoidal dos valores de turbidez, representada em linha vermelha da **Figura 32**, indica a participação de grupos ionizáveis de $pK_a \sim 8,7$. Esse valor de pK_a possivelmente pode ser atribuído a resíduos de lisina envolvidas no sítio A entre outras. Por outro lado, o citocromo *c* tratado na razão DEPC/cit *c* 5/1 e 9/1 mostrou perda da capacidade de fusão de vesículas, quando tratado com DEPC em pHs mais ácidos, 7,5 e 6,5 respectivamente, sugerindo modificação do sítio L. Os valores de pK_a obtidos pela linha verde ($pK_a = 6,9$) e linha azul ($pK_a = 5,6$) sugerem pertencerem à ionização dos resíduos de lisina e histidina do sítio L, respectivamente.

4.1.6. Estudo comparativo da interação de citocromo *c* de cavalo e atum em lipossomos PCPECL

Diferentemente ao citocromo *c* de cavalo, a estrutura de citocromo *c* de atum apresenta os resíduos de histidina 33 e lisina 22 substituídos pelos resíduos de triptofano e asparagina respectivamente. Para o estudo comparativo da interação de citocromo *c* de cavalo e atum com membranas que mimetizam a membrana interna mitocondrial via sítio L, foi necessário realizar a extração e purificação de citocromo *c* de atum partindo de musculatura cardíaca de atum.

4.1.7. Isolamento e purificação de citocromo *c* de coração de atum

A **Figura 33** mostra o gel de SDS contendo a amostra de citocromo *c* de atum purificada.

Depois de concluído o processo de purificação da proteína citocromo *c* de atum (descrito no item Materiais e Métodos), a amostra também foi submetida a análise de espectroscopia de massa para determinação da massa molecular, na qual foram detectados dois distintos e significativos picos de 6.030,02 Da (forma duplamente ionizada - $[M + 2H]^{2+}$) e 12.046,15 Da (forma mono ionizada - $[M + H]^+$), como mostra a **Figura 34**.

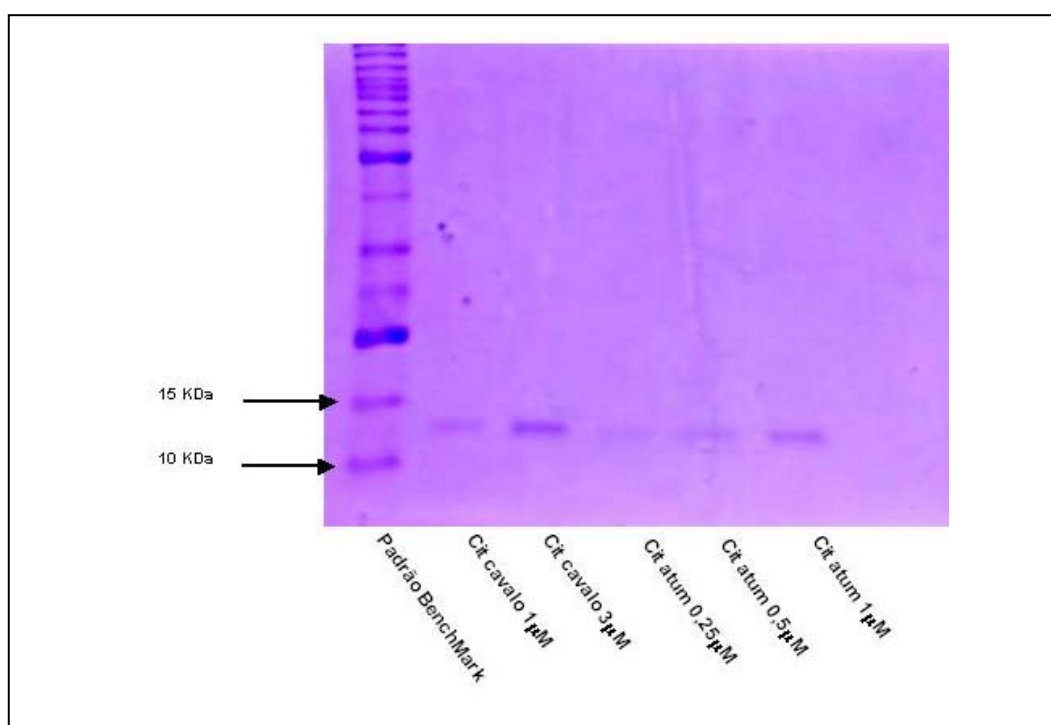


Figura 33. Gel de SDS contendo citocromo *c* extraído e purificado a partir de músculo cardíaco de atum. Da esquerda para direita: Padrão BenchMark Protein Ladder (Invitrogen), citocromo *c* de cavalo 1 μ M (Sigma), citocromo *c* de cavalo 3 μ M (Sigma), citocromo *c* de atum 0,25 μ M, citocromo *c* de atum 0,5 μ M e citocromo *c* de atum 1 μ M. Gel de SDS contendo 15 % poliacrilamida e corado com Coomassie Brilliant Brilliant Blue.

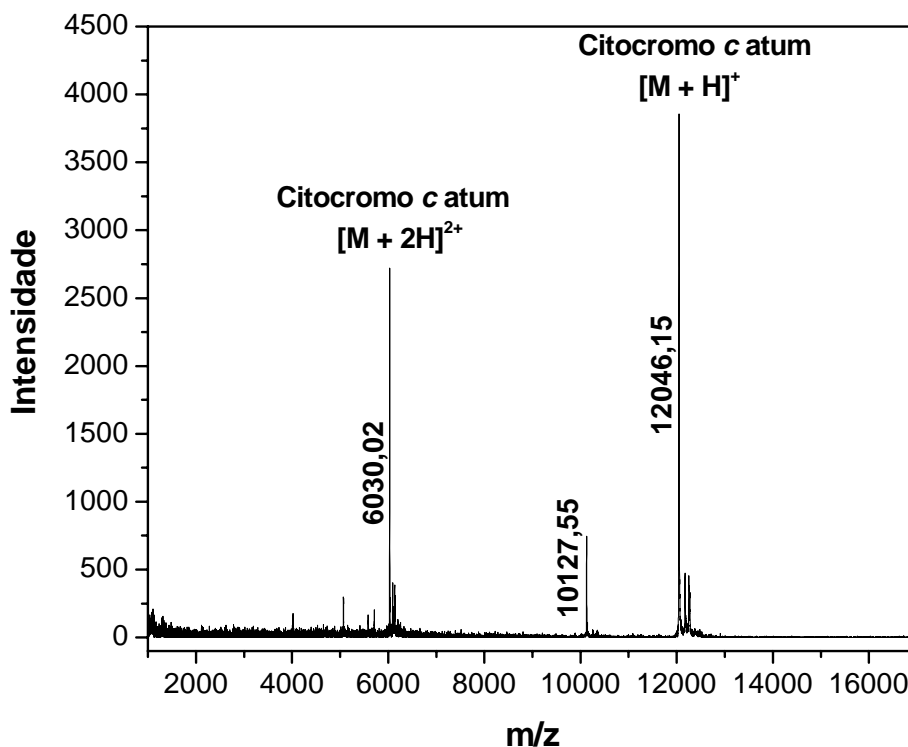


Figura 34. Espectros de massa (MALDI-ToF) de citocromo *c* de atum nativo. As amostras foram misturadas em volume igual de solução saturada (10 mg/ml) de sinapinic acid (SA) em acetonitrila 50 % e ácido trifluoracético 0,5 %, e aproximadamente 0,5 μ L dessa mistura foi aplicada sobre os slides de aço inox para análise no MALDI.

Também não foram constatadas mudanças na estrutura secundária e terciária da proteína isolada, na sua forma nativa (inserto da **Figura 35**) e base livre, como mostra os espectros de Uv-visível de citocromo *c* de atum e cavalo na **Figura 35**.

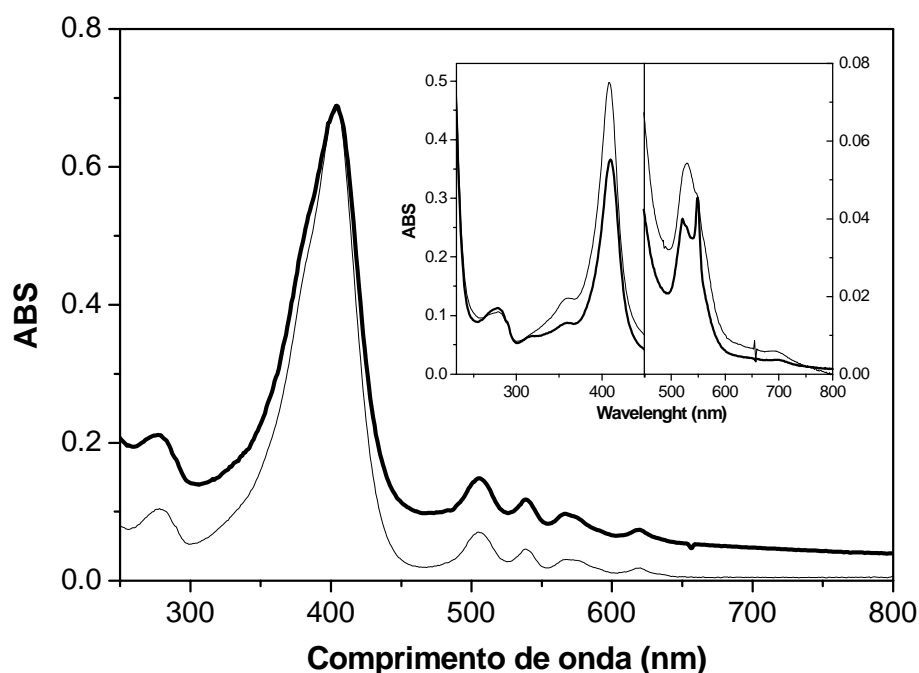


Figura 35. Espectros de de absorção em Uv-vis de citocromo *c* de atum purificado e citocromo *c* de cavalo procedente da Sigma na forma base livre. **Linha grossa:** citocromo *c* de atum purificado; **linha fina:** citocromo *c* de cavalo proveniente da Sigma. **Figura inserto:** cit *c* de atum e de cavalo na forma nativa. Os experimentos foram feitos nas seguintes condições: HEPES 10 mM pH 7,4, 25° C.

4.1.8 Dissociação de citocromo *c* de cavalo e atum de lipossomos

PCPECL

Obtida a proteína purificada, foi então estudado o papel dos resíduos de Lys22 e His33 na estrutura de citocromo *c* na capacidade de ligação e desligamento em lipossomos contendo lipídio carregado negativamente na faixa de pH 6,2 a 7,4. Para esses experimentos de interação, foram utilizados lipossomos contendo 1 mol % de fosfolipídio fluorescente PPDPC (1-palmitoyl-2-[10-(pyren-1-yl)decanoyl]-*sn*-glycerol-3-phosphocholine). Esse fosfolipídio, ao ser excitado em 344 nm, exibe uma emissão de fluorescência com o pico em 394 nm e, quando associado ao cit *c*, ocorre a supressão dessa fluorescência devido à transferência de

energia ressonante do marcador para o átomo de ferro do grupo heme de cit *c*. A capacidade de citocromo *c* de atum de ligar em lipossomos carregados negativamente, podendo ser acompanhada pela supressão da fluorescência do marcador de PPDPC, não difere com a de citocromo *c* de cavalo (dados não apresentados). Contudo, o desligamento de citocromo *c* de atum desse tipo de lipossomos pelo aumento da força iônica do meio (adição de NaCl), mostrou uma significativa diferença em relação ao encontrado para citocromo *c* de cavalo, como mostra a **Figura 36**.

Resultados utilizando lipossomos contendo POPG (1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycerol-3-phosphoglycerol), indicam que a afinidade de cit *c* (atum e cavalo) pela membrana é maior em pH 6,2 do que em pH 7,4, uma vez que o citocromo se desprende da membrana somente em maiores concentrações de NaCl em meio pH 6,2 (quadrados) do que em pH 7,4 (círculos) (**Figura 36 D, E e F**). As **Figura 36 A, B e C** mostram o desligamento de citocromo *c*, atum e cavalo, de lipossomos contendo cardiolipina no lugar de POPG. Em presença de 20 mol % de cardiolipina, tanto citocromo *c* de cavalo (símbolos fechados) quanto o de atum (símbolos abertos) não foram capazes de desligar da membrana em pH 7,4, enquanto que em pH 6,2, mostraram-se capazes de dissociar parcialmente da membrana (**Figura 36 A e B**). Esses resultados também indicam que cit *c* atum apresenta afinidade um pouco maior pela membrana em relação ao cit *c* cavalo, que deve ser decorrente da presença de um resíduo hidrofóbico (triptofano 33) no sítio L na estrutura de cit *c* atum. Contudo, em presença de lipossomos contendo 10 mol % de cardiolipina, ambos citocromos demonstraram baixa afinidade pela membrana, tendo a maioria das moléculas desligada dos lipossomos com 30 mM de NaCl tanto em pH 7,4 quanto em 6,2 (**Figura 36 C**).

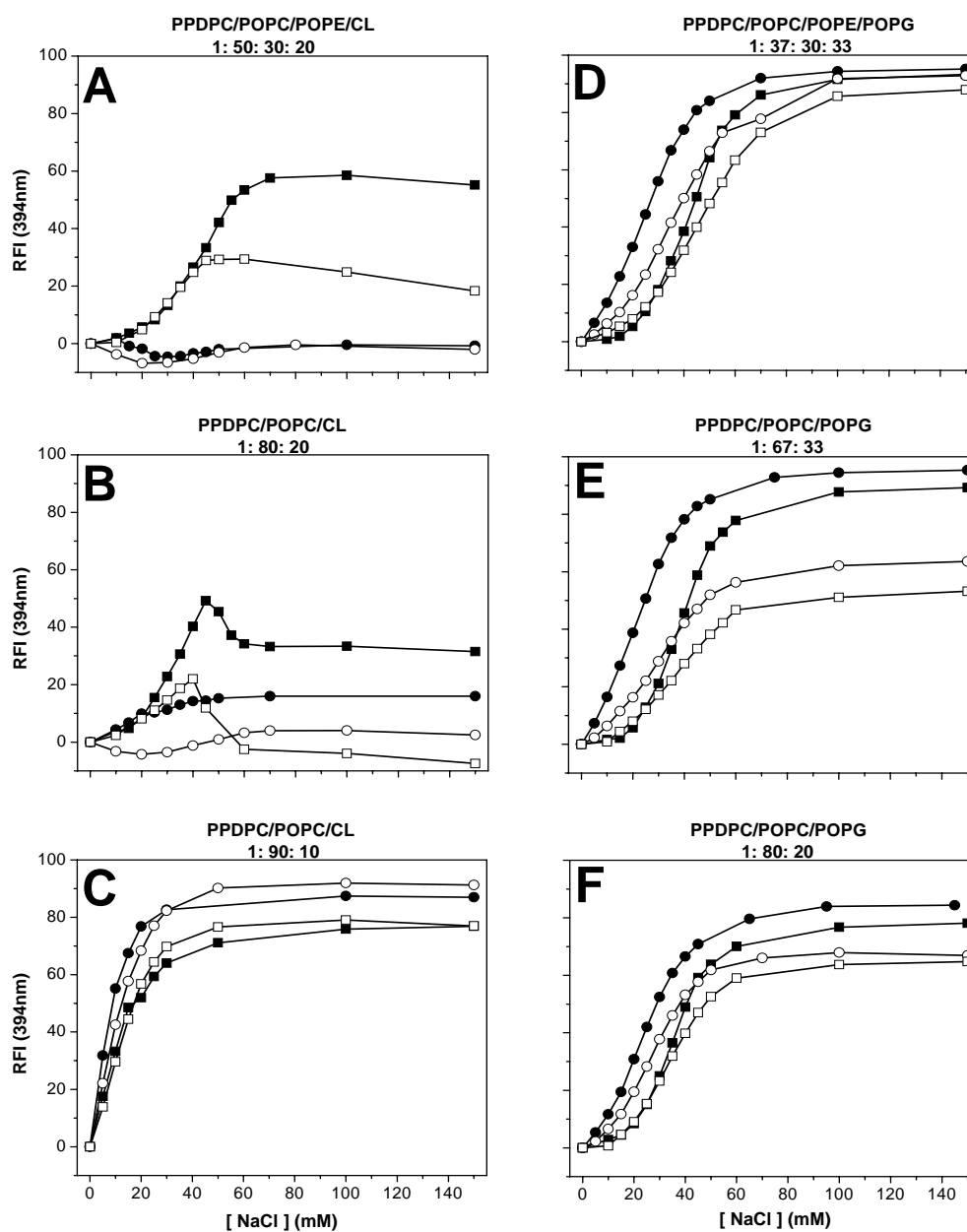


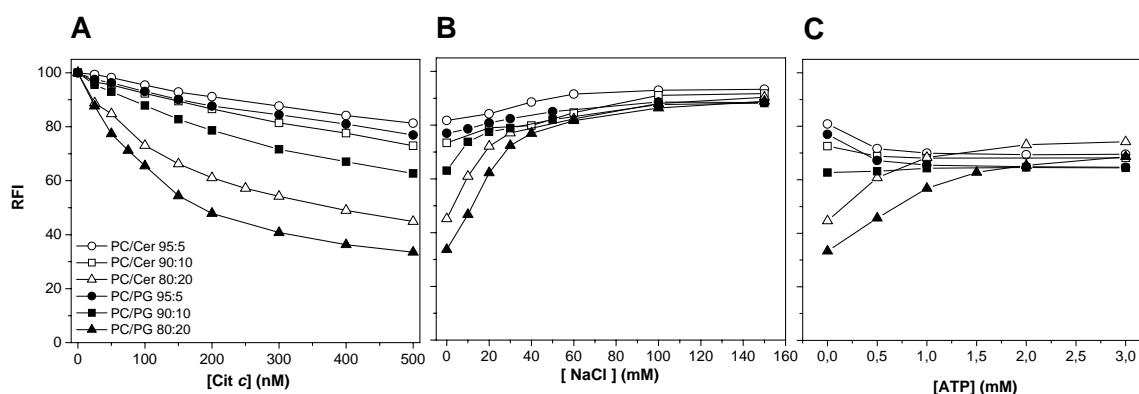
Figura 36. Desligamento de citocromo *c* de atum e cavalo associado em lipossomos pelo aumento da força iônica. Experimentos feitos nas seguintes condições: 0,25 μ M de proteína, 25 μ M lipossomos em tampão MES 20 mM pH 7,4 ou 6,2 contendo EDTA 1 mM, 30°C, excitação em 344 nm, emissão em 394 nm, fenda de excitação 5 nm e emissão 5 nm. **Símbolos fechados:** cit *c* cavalo; **Símbolos abertos:** cit *c* atum; **Círculos:** em pH 7,4; **Quadrados:** em pH 6,2; **(A)** lipossomos PPDPC/POPC/POPE/CL 1: 50: 30: 20 mol %, **(B)** lipossomos PPDPC/POPC/CL 1: 80: 20 mol %, **(C)** lipossomos PPDPC/POPC/CL 1: 90: 10 mol %, **(D)** lipossomos PPDPC/POPC/POPE/POPG 1: 37: 30: 33 mol %, **(E)** lipossomos PPDPC/POPC/POPG 1: 67: 33 mol % e **(F)** lipossomos PPDPC/POPC/POPG 1: 80: 20 mol %. **RFI**, unidade relativa de fluorescência.

Esses resultados sugerem que, em pH 7,4, pelo fato de cit *c* apresentar dois sítios disponíveis para interação com membranas, sítio A (eletrostático) e C (hidrofóbico), promovendo a formação de interação lipídio estendida entre a cadeia acil do fosfolipídio (no caso, da cardiolipina) e o sítio C na estrutura de citocromo *c*, uma vez que este sítio encontra-se muito próximo ao sítio A, não permitindo o desligamento pelo aumento da força iônica do meio. Contudo, em pH 6,2, o sítio L também encontra-se disponível para interação com membranas mas que, está localizado ao lado oposto ao sítio C, permitindo assim, o desligamento da proteína pela adição de NaCl no meio. No caso da **Figura 36 B**, baixas concentrações de NaCl promoveram o desligamento da proteína da membrana, mas concentrações maiores, a partir de 50 mM, provavelmente favoreceram também a interação hidrofóbica (lipídio estendida), explicando assim a supressão da fluorescência.

4.1.9 Efeito de ceraminda na afinidade de citocromo *c* de cavalo e atum com lipossomos PCPECL

O efeito de ceramidas na interação de citocromo *c* com membranas também foi estudado utilizando a técnica de transferência de energia ressonante entre fosfolipídio PPDPC e cit *c*. Cit *c* demonstrou menor afinidade por lipossomos contendo de 0 - 20 mol % de N-Octanoyl (8:0) Ceramide-1-Phosphate (NH_4^+) em relação a membranas contendo POPG, como mostra a **Figura 37 A**, tanto em pH 7,4 quanto em 6,2. As **Figura 37 B** e **C** mostram o desligamento de cit *c* dessas membranas contendo ceramida-1-fosfato pelo aumento da força iônica (NaCl) e pela presença de ATP, respectivamente.

pH 7,4



pH 6,2

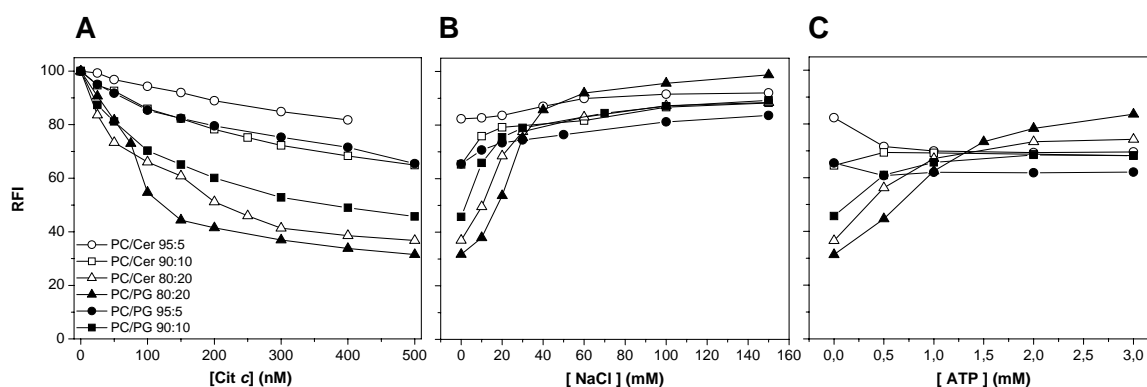


Figura 37. Associação de citocromo *c* em lipossomos contendo diferentes concentrações de ceramida-1-fosfato em meio pH 7,4 e 6,2. Experimentos feitos nas seguintes condições: 0,25 μM de cit *c*, 25 μM lipossomos em tampão MES 20 mM pH 7,4 ou 6,2 contendo EDTA 0,1 mM, 30°C, comprimento de onda de excitação em 344 nm e, emissão em 394 nm, fenda de excitação 5 nm e emissão 5 nm, (RFI) Intensidade Relativa de Fluorescência. (A) titulação de citocromo *c* nativo de cavalo, (B) titulação de NaCl e (C) titulação de ATP.

Em ambos pHs, 7,4 e 6,2, o aumento da força iônica pela presença de NaCl mostrou-se eficiente no desligamento da proteína associado a lipossomos carregados negativamente por ceramida-1-fosfato ou POPG. Trabalhos sobre o efeito de ATP em cit *c* associado a membranas têm indicado que o nucleotídeo pode induzir mudanças estruturais em citocromo

c, entre elas, redução de estabilidade térmica e auto-oxidação da proteína forma reduzida, alterações na estrutura secundária (LONGWORTH, 1971; FASMAN, 1975; TUOMINEN et al., 2001), desfavorecendo a sua interação com membranas. Contudo neste caso, o nucleotídeo favoreceu a associação da proteína com lipossomos em baixas concentrações de fosfolípido ácido (5 mol %) e, desfavoreceu a interação em presença de lipossomos contendo altas concentrações de fosfolípido ácido (10 e 20 mol %).

4.1.10. Monitoramento da interação de citocromo *c* em monocamadas lipídicas por SPR

A interação de citocromo *c* nativo com monocamada de PCPECL também foi estudada por medidas de SRP (surface plasmon resonance). A **Figura 38** mostra o efeito de pH na interação de citocromo *c* com monocamada lipídica em função do índice de refração.

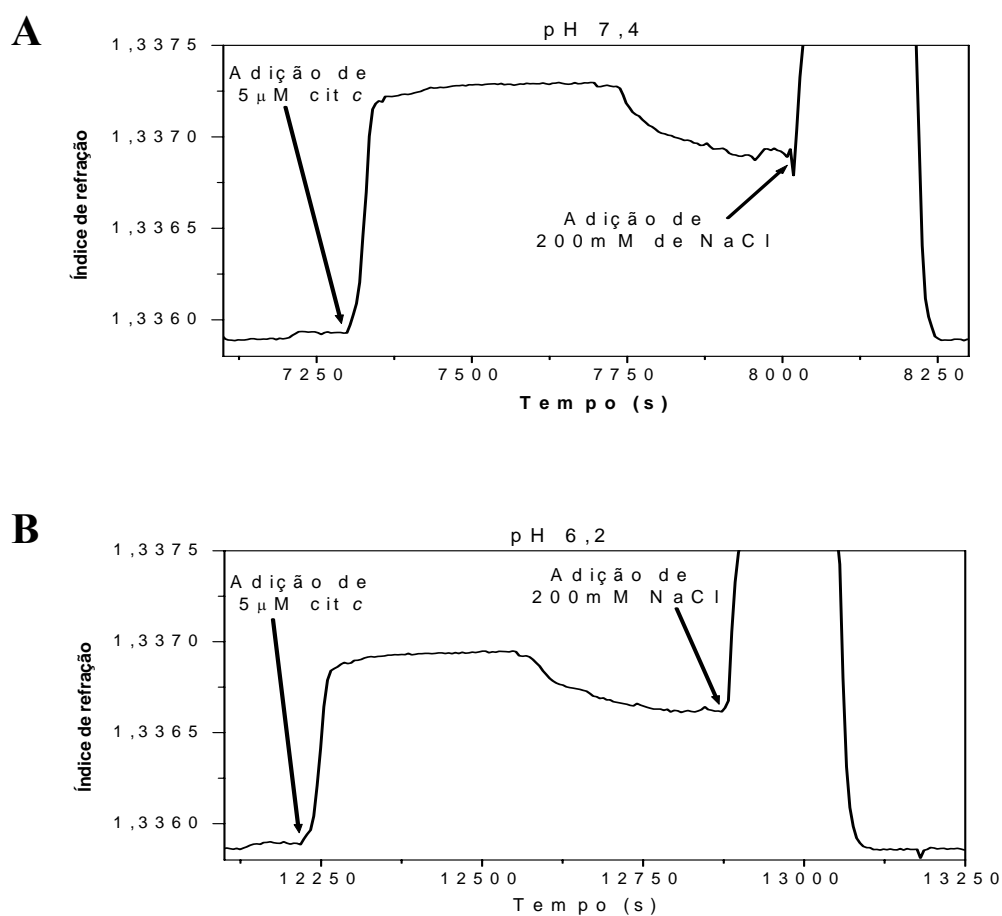


Figura 38. Índice de refração em função de tempo após injeção de citocromo *c* 5 μ M em pH 7,4 (A) e 6,2 (B) sobre monocamada de PCPECL. Experimentos feitos nas seguintes condições: 25°C, monocamada de PCPECL, na proporção 50/30/20 mol %, sobre uma superfície de ouro, em tampão HEPES 10 mM pH 7,4 ou 6,2, citocromo *c* 5 μ M (solubilizado em tampão HEPES 10 mM pH 7,4 ou 6,2).

A **Figura 39** mostra a variação do índice de refração (Δ índice de refração, calculado subtraindo-se o índice de refração da monocamada contendo citocromo *c*, após lavado em tampão, pelo índice de refração da monocamada antes da adição de citocromo *c*) em função da concentração da amostra de citocromo *c* em pH 7,4 e 6,2.

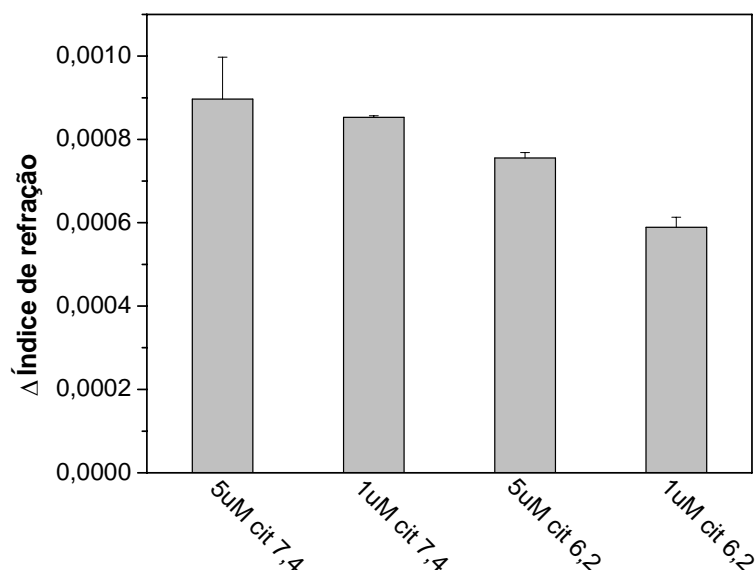


Figura 39. Δ Índice de refração em função da concentração de citocromo *c* em pH 7,4 e 6,2. Experimentos feitos nas seguintes condições: 25° C, monocamada de PCPECL, na proporção 50/30/20 mol %, sobre uma superfície de ouro, em tampão HEPES 10 mM pH 7,4 ou 6,2, citocromo *c* 5 ou 1 μM (solubilizado em tampão HEPES 10 mM pH 7,4 ou 6,2).

Na **Figura 39**, a variação do índice de refração da superfície na presença de citocromo *c* em pH 7,4 é maior do que em pH 6,2, indicando que em pH 7,4 adsorção da superfície pelo citocromo *c* é maior. Apesar de citocromo *c*, em pH 7,4, apresentar somente o sítio A disponível para interação com membranas, esse sítio encontra-se muito próximo ao sítio C, este permite a capacidade de citocromo *c* de formar uma interação do tipo lipídeo estendida com a membrana, enquanto que, em pH 6,2, o citocromo *c* apresenta em sua estrutura ambos os sítios A e L disponíveis, que podem competir pela interação com membranas, contudo, pelo sítio L, o citocromo *c* poderia possuir uma interação com membrana mais fraca do que pelo sítio A (**Figura 40**), podendo o citocromo *c* ser mais facilmente removido durante o fluxo e lavagem com o tampão.

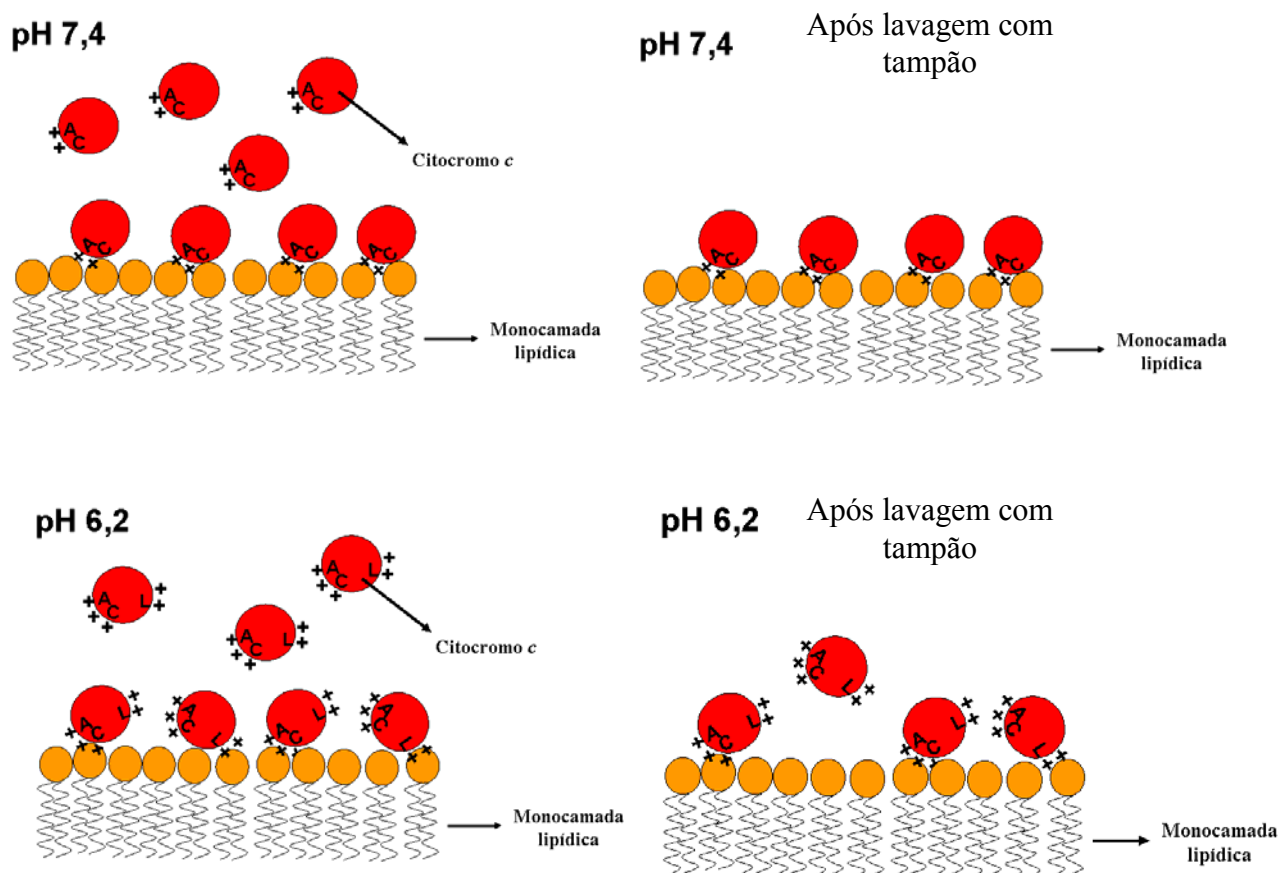


Figura 40. Interação de citocromo *c* com monocamada lipídica em pH 7,4 e 6,2. Sítio A (representado como A), sítio C (C) e L (L).

Esses resultados sugerem que a interação lipídio estendida entre a cadeia acil do fosfolipídio e o sítio C na estrutura de citocromo *c*, permite uma associação mais forte entre o lipídio e a proteína via sítio A em relação ao sítio L. Estes dados corroboram com dados na literatura sobre a interação da cadeia acil do fosfolipídio na estrutura de cit *c* (ZUCCHI et al., 2003).

4.1.11. Interação de citocromo *c* com membrana interna mitocondrial de mitoplastos e produção de ATP

Os resultados mostrados até o momento indicam que a interação de citocromo *c* com a membrana interna mitocondrial pode ser modulada pelo potencial transmembrana ($\Delta\Psi$). O aumento do pH no espaço entre membranas, como resultado da perda do potencial transmembrana, pode levar a desprotonação dos aminoácidos que compõem o sítio L e contribuir para o desligamento de citocromo *c* da membrana interna mitocondrial, desencadeando assim, o processo de apoptose no citosol. O papel biológico do sítio L na estrutura de citocromo *c* foi averiguado pela sua associação com a membrana interna mitocondrial na faixa de pH de 6,2 a 7,4, compatível com o encontrado em mitocôndrias no estado acoplado, ou na presença de inibidores respiratórios ou agentes desacopladores (NICHOLLS, FEGUSON, 1992; ERNSTER, 1992). Para esse estudo, foram isolados mitoplastos (MP) (mitocôndrias desprovidas de membrana externa) de fígado de rato os quais foram depletados de citocromo *c*. Estes não exibiam respiração (consumo de oxigênio), contudo, a adição de citocromo *c* nativo ao meio restaura a sua capacidade de respiração.

A ligação de citocromo *c* com membranas de mitoplastos de fígado de rato foi acompanhada pelo consumo de oxigênio da organela e, conseqüente capacidade de produção de ATP, após adição de ADP ao meio. A **Figura 41** mostra que, mitoplastos em meio a pH 7,4 (linha a), na adição de 0,4 nmol citocromo *c*/ mg proteína levou a um significativo aumento da taxa de respiração (28,4 nmol de oxigênio.min⁻¹) três vezes maior ao exibido pela mitocôndria íntegra no estado 2 (9,4 nmol de oxigênio.min⁻¹, linha b). Em comparação com o bem estabelecido comportamento do consumo de oxigênio pela mitocôndria, mostrado na **Figura 41** (linha b), a adição de ADP aos mitoplastos respirando em presença de citocromo *c*, em pH 7,4 (**Figura 41** linha a), foi observado um leve aumento na taxa de respiração pela

organela e, a taxa de respiração no estado 4, decorrente da depleção de ADP não atingiu a depleção de oxigênio. O valor da taxa de respiração de mitoplastos em estado 2, meio pH 6,2, foi cerca de 10,1 nmol de oxigênio.min⁻¹ (**Figura 41**, linha c), próximo ao da mitocôndria íntegra (9,4 nmol de oxigênio.min⁻¹). Entretanto, de modo similar ao observado em mitoplastos pH 7,4, a adição de ADP em mitoplastos respirando pH 6,2, foi também acompanhado um aumento na taxa de respiração da organela (de 10,1 para 15,4 nmol de oxigênio.min⁻¹). Em pH 6,2, a taxa de respiração dos mitoplastos no estado 4 (10,6 nmol de oxigênio.min⁻¹) poderia ser medido antes da depleção total do oxigênio.

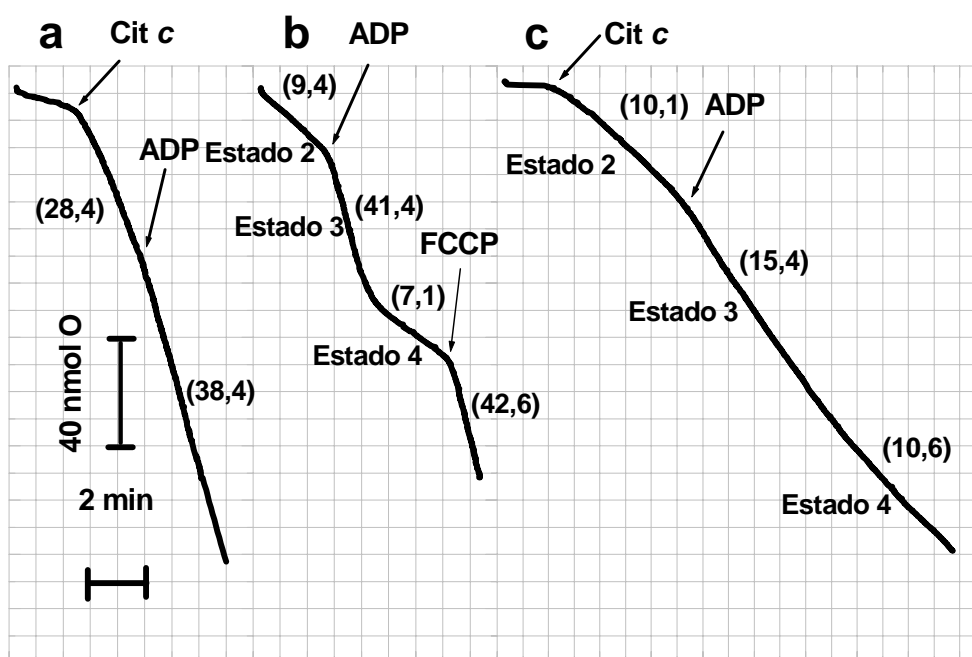


Figura 41. Efeito de pH na taxa de respiração e fosforilação de mitoplastos e mitocôndria isolados. Os experimentos foram feitos usando uma suspensão de organelas contendo 2 mg de proteína/ mL, a 30°C em pH 7,4 (linhas a e b) e em pH 6,2 (linha c), em presença de succinato 5 mM. No tempo indicado, 400 nmol de ADP foram adicionados ao meio. Citocromo c foi adicionado em concentração final de 0,4 nmol/mg de proteína. FCCP (desacoplador) 1 μ M foi adicionado na mitocôndria como um controle de organela acoplada. A adição de ADP promove a produção de ATP levando a uma alteração do potencial de membrana ($\Delta\Psi$) e aumento da taxa de respiração, que é caracterizado como mitocôndria no estado 3. O estado 3 termina com a depleção de ADP e seguida pela diminuição da taxa de respiração.

Para a atividade da cadeia respiratória de MPC, era fundamental a alcalinização da matriz que, por outro lado, poderia ser acidificada pelo primeiro ciclo de fosforilação, desfazendo o $\Delta\Psi$. Em mitocôndrias isoladas, a fosforilação de ADP pelas organelas tráz os prótons de volta para a matriz mitocondrial e gera um desequilíbrio no gradiente eletroquímico até a depletação de todo ADP. Nos mitoplastos a quantidade de prótons do meio externo é maior do que no espaço intermembranas encontrado em mitocôndrias intactas. Além disso, a entrada de prótons do lado externo para a matriz durante o processo de fosforilação promovido pelos mitoplastos deve promover um decréscimo significativo do pH da matriz, mas não um aumento significativo do pH externo.

Essa característica dos mitoplastos é uma conseqüência da ausência da membrana externa que previne um significativo decréscimo do $\Delta\Psi$ durante a fosforilação, resultando em um leve aumento da taxa de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória (**Figuras 41 e 42 A, círculos abertos**). A **Figura 42 A** mostra a velocidade de consumo de oxigênio pelos mitoplastos supridos de citocromo *c* em função de pH (círculos abertos) e a produção de ATP promovido por essas organelas (barras). Em comparação aos resultados obtidos para a velocidade de consumo de oxigênio, foram plotados os valores da força prótom motiva da variação do gradiente eletroquímico de prótons, $\Delta\mu\text{H}^+$ (em círculos fechados), e de ΔpH (quadrados abertos), calculados a partir das equações descritas no trabalho de Chacon e colaboradores (CHACON, et al. 1994):

$$\Delta p = \Delta\Psi - 2,3RT\Delta\text{pH} \quad (\text{Eq. 7})$$

$$\Delta p = \Delta\Psi - 60\Delta\text{pH} \quad (\text{Eq. 8})$$

A produção de ATP pelos MPC foi dependente do transporte de elétrons da cadeia respiratória, uma vez que a produção foi completamente inibida pela presença de Antimicina A (AA), um inibidor do complexo III da cadeia respiratória (**Figura 42 B**).

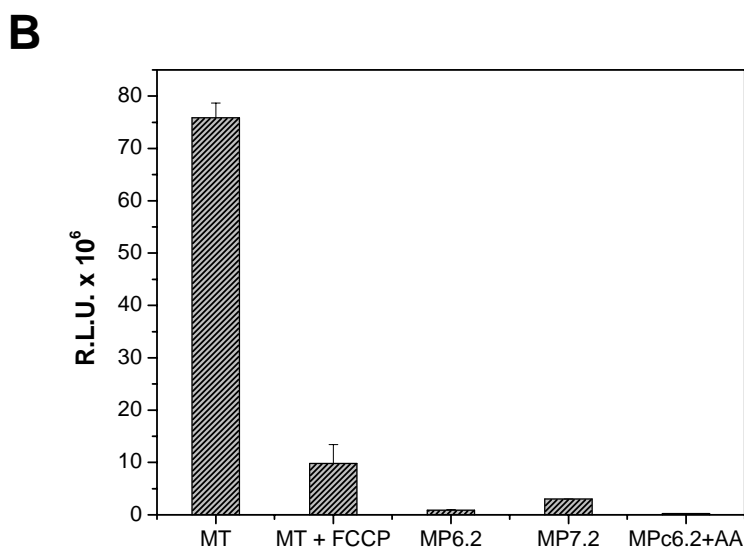
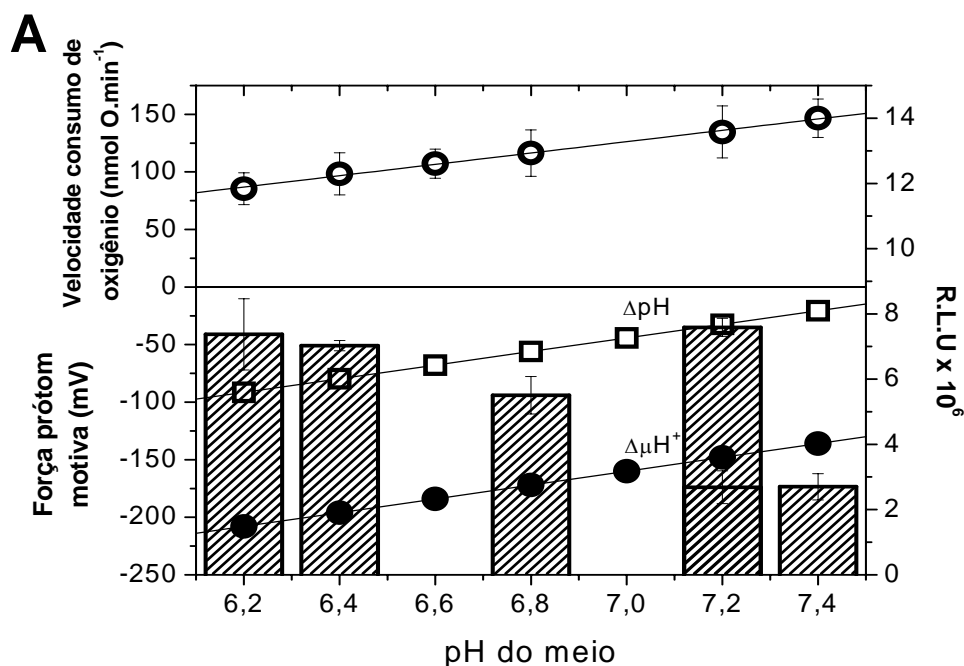


Figura 42. Efeito de pH no funcionamento de mitocôndrias em diferentes condições. Barras representam a produção de ATP correspondente (em R.L.U.). **A** – círculos abertos correspondem a velocidade de consumo de oxigênio pelos mitoplastos em função de pH do meio (em nmol O. min⁻¹); quadrados abertos e círculos fechados correspondem ao valor da força prótom motiva da variação do gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$) e de ΔpH , respectivamente. **B** – produção de ATP (R.L.U.) de controles: da mitocôndria acoplada e desacoplada em pH 7,4 (MT e MT + FCCCP, respectivamente); mitoplastos depletados de citocromo *c* em pH 6,2 e 7,2 (MP6.2 e MP7.2, respectivamente) e mitoplastos supridos de citocromo *c* em pH 6,2 na presença do inibidor da cadeia respiratória Antimicina A (MPc6.2 + AA). Os experimentos foram realizados usando uma suspensão contendo organelas 2 mg proteína/ml, a 30° C, no pH indicado e na presença de succinato 5 mM e ADP 270 μM . Quando presente, a concentração de ambos FCCCP e Antimicina A foi de 1,0 μM . A concentração de citocromo *c* adicionado ao meio foi de 0,4 nmol/mg de proteína. A produção de ATP foi quantificada pelo uso do kit ATP Monitoring Reagent (BioOrbit), contendo luciferina, e foi proporcional as unidades de luminescência relativa do sistema.

A **Figura 42 A** (barras) mostra o funcionamento dos mitoplastos em função de pH. Os resultados indicam que eles funcionam mais eficientemente em pH 6,2 do que em pH 7,2, provavelmente devido à protonação do sítio L favorecendo a ligação de citocromo *c* a membrana dos mitoplastos. Em vista disto, os valores de pK_a obtidos pelo ajuste de curva, utilizando a **Eq. 4**, dos dados da taxa máxima de respiração e produção de ATP, foram coincidentes ao previamente obtido para fusão de vesículas promovida pelo citocromo *c* ($pK_{aapp} \sim 7$). A atribuição da protonação do sítio L de citocromo *c*, como uma etapa limitante para a ligação da proteína na membrana dos mitoplastos, foi provada pela comparação da afinidade exibida pelo citocromo *c* de coração de cavalo (composição do sítio L: Lys22, Lys25, His26, Lys27 e His33), citocromo *c* de atum (composição do sítio L: Asn22, Lys25, His26, Lys27 and Trp33) e citocromo *c* quimicamente bloqueado neste sítio por dietilpirocarbonato (DEPC), pela membrana de mitoplastos.

A **Figura 43** compara a taxa de respiração máxima de mitoplastos supridos de citocromo *c* de atum e cavalo em função da concentração da proteína, ambas em pH 7,2 e 6,2.

A **Figura 44 A** mostra o gráfico dos duplos-recíprocos da taxa de respiração de MPC em função do concentração de citocromo *c* de cavalo (símbolos fechados) e atum (símbolos abertos), em meio pH 7,2 (quadrados) e 6,2 (círculos), dados obtidos pela **Figura 43**. Em mitoplastos saturados de citocromo *c*, a taxa de respiração (v_{max}), extraído do intercepto da ordenada, foi determinada pelo pH do meio que é responsável pela magnitude do $\Delta\Psi$ e não pelo tipo de citocromo *c*. Para citocromo *c* de cavalo e atum, dois tipos de ligação foram observados: um de alta afinidade ($K_{Sapp} \sim 10$ nM), independente de pH e, um de baixa eficiência mas dependente de pH. A ligação pH-independente provavelmente envolve alguns tipos de interações do tipo hidrofóbicas entre proteína/membrana e está de acordo com dados da literatura, os quais relatam que citocromo *c* residual mantêm-se ligado a membrana da organela em alta força iônica (RYTÖMAA, KINNUNENM 1995; RYTÖMAA,

MUSTONEN, KINNUNEN, 1992 e RADY, BUSH, FREEMAN, 1993). A ligação de citocromo *c* aos mitoplastos de maneira pH-independente contribui para a respiração da organela, dado que, Antimicina A inibe completamente o consumo de oxigênio nestas condições.

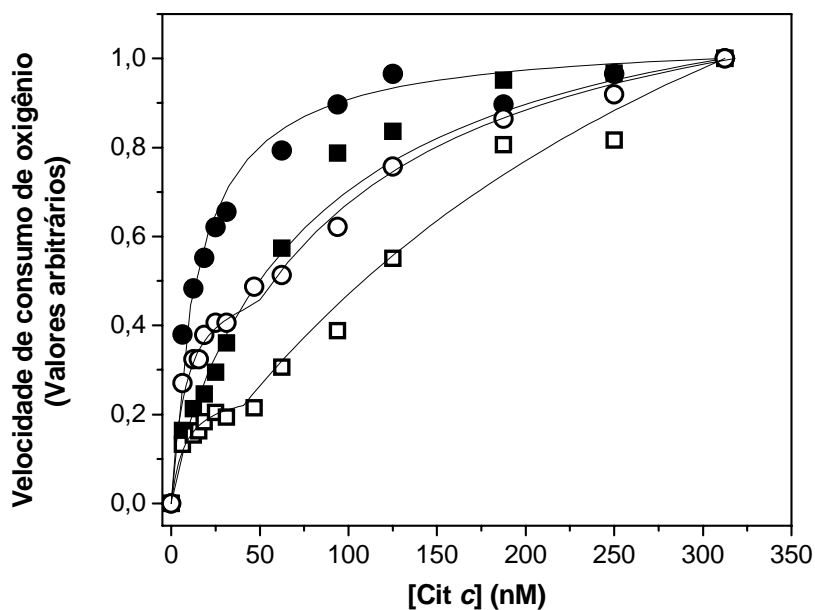


Figura 43. Dados normalizados da taxa máxima de respiração de mitoplastos depletados de citocromo *c* em função da concentração de citocromo *c* adicionado. Concentrações diferentes de citocromo *c* de cavalo (símbolos fechados) e atum (símbolos abertos) foram adicionados ao meio pH 7,2 e 6,2 (quadrados e círculos, respectivamente). Os experimentos foram realizados usando uma suspensão contendo organelas 2 mg proteína/ml, a 30° C, no pH indicado e na presença de succinato 5 mM. As linhas sólidas representam o ajuste da curva, utilizando a equação 3.

A **Tabela 9** abaixo mostra o consumo de oxigênio pelos mitoplastos (em nmol O/min) na ausência e presença de Antimicina A (inibidor do complexo III da cadeia respiratória - AA) em baixa concentração de citocromo *c* para averiguar a possibilidade de consumo inespecífico de oxigênio pelos mitoplastos na faixa independente de pH.

Tabela 9. Velocidade de consumo de oxigênio pelos mitoplastos na presença e ausência de antimicina A (nmol O/mg/min).

	Ausência de cit <i>c</i>	+ 0,02nmol cit <i>c</i>	+ 1,0 µg AA/ml
Mitoplasto em meio pH 6,2	13,34	25,01	3,33
Mitoplasto em meio pH 7,2	10,00	23,30	3,33

Os experimentos foram realizados usando uma suspensão contendo organelas 2 mg proteína/ml, a 30° C, no pH indicado e na presença de succinato 5 mM e ADP 270 µM. A concentração de Antimicina A foi de 1,0 µM e de citocromo *c* adicionado ao meio foi de 0,02 nmol/mg de proteína.

Na presença de Antimicina A (AA), a taxa de consumo de oxigênio pelos mitoplastos supridos por citocromo *c* é reduzida significativamente, tanto em pH 7,2 quanto 6,2, indicando que o consumo é realmente decorrente do transporte de elétrons da cadeia respiratória. O fato do valor do consumo de oxigênio, na presença do inibidor, ser menor do que a do consumo inicial (mitoplastos na ausência de cit *c*) pode ser explicado pela presença de uma pequena parcela de citocromo *c* residual que não foi removido completamente durante o procedimento de obtenção de mitoplastos.

A adição de citocromo *c* de cavalo a mitoplastos, em concentrações acima a 0,04 nmol cit *c*/mg de proteína, restaurou a respiração da organela de maneira pH dependente. Para citocromo *c* de atum, cuja estrutura exhibe Lys22 e His33 substituídas por um resíduo de Asn e Trp (**Figura 44 B**), respectivamente, concentrações acima de 0,075 nmol cit *c*/mg de proteína também restaurou a respiração de maneira pH dependente. Entretanto, para citocromo *c* de cavalo, o decréscimo de pH de 7,2 para 6,2 levou a queda do valor de $K_{s_{app}}$ cerca de 6,5 vezes (de 111 a 17 nM), enquanto que, para citocromo *c* de atum, o $K_{s_{app}}$ diminuiu 3,5 vezes (de 400 para 111 nM) em resposta ao decréscimo de pH.

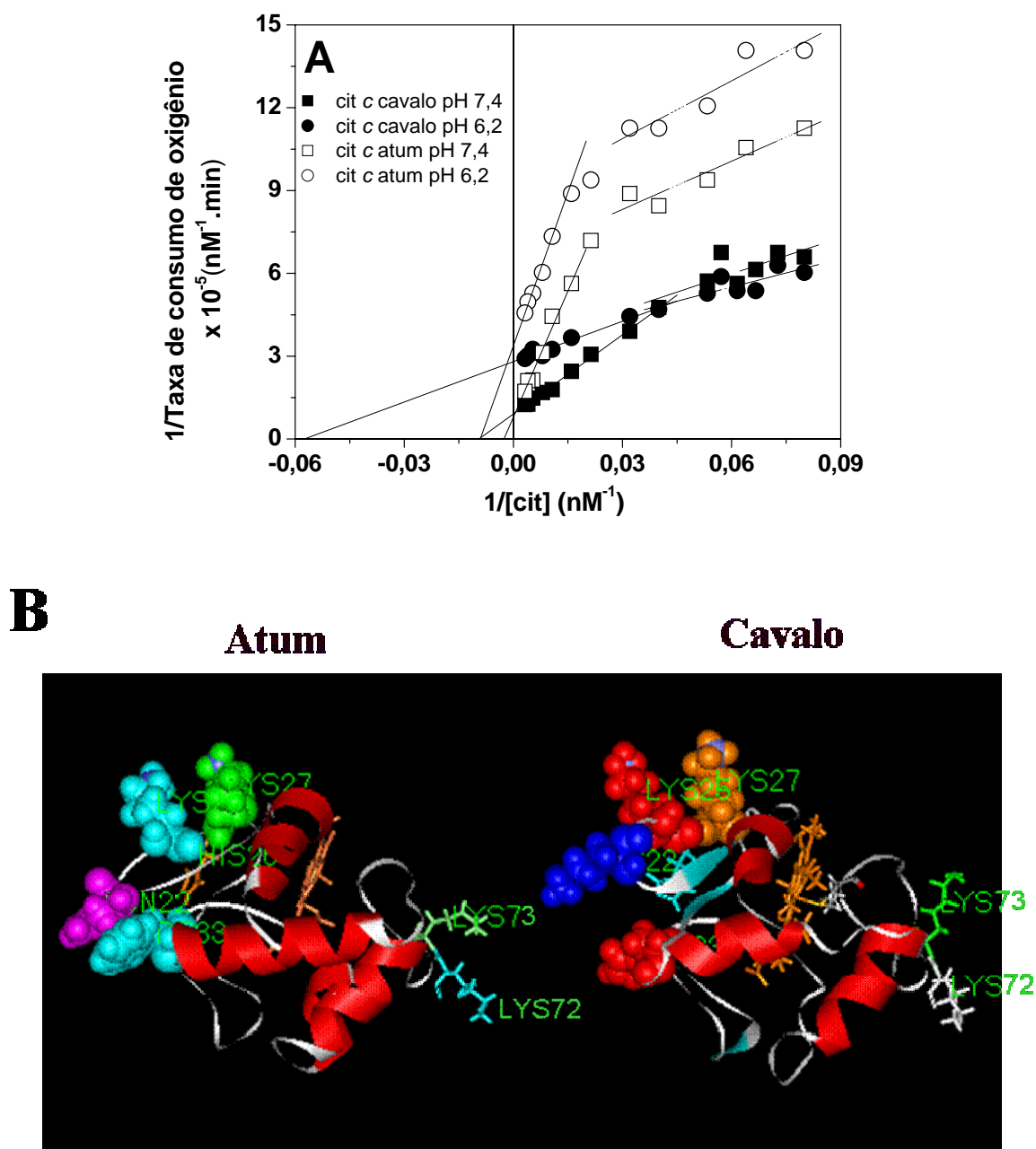
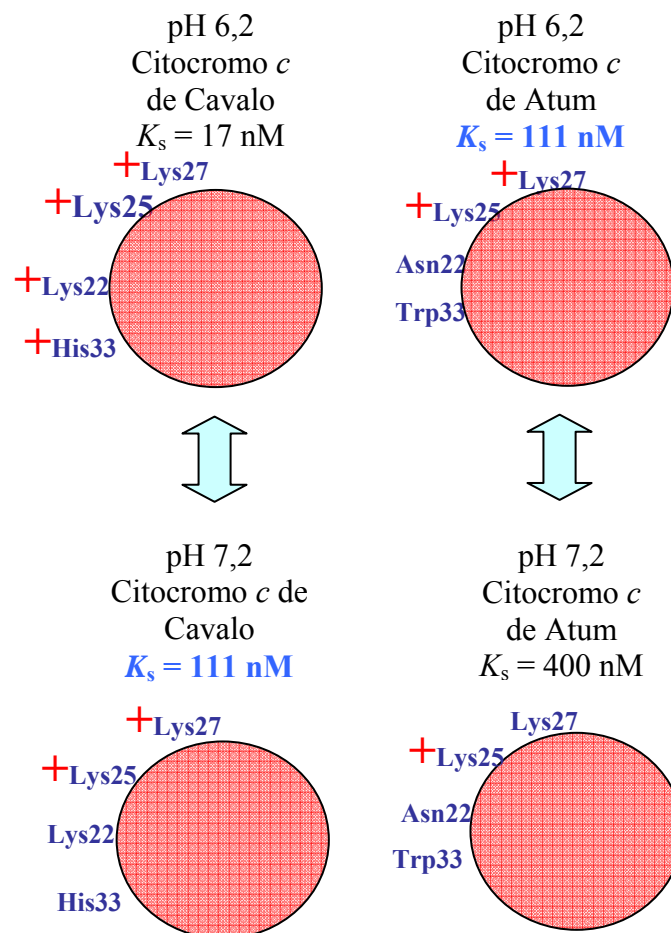


Figura 44. (A) Gráfico dos duplos recíprocos da taxa de respiração de mitoplastos depletados de citocromo *c* em função da concentração de citocromo *c*. Concentrações diferentes de citocromo *c* de cavalo (símbolos fechados) e atum (símbolos abertos) foram adicionados ao meio pH 7,2 e 6,2 (quadrados e círculos, respectivamente). Os experimentos foram realizados usando uma suspensão contendo organelas 2 mg proteína/ml, a 30° C, no pH indicado e na presença de succinato 5 mM. As linhas sólidas e pontilhadas representam o ajuste da curva nos respectivos dados de pH dependente e independente, utilizando a equação 4. **(B) Estruturas tridimensionais de citocromo *c* utilizando dados cristalográficos, indicando o posicionamento dos resíduos de aminoácidos presente no sítio L.** Citocromo *c* de cavalo está mostrado no lado direito do painel e de atum no lado esquerdo. A figura 44 B foi elaborada no programa Swiss-PDB Viewer utilizando dados de BANCI et al., 1997 e DICKERSON et al., 1971, disponíveis pelo site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=2554674>. Acesso em: 24 de jan. 2007.

Considerando que em citocromo *c* de atum a afinidade pela membrana do mitoplasto decaiu 3,5 vezes em pH 7,2, é provável que pelo menos um resíduo de aminoácido básico presente no sítio L desta proteína exibe um valor de pK_a muito menor em comparação com citocromo *c* de cavalo e que contribui significativamente para a interação com a membrana interna mitocondrial.

Estas propostas estão sumarizadas no esquema a seguir, que mostra a constante macroscópica de dissociação ($K_{s,app}$) das cargas positivas do sítio L dependentes de pH de citocromo *c* de cavalo e atum.



De modo interessante, a **Figura 43 A** revela que em pH 7,2, na qual os aminoácidos do sítio L deveriam estar desprotonados, citocromo *c* de cavalo apresentou uma afinidade à membrana do mitoplasto idêntica ao observado para citocromo *c* de atum em pH 6,2. Este resultado sugere que as cadeias laterais de Lys22 e His33 do citocromo *c* de cavalo são os grupos ionizáveis envolvidos na ligação de citocromo *c* com a membrana interna mitocondrial. Diferentemente do citocromo *c* de cavalo, o citocromo *c* de atum não foi capaz de promover fusão de vesículas PCPECL em pH 6,2 (dados não mostrados).

Como demonstrado nos resultados anteriores, a carboxilação por DEPC bloqueia seletivamente as cadeias laterais de aminoácidos ionizáveis de citocromo *c* cujos valores de pK_a estão abaixo do pH do meio. Uma amostra de citocromo *c* carboxilado, previamente caracterizado por análises de espectroscopia de massa por MALDI-ToF que apresenta o sítio L quimicamente bloqueado (**Figura 32**), foi testado para restaurar a atividade dos mitoplastos depletados de citocromo *c*. A **Figura 45** (barras) mostra a produção de ATP relativa (R.L.U.) correspondente de citocromo *c* nativo e carboxilado com excesso molar de 5 vezes DEPC, tratado em pH 6,5 e 7,5. Esses resultados estão de acordo com a taxa de respiração, no qual bloqueio químico mais eficiente do sítio L, abaixou a capacidade de citocromo *c* de restaurar a produção de ATP em mitoplastos na presença de ADP. Esse resultado foi comparado com a afinidade de citocromo *c* nativo de ligar membrana interna mitocondrial ($1/K_{s_{app}}$) em diferentes valores de pH (**Figura 45, círculos fechados**).

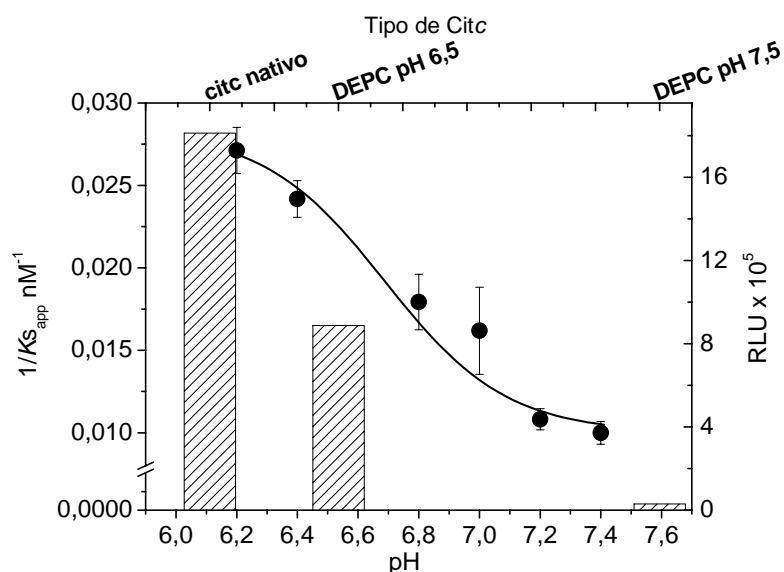


Figura 45. Efeito de pH do tratamento de citocromo *c* com DEPC na produção de ATP pelos mitoplastos supridos de citocromo *c* DEPC modificado e, efeito de pH na afinidade de citocromo *c* pela membrana interna mitocondrial. Os experimentos foram realizados usando uma suspensão contendo organelas 2 mg proteína/ml, a 30° C, no pH indicado e na presença de succinato 5 mM. A concentração de citocromo *c* adicionado foi de 0,4 nmol/mg proteína. A produção de ATP foi quantificado pelo uso do kit ATP Monitoring Reagent kit (BioOrbit), e foi proporcional as unidades relativa de luminescência do sistema. Os círculos fechados mostram a afinidade de citocromo *c* nativo pela membrana interna mitocondrial ($1/K_{s_{app}}$) em diferentes valores de pH obtidos do gráfico dos duplos recíprocos da taxa de respiração em função da concentração de citocromo *c* adicionado ao meio. Os dados foram ajustados utilizando a equação 4, representado pela linha sólida.

Esses valores foram obtidos do gráfico dos duplos recíprocos das taxas de respiração em função da concentração de citocromo *c* adicionado ao meio (**Figura 44 A** para pH 7,2 e 6,2 e, resultados não mostrados para pH 6,4, 6,8, 7,0, 7,4 e 7,5). O ajuste da curva dos dados pela **Eq. 4** revelaram que o valor de $pK_{a_{obs}}$ da respiração estabelecida pelo citocromo *c* foi de 6,79 (+/- 0,028), um valor idêntico ao observado ao testar a ligação em lipossomos PCPECL obtidos com citocromo *c* modificado por DEPC em diferentes valores de pH.

É importante notar que citocromo *c* de atum foi usado neste estudo como um “mutante do sítio L natural” com a vantagem de apresentar a estrutura tridimensional muito similar ao exibido pelo citocromo *c* de cavalo, segundo dados cristalográficos (BANCI et al., 1997; TAKANO, DICKERSON, 1981). Além disso, a utilização de citocromo *c* de atum para

mostrar a participação do sítio L na interação com membrana interna mitocondrial, é uma prova mais interessante e confiante do que o uso de mutantes de citocromo *c* obtidos pela mutagênese sítio-dirigido. Entretanto, futuros estudos envolvendo mutagênese sítio-dirigido serão necessários para identificar o sítio pH-independente na estrutura de citocromo *c*. Com relação à fração da membrana interna mitocondrial que interage com o sítio L, trabalhos prévios mostraram resultados que apontam o sítio A de citocromo *c* como o provável sítio de interação com os citocromos *c* oxidase e redutase (NICHOLLS, 1974; PELLETIER, KRAUT, 1992). As primeiras evidências que apontam a existência do sítio L na estrutura de citocromo *c* foram obtidas analisando a capacidade da proteína em promover a fusão de vesículas com uma composição que mimetiza a fração lipídica mitocondrial. Embora o cit *c* foi capaz de ligar em lipossomos PCPECL e PCPEPG numa ampla faixa de pH, a capacidade de fundir esses tipos de vesículas foi observada somente em pHs acídicos com um ponto de virada em torno de 7,0. Apesar dos dados obtidos até o momento sugerirem que a fração lipídica mitocondrial seja a provavelmente ligada pelo citocromo *c* via sítio L, a possibilidade de interações do sítio L com citocromos *c* redutase e oxidase não podem ser descartadas. Com relação ao papel do sítio carregado positivamente dependente de pH na estrutura de citocromo *c*, a ocorrência de apoptose como resposta da perda do $\Delta\Psi$ promovida em condições de stress oxidativo, tais como aqueles promovidos durante a transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca^{2+} e terapia fotodinâmica (SUGAWA et al., 2002; CROMPTON, 1999; KOWALTOWSKI, CASTILHO, VERCESI, 2001; KOWALTOWSKI, VERCESI, FISKUM, 2000; KOWALTOWSKI, VERCESI, 1999a; BARROS, NETTO, KOWALTOWSKI, 2003; KOWALTOWSKI et al., 1999b; MATROULE et al., 2001; De GIORGI et al., 2002; ESTEVANM et al., 2004; WODTKE, 1978; WODTKE 1981) sugere que a perda do $\Delta\Psi$ deveria contribuir para o desligamento de cit *c* da membrana interna mitocondrial para participar da ativação de caspases no citosol. Os aspectos por trás da evolução do sítio L

também precisam ser elucidados, pois dados na literatura mostram que peixes teleósteis, tais como atuns, apresentam a composição lipídica da membrana interna mitocondrial adaptada a águas frias das regiões onde eles vivem. Esta infra-classe de peixes exibe um maior conteúdo de fosfadiletanolamina e menor de fosfatidilcolina além de um aumento no conteúdo de lipídios totais insaturados (WODTKE, 1978; WODTKE 1981). Estas diferenças na fração lipídica são um indício de que a composição do sítio L presente na estrutura de citocromo *c* de diferentes espécies estão relacionados à composição lipídica da membrana interna mitocondrial.

5. DISCUSSÃO

5.1 Sistema modelo de membrana: Identificação do sítio L na estrutura de citocromo *c*

O aumento de turbidez acompanhado pela adição de cit *c* em vesículas de PCPECL em valores de pH ácido sugere a formação de microagregados constituídos de pequenas vesículas unilamelares e cit *c* **Figuras 16 e 17, e Tab 6**. O uso de fosfolípido fluorescente marcado permitiu determinar a natureza destes agregados. Para uma mistura de vesículas de PCPECL com e sem lipídeo marcado, a ocorrência de fusão induzida por cit *c* foi determinada pela queda na razão excímero/monômero (E/M), devido à redistribuição do marcador fluorescente na fase lipídica disponível. O comportamento foi evidente na **Figura 18 B**, que mostram a rápida queda da razão E/M de 0,25 a 0,13, após a adição de cit *c*, correspondendo a um efeito de diluição do marcador por um fator de dois. A possibilidade da alteração na razão E/M de PPDPC resultar da troca espontânea de fosfolípidios entre as pequenas vesículas unilamelares pode ser descartada devido ao fato desta troca ocorrer com uma velocidade muito baixa e portanto ocorrer numa escala de tempo longa (da ordem de horas) em comparação com o que foi observado na presença de cit *c* (CARMONA-RIBEIRO, 1985).

A capacidade de citocromo *c* induzir fusão de vesículas sugere a existência de, pelo menos, dois sítios na estrutura da proteína, ambos interagindo com grupo fosfato da cabeça dos fosfolípidios que são carregados negativamente. Em pH 7,4, na associação com bicamadas carregadas negativamente, um aminoácido de cit *c*, carregado positivamente, neutraliza a carga do lipídeo e pode favorecer a imersão da cadeia acil na estrutura da proteína,

promovendo uma interação hidrofóbica também chamada de lipídeo estendida (RYTÖMAA, 1992; RYTÖMAA, 1995). Estas interações hidrofóbica e eletrostática afetam a estrutura da proteína e o estado de spin do ferro hemínico (ZUCCHI, 2003). Este tipo de associação cit *c*/bicamada pode ocorrer com vesículas puras constituídas por cardiolipina (CL) ou em vesículas de PCPECL e, com outros lipídios carregados negativamente, tais como vesículas de dicetilfosfato (DCP), fosfatidilglicerol (PG) e fosfatidilserina (PS) (ZUCCHI, 2003) devido à maioria dos aminoácidos carregados positivamente estarem arranjados em agregados em uma face da proteína (ANTALIK, 1999).

Em pH 6,2, a protonação de resíduos localizados no sítio L, que deveriam exibir baixo valor de pK_a (por volta de 7,0) devido a proximidade de grupos ionizáveis de outras cadeias laterais de aminoácidos carregados positivamente poderiam criar um novo sítio carregado positivamente para interagir com uma outra vesícula carregada negativamente. Se a fase hexagonal (HII) estiver presente, devido à presença de PE, o contato com as duas vesículas promovido pela ligação de citocromo *c* favorece a fusão de vesículas.

De acordo com as medidas de potencial zeta, em nossas condições experimentais, vesículas de PCPECL não possuem a área de superfície totalmente coberta por citocromo *c*, contudo a fusão não foi mediada pelas alterações na carga das vesículas de maneira dependente de pH na faixa de pH 7,4 - 6,2 (**Tabela 6**). Além disso, o pK_a observado para fusão de vesículas de PCPECL e de PCPEPG mediada por cit *c* não poderia resultar da ionização do grupo fosfato da cabeça do lipídio.

No caso de fusão de vesículas mediada por citocromo *c* *N*-acetilado (**Figura 24**), o processo não foi dependente de pH, uma vez que o processo foi promovido pela inserção de domínios hidrofóbicos da hemoproteína dentro da bicamada lipídica.

O efeito de pH na associação de cit *c* com fosfolipídios ácidos tem sido descrito na literatura (RYTÖMAA, 1992; RYTÖMAA, 1995). Os dois sítios para associação de cit *c* com

bicamadas lipídicas foram identificados como: sítio A que interage eletrostaticamente com o grupo fosfato desprotonado da cabeça de fosfolipídios ácidos e, sítio C que interage com o grupo fosfato da cabeça protonado de fosfolipídios ácidos via pontes de hidrogênio. Quando ligado com fosfolipídio ácido via sítio C, cit *c* não pode ser desligado por alta força iônica. A associação de cit *c* com fosfolipídios ácidos protonados através do sítio C é favorecida em pH ácido. Entretanto, em uma faixa de 8-29 mol % de CL em lipossomos de PCCL, os valores de pK_a para CL estão na faixa de 4,0 a 5,5, e resultados similares foram obtidos para lipossomos de PCPG (RYTÖMAA, 1994). Em nossas condições experimentais, com um conteúdo máximo de 20 mol % de CL, o valor de pK_a para CL não poderia estar acima de 5,0. Constatado que o efeito de pH na fusão de vesículas de PCPECL e PCPEPG mediada por cit *c* não poderia ser atribuído a ionização dos fosfolipídios, o pK_a para o processo por volta de 7,0 deveria ser atribuído aos resíduos de aminoácido da proteína. Na estrutura de uma proteína, o pK_a das cadeias laterais ionizáveis de aminoácidos são geralmente diferentes daqueles encontrados em aminoácidos na forma livre, uma vez que o microambiente gerado pelos dobramentos da cadeia polipeptídica induzem alterações nestes valores. Embora o pK_a por volta de 7,0 possa ser atribuído a resíduos de histidina, os grupos ϵ -amino de resíduos de lisina também não deveriam ser descartados. O fato da carboxilação de cit *c* impedir sua capacidade de fundir vesículas de PCPECL sem impedir sua ligação às mesmas de modo significativo (**Figura 26, barras**) sugere que importantes grupos do sítio A, isto é, Lys72 e Lys73, não sejam alvos para este modificador. O impedimento da fusão de vesículas mediado por citocromo *c* carboxilado sugeriu que o sítio localizado no lado oposto ao sítio A foi bloqueado (**Figura 26 triângulos**). A proximidade entre os valores de pK_a para o processo de fusão de vesículas mediado por cit *c* e o observado para o efeito do pH em que o cit *c* foi tratado no impedimento da fusão de vesículas, corroborou que grupos ionizáveis responsáveis para este processo foram quimicamente modificados pelo DEPC. Em vista disto, uma

pequena, mas significativo, diferença observada para os valores de pK_a obtidos na presença de vesículas de PCPECL e PCPEPG (**Figura 16**) sugeriu que o pK_a dos grupos ionizáveis envolvidos na interação com fosfolipídios ácidos dependente de pH pode ser afetado pela interface do microambiente. É importante ressaltar que os valores de pK_a determinados na presença de vesículas de PCPECL e PCPEPG deveriam ser considerados como os valores de pK_a observados, que foram calculados com os valores de pH da solução *bulk*. Portanto, na interface das vesículas, onde os fosfolipídios ácidos estão presentes (ZHAO, 1994), o pH deveria ser um pouco menor.

Em pH 7,4, o tratamento de cit *c* com DEPC desfavoreceu a fusão de vesículas somente em condições em que a amostra gerou como população predominante de moléculas contendo pelo menos 3 modificações (razão DEPC/ cit *c* ≥ 3). Isto aconteceu porque, em pH 7,4, diferentes resíduos de aminoácidos estão desprotonados e estão disponíveis para serem modificados pelo DEPC. As amostras de cit *c* obtidos pelo tratamento com excesso molar de 3 vezes de DEPC em pH 7,4, exibiram populações contendo até 5 modificações e a maioria das moléculas de proteína continha três modificações. Esta população predominante, não era homogênea mas foi formado pela combinação de 3 diferentes aminoácidos carboxilados. Quanto menor o pK_a de um aminoácido, maior sua contribuição é esperada no número de citocromo *c* modificado. Desta forma, em pH 7,4, amostras de cit *c* com um número alto de aminoácidos carboxilados foram necessárias para atingir uma quantidade mínima de formas modificadas que estão disponíveis para impedir a fusão, e que compreendem modificações nos resíduos de aminoácidos do sítio L, dados reforçados com a **Figura 31**. Quando o tratamento foi realizado em pH 5,25, provavelmente somente Lys27 e/ou His26 e His33 estavam desprotonadas em quantidade significativas e disponíveis para serem modificadas pelo DEPC. Neste caso, considerando que $\sim 40\%$ da amostra contem somente um único aminoácido modificado e que o processo de fusão foi inibido $\sim 85\%$, isso indica que a

modificação de um resíduo do sítio L foi suficiente para inibir o processo de fusão. Este resultado corrobora com a hipótese de que o sítio L é uma região envolvida na fusão de vesículas de maneira dependente de pH. Considerando que a modificação química do aminoácido foi escolhida como uma técnica de identificar o sítio L, mesmo que uma modificação neste sítio, independente de qual resíduo de aminoácido modificado seja, é o suficiente para prevenir a interação com vesículas de PCPECL, por causa do impedimento estérico gerado pela modificação. Técnicas de mutagênese sítio dirigido, com restrições, poderia também gerar informações sobre o papel individual dos aminoácidos do sítio L. Neste caso, sem a presença do posicionamento, rearranjo das cadeias laterais, a mudança de um único resíduo de aminoácido do sítio L é esperado ser efetivo somente se esta alteração significativamente alterar o pK_a dos resíduos deste sítio.

Os resíduos carboxilados Lys72 e Lys73 (sítio A) não foram detectados em amostras de cit *c* modificado que ainda apresenta capacidade de ligar em vesículas de PCPECL, indicando que o sítio A se mantém inalterado nestas amostras. A modificação de Lys87, próxima ao sítio A, foi insuficiente para prevenir a associação de cit *c* com vesículas PCPECL (**Figura 26, triângulos**), o que sugere que este resíduo de aminoácido não é importante para interação de cit *c* com membrana via sítio A. Além disso, amostra de cit *c* tratado com excesso molar de 3 vezes DEPC, a população mais abundante de moléculas modificadas provavelmente exibe carboxilação em Lys22, Lys27 e Lys87. A população com 4 aminoácidos carboxilados provavelmente contem a His33 como o quarto aminoácido carboxilado. É interessante notar que, a carboxilação de His33 foi favorecida quando cit *c* foi tratado com DEPC em pH 5,25 (**Tabela 8**). Em pH 5,25, a quantidade de resíduos de aminoácidos desprotonados deve ser muito baixa e, com exceção de Lys27, nenhum outro resíduo poderia competir eficientemente com His33 para a carboxilação. A ausência de modificação química em His26 quando cit *c* é tratado com DEPC em pH 7,4 sugere que este

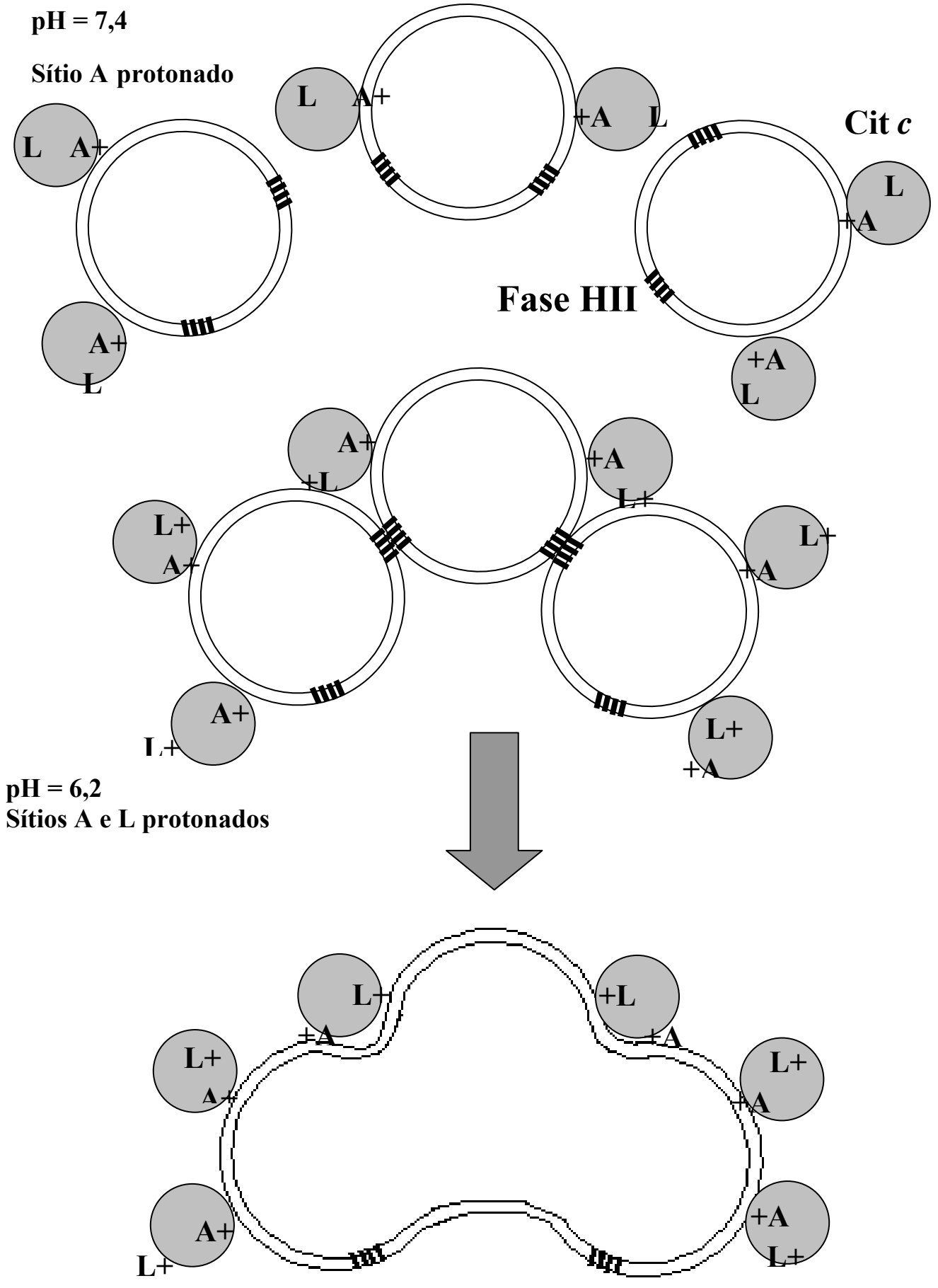
resíduo de aminoácido situa próximo aos resíduos de Lys22 e, Lys27 é menos acessível para a reação de carboxilação pelo DEPC. A população com 5 modificações químicas poderia exibir modificações em um dos seguintes resíduos de aminoácidos: Lys39, Lys53, Lys60 e Lys72. Carboxilação de Lys72 estava presente em quantidade significativa em moléculas de cit *c* somente quando a amostra era tratada com razões de DEPC/ cit *c* ≥ 6 , condições em que cit *c* perde sua capacidade de ligar em vesículas PCPECL (**Figura 26**).

A incapacidade de citocromo *c* *N*-acetilado em promover fusão de vesículas de PCPECL de modo dependente de pH mostrou a importância da interação eletrostática da proteína carregada positivamente com o lipídio carregado negativamente, neste caso, CL. Entretanto, se a interação eletrostática fosse o único requisito para induzir fusão de vesículas de PCPECL, qualquer polícatión poderia exibir o mesmo efeito e o processo não seria favorecido pelas mudanças numa estrita faixa de pH. O efeito de pH, na faixa do potencial transmembrana mitocondrial, sobre a fusão de vesículas de PCPECL induzida por proteína que foi específica para cit *c* comparado com a estrutura das proteínas testadas poderia nos dar uma explicação para o fenômeno. A superfície de moléculas de cit *c*, de todas as espécies estudadas até então, possuem conjuntos de cadeias laterais de lisina ao redor da cavidade do heme numa das faces da proteína (ZHAO, 1994). Este sítio alcalino, formado pelas Lys72 e 73 (sítio A), está disponível para interagir com vesículas carregadas negativamente na faixa de pH de 7,4 a 6,2, contudo Lys22 e Lys27 (sítio L) tornaram-se disponíveis para interagir com interfaces carregadas negativamente somente com o decréscimo de pH. Esta disposição de cargas positivas na superfície de cit *c* se diferencia da protamina que apresenta cargas positivas distribuídas de forma homogênea em sua superfície e da albumina, uma proteína ácida, carregada negativamente na faixa de pH estudada. Além disso, protamina poderia ligar simultaneamente a duas vesículas de PCPECL, através interações eletrostática com CL, sobre a faixa de pH estudada, enquanto que a albumina seria repelida. Em altos valores de pH,

cit *c* poderia interagir com vesículas de PCPECL somente por uma face (sítio A) uma vez que o sítio L não deveria estar protonado. Nestas condições, a interação de cit *c* com CL ou PG permitiu a interação lipídio-estendida neste local de contato com a face lipídica (ZUCCHI, 2003). Em valores de pH mais baixos, devido ao baixo pK_a dos aminoácidos presente no sítio L, a interação de cit *c* com uma segunda vesícula de PCPECL possivelmente permitiu a ocorrência do contato com outras vesículas com o subsequente favorecimento da fusão quando a fase HII estava presente, como mostra o esquema a seguir (KAWAI, et al., 2005). A fusão observada na faixa de pH de 5,0 a 3,0 em vesículas de PCPECL e PCPEG em presença de cit *c* (**Figura 16**) deve envolver interação simultânea de cit *c* com sítios L e C (RYTÖMAA, 1992; RYTÖMAA, 1995).

Como previamente proposto, durante a fusão, a conformação estendida de moléculas PE poderia também ser favorecidas pelo sítio de contato entre duas vesículas em proximidade, levando ao *estendimento* das cadeias acil da molécula do fosfolipídio em direções opostas, isto é, imersas dentro de duas bicamadas opostas enquanto a cabeça polar é mantida na interface.

Assim, somente cit *c* possui a estrutura e a distribuição de resíduos carregados necessários para induzir fusão de vesículas de PCPECL de modo regulada pela ionização dos aminoácidos do sítio L e, considerando o alto grau de conservação na estrutura tridimensional de cit *c* este fenômeno é, provavelmente, correlacionado com os eventos biológicos na mitocôndria.



O estudo do perfil dos valores de pK_a dos aminoácidos que compreendem o sítio L na estrutura de cit *c* revelam que, citocromo *c* tratado com DEPC na razão DEPC/cit *c* 3/1 apresenta perda da capacidade de indução de fusão de vesículas de PCPECL quando o pH de tratamento está acima de 9,5 e, o ajuste sigmoidal dos valores de turbidez, representada em linha vermelha da **Figura 32**, indica a participação de grupos ionizáveis de $pK_a \sim 8,7$. Esse valor de pK_a possivelmente pode ser atribuído a resíduos de lisina envolvidas no sítio A entre outras. Por outro lado, o citocromo *c* tratado na razão DEPC/cit *c* 5/1 e 9/1 mostrou perda da capacidade de fusão de vesículas, quando tratado com DEPC em pHs mais ácidos, 7,5 e 6,5 respectivamente, sugerindo modificação do sítio L. Os valores de pK_a obtidos pela linha verde ($pK_a = 6,9$) e linha azul ($pK_a = 5,6$) sugerem pertencerem à ionização dos resíduos de lisina e histidina do sítio L, respectivamente, uma vez que o pK_a da cadeia lateral de histidina livre é mais baixo do que de lisina livre. Portanto, variando a razão DEPC/citocromo *c* e o pH de tratamento (**Figura 31 e 32**) pode-se mapear os valores de pK_a dos resíduos de lisina e histidina compreendidos pelos sítios A e L de citocromo *c*.

5.2 Sistema biológico: Papel biológico do sítio L na estrutura de citocromo *c*

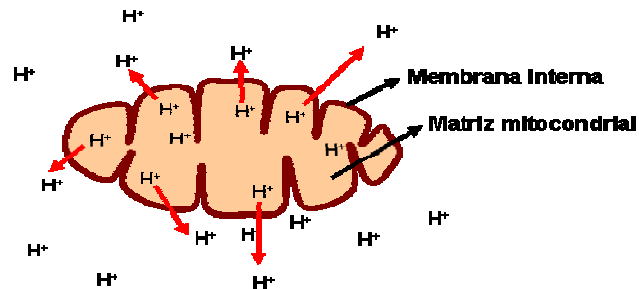
Os resultados descritos na primeira etapa indicam a identificação de um novo sítio de interação de citocromo *c* com a membrana interna mitocondrial, e essa interação provavelmente é modulada pelo potencial transmembrana da mitocôndria. Um aumento do pH do espaço entre membranas, resultado da perda do potencial transmembrana poderia levar a desprotonação do sítio L. Este pode ser um dos eventos que ocorrem no espaço entre membranas e que favoreceria no desligamento de citocromo *c* da membrana mitocondrial, desencadeando assim, o processo de apoptose da célula. Entretanto, a superfície de lipossomos, como de PCPECL, é esperada ser muito diferente da superfície da membrana interna mitocondrial e ainda, na organela, cit *c* precisa interagir com os citocromos *c* redutase e oxidase, que não estão presentes em sistemas modelos. Assim, a segunda etapa do trabalho estudou o papel biológico do sítio L na estrutura de citocromo *c* na sua associação com a membrana interna mitocondrial na faixa de pH de 6,2 a 7,4, compatível com o encontrado em mitocôndrias no estado acoplado, ou na presença de inibidores respiratórios ou agentes desacopladores (NICHOLLS, FEGUSON, 1992; ERNSTER, 1992). Para esse estudo, foram isolados mitoplastos (MP) (mitocôndrias desprovidas de membrana externa) de fígado de rato os quais foram depletados de citocromo *c*. A ligação de citocromo *c* com membranas de mitoplastos de fígado de rato foi acompanhada pelo consumo de oxigênio da organela e, conseqüente capacidade de produção de ATP.

A maior taxa de respiração do estado 2 exibido pelos mitoplastos supridos de citocromo *c* (MPc), em pH 7,4 (**Figura 41**, linha a) em relação ao MPc em pH 6,2 (**Figura 41**, linha c) poderia ser explicado pelo menor Δ pH gerado entre a matriz mitocondrial e o meio externo, mimetizando um mitoplasto no estado desacoplado. Devido à ausência de

membrana externa, o bombeamento de prótons da matriz para o lado externo deve promover um significativo aumento do pH da matriz, mas não uma queda significativa no pH do lado externo, um ambiente muito maior em comparação com o espaço entre membranas virtual. Este fenômeno similar ao desacoplamento da cadeia respiratória, respondeu com o aumento da taxa de respiração. Pela mesma razão, a ausência da membrana externa também previne um significativo decréscimo do $\Delta\Psi$ durante a fosforilação de MPC, resultando em um menor aumento da taxa de respiração da cadeia respiratória do que em mitocôndrias isoladas. Por outro lado, mitoplastos em pH 6,2, a variação de pH é maior, ou seja, o gradiente eletroquímico é mantido (esquema abaixo), logo a cadeia respiratória está no estado acoplado com a fosforilação oxidativa.

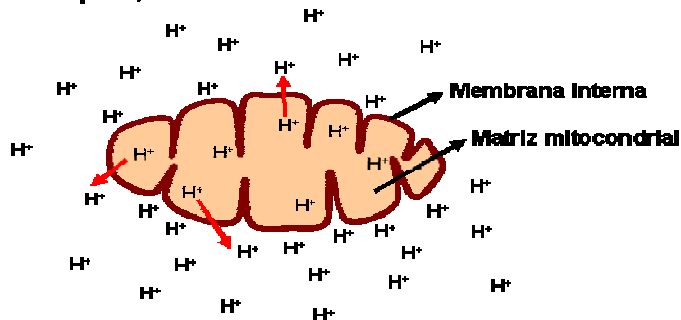
A

Meio pH 7,2



B

Meio pH 6,2



A dosagem de ATP (unidades relativa de luminescência, R.L.U.) produzido pelos MPc em meio a diferentes valores de pH (**Figura 42**, painel esquerda) corroborou com a hipótese de que o aumento do Δ pH foi a causa do decréscimo da taxa de respiração de MPc, uma vez que, ao diminuir o pH do meio, a produção de ATP dos MPc se manteve a valores próximos ao observado em mitocôndrias acopladas.

A adição de citocromo *c* de cavalo aos mitoplastos em concentrações acima de 0,03 nmol/mg proteína restaurou a respiração da organela de maneira dependente ao pH. O valor de pK_{obs} observado a partir dos dados da taxa máxima de respiração e produção de ATP, foi coincidente aos dados descritos anteriormente para fusão de vesículas promovida pelo citocromo *c* (**Figura 17**) e no papel protetor de pH na reação de carboxilação dos resíduos de cit *c* por DEPC na presença das vesículas PCPECL (**Figura 24**), $pK_{app} \sim 7$.

Para citocromo *c* de atum, cuja estrutura apresenta os resíduos de aminoácidos Lys22 e His33 substituídos por Asn e Trp respectivamente, concentrações acima de 0,06 nmol/mg proteína também restaurou a respiração dos mitoplastos de maneira dependente de pH. Entretanto, para cit *c* de cavalo, o decréscimo de pH de 7,2 a 6,2 levou ao aumento no valor de K_{sapp} cerca de 6 vezes (**Figura 44 A**), enquanto que para cit *c* de atum a afinidade com a membrana da mitocôndria aumentou 3,5 vezes. A **Figura 44 A** revela que, em pH 7,2, o sítio L encontra-se desprotonado, cit *c* de cavalo exibiu afinidade idêntica a membrana do mitoplasto em relação ao cit *c* de atum em pH 6,2. Este resultado sugere que os resíduos de aminoácidos Lys22 e His33 na estrutura de cit *c* cavalo apresentam um baixo valor de pK_a e estão envolvidos na ligação de cit *c* com a membrana interna mitocondrial. Diferentemente do citocromo *c* de cavalo, o de atum não foi capaz de induzir fusão de vesículas de PCPECL em pH 6,2 (dados não mostrados). Considerando que, em cit *c* de atum a afinidade pela membrana do mitoplasto diminuiu 3,5 vezes com o aumento do pH para 7,2, é provável que pelo menos um resíduo de aminoácido básico presente no sítio L desta proteína exibe um

baixo valor de pK_a em comparação com o cit *c* de cavalo e que contribui significativamente para a associação com a membrana interna mitocondrial. De fato, a distância entre os resíduos de Lys25 e Lys27 em cit *c* de atum é relativamente menor do que o encontrado em cit *c* de cavalo (**Figura 44 B**).

Análises da seqüência de aminoácidos de citocromo *c* de diferentes espécies mostram que os resíduos de aminoácidos compreendidos pelo sítio L de cit *c* de cavalo são invariantes entre os mamíferos e, que os componentes do sítio L exibido pelo cit *c* de atum é conservado em peixes teleósteos e invariante para a presença de somente três resíduos de aminoácidos básicos. Os aspectos sobre a evolução do sítio L ainda precisam ser esclarecidos. Entretanto, dados na literatura indicam que a membrana interna mitocondrial de peixes teleósteos apresenta uma composição adaptada a regiões de águas frias. Esta infraclasse de peixes exibe um alto conteúdo de PE e baixo de PC, além de um aumento no conteúdo de lipídios totais insaturados (WODTKE, 1978; WODTKE 1981). Estas diferenças na fração lipídica são um indicativo de que os resíduos de aminoácidos que compreendem o sítio L presente na estrutura de citocromo *c* de diferentes espécies estão relacionados à adaptação ao ambiente em que se encontram.

A morfologia e distribuição de mitocôndrias variam significativamente entre o tipo de célula e entre espécies (DIAZ et al., 1999; CHURCH, POYTON, 1998). Trabalhos têm descrito que a morfologia das mitocôndrias é continuamente remodelada pelos processos de fissão e fusão (NUNNARI, et al., 1997; RIZZUTO, et al., 1998), sendo muito importantes para transmissão de energia para a célula. Três proteínas foram descritas por estarem envolvidas no processo de fusão em mitocôndrias de levedura: duas proteínas transmembranas Fzo/mitofusin e Ugo1 (HERMANN, et al., 1998; SESAKI, JENSEN, 2004); e uma proteína localizada no espaço entre membranas, associada a uma proteína da membrana interna (Mgm1) (WONG, et al., 2003). Em mamíferos, a literatura ainda está pouco clara. Há

descrito duas proteínas homólogas para Fzo, mitofusins Mfn1 e Mfn2 (ROJO, et al., 2002), uma homóloga para Mgm1, OPA1 (OLICHON, et al., 2003), mas ainda nenhum para Ugo1.

Legros e colaboradores (LEGROS, et al., 2002) demonstraram que a fusão mitocondrial medeia a morfologia e tamanho das mitocôndrias em linhagens de célula humana. A fusão depende da cadeia respiratória funcional, mas é inibida pela dissipação do potencial de membrana da membrana interna mitocondrial pelo uso do ionóforo CCCP. Este desacoplador clássico de mitocôndrias capta prótons do espaço entre membrana e transfere para a matriz mitocondrial, o que também resulta numa alteração da diferença de pH entre a matriz e o espaço entre membranas. Consequentemente, pode estar influenciando também na afinidade de citocromo *c* com a membrana e o desprotonamento de seu sítio L com o aumento de pH do espaço entre membranas. Contudo são necessários estudos para se verificar o papel de citocromo *c* e do sítio L no processo de fusão de mitocôndrias.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os resultados obtidos demonstraram a existência de uma região na estrutura de cit *c* composta por um agregado de resíduos de aminoácidos básicos (Lys22, Lys25, Lys27, His26 e His33) localizada no lado oposto ao sítio A, denominada como sítio L, envolvida em interagir e promover fusão de vesículas em baixos valores de pH. Esses dados apontam para, em baixos valores de pH similar ao encontrado em uma mitocôndria respirando, sítios protonados A (Lys72 e Lys73) e L (Lys22, Lys25, Lys27 His26 e His33) na estrutura de cit *c* favoreceu uma interação eletrostática simultânea de cit *c* com domínios de grupo fosfato de cardiolipina (desprotonados) de duas vesículas de PCPECL. Neste mecanismo, uma molécula de cit *c* liga-se a duas vesículas, aproximando-as o que promove o processo de fusão contribuído pela presença de fase HII na superfície das vesículas. Considerando que o sítio L está localizado no lado oposto ao sítio A na estrutura de citocromo *c* (TAKANO, DICKERSON, 1981), como mostra a **Figura 28**, uma vez que o cit *c* está ligado eletrostaticamente a vesículas de PCPECL de um lado, o outro sítio está disponível para interagir uma outra vesícula, assim, favorecendo o processo de fusão.

O agregado de cadeias laterais de aminoácidos carregados positivamente (sítio A) na superfície externa da membrana interna mitocondrial são importantes para reconhecimento e ligação com os citocromos *c* redutase e oxidase carregados negativamente (NICHOLLS, 1974; PELLETIER, KRAUT, 1992), e o sítio L possivelmente funciona em manter o citocromo *c* ligado na membrana. O pH mais elevado no espaço entre membranas, decorrente da perda do potencial de membrana pode levar ao desprotonamento do sítio L. Isso pode ser um dos eventos no espaço intermembrana que favorece o desligamento de cit *c* e desencadeamento do processo apoptótico.

A capacidade de restaurar a respiração de mitoplastos depletados de citocromo *c* em diferentes valores de pH foi correlacionada com a disponibilidade do sítio L de citocromo *c*. Ambos citocromos *c* de atum e cavalo exibiram dois tipos de ligação com a membrana interna mitocondrial, que contribuíram para o processo de transferência de elétrons: uma independente de pH exibindo uma alta afinidade e baixa eficiência (constante macroscópica de dissociação, $K_{S_{app}} \sim 10$ nM) e outra dependente de pH com uma afinidade relativamente baixa e alta eficiência. Para citocromo *c* de cavalo o valor de pK_a para a interação dependente de pH foi $\sim 6,7$. Para citocromo *c* de atum, $K_{S_{app}}$ aumentou cerca de 3,5 vezes com o aumento de pH de 6,2 a 7,2, enquanto que, citocromo *c* de cavalo, o valor de $K_{S_{app}}$ aumentou 6 vezes nas mesmas condições. Os valores de $K_{S_{app}}$ foram idênticos para citocromo *c* de cavalo em pH 7,2 e atum pH 6,2 (111nM) sugerindo que a protonação da Lys22 e His33 poderia ser uma etapa limitante que determina a participação desta hemoproteína na cadeia respiratória ou na apoptose.

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. M.; BECHARA, E. J.; VERCESI, A. E.; NANTES, I. L. Diphenylcetaldehyde-generated excited states promote damage to isolated rat liver mitochondrial DNA, phospholipids, and proteins. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p. 744-751, 1999

ANTALIK, M.; SEDLAK, E. Molten globulate-like state of cytochrome *c* induced by polyanion poly(vinylsulfate) in slightly acidic pH. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1434, n° 2, p. 347-355, 1999

BANCI, L.; BERTINI, I.; GRAY, H. B.; LUCHINAT, C.; REDDIG, T.; ROSATO, A.; TURANO, P. Solution structure of oxidized horse heart cytochrome *c*. **Biochemistry**, v. 36, n° 32, p. 9867-9877, 1997

BARR, D. P.; MASON, R. P. Mechanism of radical production from the reaction of cytochrome *c* with organic hydroperoxides. An ESR spin trapping investigation. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n° 21, p. 12709-12716, 1995

BARRIENTOS, A.; MORAES, C. T. Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n° 23, p. 16188-16197, 1999

BARROS, M. H.; NETTO L. E.; KOWALTOWSKI, A. J. H₂O₂ generation in *Saccharomyces cerevisiae* respiratory pet mutants: effect of cytochrome *c*. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 35, n° 2, p. 179-88, 2003

BIRRELL, G. B.; GRIFFIT, O. H. Cytochrome *c* induced lateral phase separation in a diphosphatidylglycerol-steroid spin label model membrane. **Biochemistry**, v. 15, n° 13, p. 2925-2929, 1976

BOEHNING, D.; PATTERSON, R. L.; SEDAGHAT, L.; GLEBOVA, N. O.; KUROSAKI, T.; SNYDER, S. H. Cytochrome *c* binds to inositol (1,4,5) triphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. **Nat. Cell Biol.**, v. 5, n° 12, p. 1051-1061, 2003

BOYER, P. D. (Ed.) **The Enzymes** (3^a ed.), v. 16, Section 3-5, Academic Press, New York, 1983

BOSE, R.; VERHEIJ, M. HAIMOVITS-FRIEDMAN, A.; SCOTTO, K.; FUKS, Z.; KOLESNICK, R. Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. **Cell**, v. 82, n° 3, p. 405-414, 1995

BOSSHARD, H. R., BÄNZIGER, J. AND HASLER, T. The cytochrome *c* peroxidase-cytochrome *c* electron transfer complex. The role of histidine residues. **J. Biol. Chem.**, v. 259, n° 9, p. 5683-5690, 1984

BRAUTIGAN, D. L.; FERGUSON-MILLER, S.; MARGOLIASH, E. Mitochondrial cytochrome *c*: preparation and activity of native and chemically modified cytochromes *c*. **Methods Enzimol.**, v. 53, p. 128-164, 1978

BROWN, G. C. Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. **Biochem. J.**, v. 284, p. 1-13, 1992

BROWN, L. R.; WÜTHRICH, K. NMR and ESR studies of the interactions of cytochrome *c* with mixed cardiolipin-phosphatidylcholine vesicles. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 468, n° 3, p. 389-410, 1977

CADENAS, E.; BOVERIS, A.; CHANCE, B. Chemiluminescence of lipid vesicles supplemented with cytochrome *c* and hydroperoxide. **Biochim. J.**, v. 188, n° 3, p. 577-583, 1980

CAIN, K.; SKILLETER, D. N. **Biochemical Toxicology**, Oxford: IRL Press, 217-254, 1987

CARMONA-RIBEIRO, A. M.; YOSHIDA, L. S.; CHAIMOVICH, H. Salt effects on the stability of dioctadecyldimethylammonium chloride and sodium dihexadecyl phosphate vesicles. **J. Phys. Chem.**, v. 89, p. 2928-2933, 1985

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv. Enzymol.**, New York, v. 17, p. 65-13, 1956

CHACON, E.; REECE, J. M.; NIEMINEN, A. L.; ZAHREBELSKI, G.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J. J. **Biophys. J.**, v. 66, p. 942-952, 1994

CHENEVAL, D.; MULLER, M.; TONI, R.; RUETZ, S.; CARAFOLIG, E. Adriamycin as a probe for the transversal distribution of cardiolipin in the inner mitochondrial. **J. Biol. Chem.**, v. 260, n° 21, p. 13003-13007, 1985

CHICCO, A. J.; SPARAGNA, G. C. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 292, n° 1, p. 33-44, 2007

CHURCH, C.; POYTON, R. O. Neither respiration nor cytochrome *c* oxidase affects mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 1729-1737, 1998

COOPER, C. E. Nitric oxide and iron proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1411, n° 2-3, p. 290-309, 1999

COLBEAU, A.; NACHBAUR, J.; VIGNAIS, P. M. Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 249, n° 2, p. 462-492, 1971

CROMPTON, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. **Biochem. J.**, v. 341, p. 233-249, 1999

CUVILLIER, O.; LEVADE, T. Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome *c* and Smac/DIABLO from mitochondria. **Blood**, v. 98, n° 9, p. 2828-2836, 2001

DAVIES, M. J. Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with heme-proteins by electron-spin resonance spectroscopy. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 964, p. 28-35, 1988

DE GIORGI, F.; LARTIGUE, L.; BAUER, M. K.; SCHUBERT, A.; GRIMM, S.; HANSON, G. T.; REMINGTON, S. J.; YOULE, R. J.; ICHAS, F. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. **FASEB J**, v. 16, n° 6, p. 607-609, 2002

de JONGH, H. H. J.; de KRUIJFF, B. The conformational changes of apocytochrome *c* upon binding to phospholipid vesicles and micelles of phospholipid based detergents: a circular dichroism study. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1029, n° 1, p. 105-112, 1990

De KRUIJFF, B., CULLIS, P. R. The influence of poly(L-lysine) on phospholipid polymorphism. Evidence that electrostatic polypeptide-phospholipid interactions can modulate bilayer/non-bilayer transitions. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 601, n° 1, p. 235-234, 1980a

De KRUIJFF, B., CULLIS, P. R. Cytochrome *c* specifically induces non-bilayer structures in cardiolipin-containing model membranes **Biochim. Biophys. Acta**, v. 602, n° 3, p. 477-490, 1980b

DIAZ, G.; SETZU, M. D.; ZUCCA, A.; ISOLA, R.; DIANA, A.; MURRU, R.; SOGOS, V.; GREMO, F. Subcellular heterogeneity of mitochondrial membrane potential: relationship with organelle distribution and intercellular contacts in normal, hypoxic and apoptotic cells. **J. Cell Sci.**, v. 112, p. 1077-1084, 1999

DICKERSON, R. E.; TAKANO, T.; EISENBERG, D.; KALLAI, O. B.; SAMSON, L.; MARGOLIASH, E. Ferricytochrome *c*. I. General features of the horse and bonito proteins at 2.8 Å resolution **J. Biol. Chem.**, v. 246, n° 5, p. 1511-1535, 1971

DICKERSON, R. E.; TIMKOVICH, R. Cytochrome *c*. The enzymes. Academic Press, New York, p. 397-547, 1975

DICKERSON, R. E.; TIMKOVICH, R. Cytochrome *c*. in Dolphin, D. (ed.) **The Porphyrins**, Academic Press, New York, p. 397-547, 1979

DOMANOV, Y. A.; MOLOTKOVSKY, J. G.; GORBENKO, G. P. Coverage-dependent changes of cytochrome *c* transverse location in phospholipid membranes revealed by FRET. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1716, n° 1, p. 49-58, 2005

DOWHAN, W. Molecular basis for membrane phospholipids diversity: why are there so many lipids? **Annu. Rev. Biochem.**, v. 66, p. 199-232, 1997

EATON, S.; BARLETT, K.; POURFARZAM, M. Mammalian mitochondrial β -oxidation. **Biochem. J.**, v. 320, 345-357, 1996

ELÖVE, G. A.; RODER, H.; BHUYAN, A. K. Kinetic mechanism of cytochrome *c* folding: Involvement of the heme and its ligands. **Biochemistry**, v.33, n° 22, p. 6925-6935, 1994

ERNSTER, L. **Molecular Mechanisms in Bioenergetics**. Elsevier, 1992

ESTEVAM, M. L.; NASCIMENTO, O. R.; BAPTISTA, M. S.; Di MASCIO, P., PRADO, F. M.; FALJONI-ALARIO, A., ZUCCHI, Mdo. R.; NANTES, I. L. Changes in the spin state and reactivity of cytochrome *C* induced by photochemically generated singlet oxygen and free radicals. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n° 38, p. 39214-39222, 2004

FASMAN, G. D. (1975). **CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology**. 3rd ed. V. II. CRC Press, Cleveland. p. 383-545

FORSTER, T. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. **Ann. Phys.**, v. 2, p. 55, 1948

FLÖGEL, U.; MERX, M. W.; GÖDECKE, A.; DECKING, U. K. M.; SCHRADER, J. Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, n° 2, p. 735-740, 2000

GHAFOURIFAR, P.; KLEIN, S. D.; SCHUCHT, O.; SCHENK, U.; PRUSCHY, M.; ROCHA, S.; RICHTER, C. Ceramide induces cytochrome *c* release from isolated mitochondria. importance of mitochondrial redox state. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n° 10, p. 6080-6084, 1999

GORBENKO, G. P.; MOLOTKOVSKY, J. G.; KINNUNEN, P. K. J. Cytochrome *c* interaction with cardiolipin/phosphatidylcholine model membranes: Effect of cardiolipin protonation. **Biophys. J.**, v. 90, n° 11, p. 4093-4103, 2006

GUARNIERI, M.; STECHMILLER, B.; LEHNINERG, A. L. Use of an antibody to study the location of cardiolipin in mitochondrial membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 246, n° 24, P. 7526-7532, 1971

GURR, M. I.; HARWOOD, J. L. Lipid Biochemistry, 4° ed., London: Chapman & Hall, 1991

HANNUN, Y. A. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 3125-3128, 1994

HANNUN, Y. A.; LUBERTO, C.; ARGRAVES, K. M. Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. **Biochemistry** v. 40, n° 16, p. 4893-4903, 2001

HAVERSTICK, D. M.; GLASER, M. Influence of proteins on the reorganization of phospholipid bilayers into large domains. **Biophys. J.**, v. 56, n° 4, p. 677-682, 1989

HEIMBURG, T.; BILTONEN, R. Thermotropic behavior of dimyristoylphosphatidylglycerol and its interaction with cytochrome *c*. **Biochemistry**, v. 33, n° 32, p. 9477-9488, 1994

HEIMBURG, T.; HILDEBRANDT, P.; MARSH, D. Cytochrome *c*-lipid interactions studied by resonance Raman and 31P NMR spectroscopy. Correlation between the conformational changes of the protein and the lipid bilayer. **Biochemistry**, v. 30, n° 37, p. 9084-9089, 1991

HENAFF, M.; ANTOINE, S.; MERCADIER, J. J.; COULOMBE, A.; HATEM, S. N. The voltage-independent B-type Ca²⁺ channel modulates apoptosis of cardiac myocytes. **FASEB J.**, v. 16, n° 1, p. 99-101, 2002

HENNIG, B.; NEUPERT, W. Assembly of cytochrome *c*. Apocytochrome *c* is bound to specific sites on mitochondria before its conversion to holocytochrome *c*. **Eur. J. Biochem.**, v. 121, n° 1, p. 203-212, 1981

HERNMANN, G. J.; THATCHER, J. W.; MILLS, J. P.; HALES, K. G.; FULLER, M. T.; NUNNARI, J.; SHAW, J. M. Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase *fzo1p*. **J. Cell Biol.**, v. 143, p. 359-373, 1998

HILDEBRANDT, P.; STOCKBURGER, M. Cytochrome *c* at charged interfaces. 2. Complexes with negatively charged macromolecular systems studied by resonance Raman spectroscopy. **Biochemistry**, v. 28, n° 16, p. 6710-6721, 1989a

HILDEBRANDT, P.; STOCKBURGER, M. Cytochrome *c* at charged interfaces. 1. Conformational and redox equilibria at the electrode/electrolyte interface probed by surface-enhanced resonance Raman spectroscopy. **Biochemistry**, v. 28, n° 16, p. 6722-6728, 1989b

HINKLE, P. C.; KUMAR, M. A.; RESETAR, A.; HARRIS, D. L. Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. **Biochemistry**, v. 30, p. 3576-3582, 1991

HOANG, L.; MAITY, H.; KRISHNA, M. M. G.; LIN, Y.; ENGLANDER, S. W. Folding units govern the cytochrome *c* alkaline transition. **J. Mol. Biol.**, v. 331, p. 37-43, 2003

HOLBROOK, J. J.; INGRAM, V. A. Ionic properties of an essential histidine residue in pig heart lactate dehydrogenase. **Biochem. J.**, v. 131, n° 4, p. 729-738, 1973

HONDAL, R. J.; MA, S.; APRIOLI, R. M.; HILL, K. E.; BURK, R. F. Heparin-binding histidine and lysine residues of rat selenoprotein P. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n° 19, p. 15823-15821, 2001

HOSLER, J. P.; FERGUSON-MILLER, S.; MILLS, D. A. Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 75, p. 165-87, 2006

HUNTER, D. G.; FRISKEN, B. J. Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles. **Biophys. J.**, v. 74, n° 6, p. 2996-3002, 1998

IWASE, H.; TAKATORI, T.; NAGAO, M.; IWADATE, K.; NAKAJIMA, M. Monoepoxide production from linoleic acid by cytochrome *c* in the presence of cardiolipin. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 222, n° 1, p. 83-89, 1996

IWASE, H.; SAKURADA, K.; TAKATORI, T.; NAGAO, M.; NIIJIMA, H.; MATSUDA, Y. E KOBAYASHI, M. Calcium ions potentiate lipoxygenase activity of cytochrome *c* at the physiological pH. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 243, n° 2, p. 485-491, 1998

JORI, G.; TAMBURRO, A M.; AZZI, A. Photooxidative and spectral studies on cytochrome *c*. Conformational changes induced by binding of cardiolipina. **Photochem. Photobiol.**, v. 19, n/ 5, p. 337-345, 1974

JUNG, L. S.; CAMPBELL, C. T.; CHINOWSKY, T. M.; MAR, M. N. e YEE, S. S. Quantitative interpretation of the response of surface plasmon resonance sensors to adsorbed films. **Langmuir**, v. 14, p. 5636-5648, 1998

JUNGE, W.; LILL, H.; ENGLEBRECHT, S. ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. **Trends Biochem. Sci.**, v. 22, p. 420-463, 1997

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, n° 41, p. 34709-34717, 2005

KALANXHI, E.; WALLACE, C. J. A. Cytochrome *c* impaled: Investigation of the extended lipid anchorage of a soluble protein to mitochondria membrane models. **Biochem. J.**, v. 407, n° 2, p. 179-187, 2007

KEILIN, D. **Proc. R. Soc. London Ser. B.**, v. 100, p. 129-151, 1925

KHANDWALA, A. S.; KASPER, J. The fatty acid composition of individual phospholipids from rat liver nuclear membrane and nuclei. **J Biol Chem.**, v. 246, n° 20, p. 6242-6246, 1971

KIM, B.-C.; KIM, H. -T.; MAMURA, M.; AMBUDKAR, I. S.; CHOI, K. -S.; KIM, S.-J. Tumor Necrosis Factor Induces Apoptosis in Hepatoma Cells by Increasing Ca²⁺ Release from the Endoplasmic Reticulum and Suppressing Bcl-2. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n° 24, p. 24911-24914, 2004

KIM, H. E.; DU, F.; FANG, M.; WANG, X. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome *c*-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 102, n° 49, p. 17545-17550, 2005

KIMELBERG, H. K.; LEE, C. P. Binding and electron transfer to cytochrome *c* in artificial phospholipid membranes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 34, n° 6, p. 784-790, 1969

KINNUNEN, P. K. J.; KÖIV, A.; LEHTONEN, Y. A.; RYTÖMAA, M.; MUSTONEN, P. Lipid dynamics and peripheral interactions of proteins with membrane surfaces. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 73, p. 181-207, 1994

KLUCK R. M.; BOSSY-WETZEL E.; GREEN D. R.; NEWMeyer D. D. The release of cytochrome *c* from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. **Science**, v. 275, n° 5303 p. 1132-1136, 1997

KOLESNICK, R. N.; KRONKE, M. Regulation of ceramide production and apoptosis. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 60, p. 643-665, 1998

KOPPENOL, W. H.; MARGOLIASH, E. The asymmetric distribution of charges on the surface of horse cytochrome *c*. **J. Biol. Chem.**, v. 257, n° 8, p. 4426-4437, 1982

KORB, H.; NEUPERT, W. Biogenesis of cytochrome *c* in *Neurospora crassa*. Synthesis of apocytochrome *c*, transfer to mitochondria and conversion to Holocytochrome *c*. **Eur. J. Biochem.**, v. 91, n° 2, p. 609-620, 1978

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett.**, v. 495, n° 1-2, p. 12-15, 2001

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic Biol Med.**, v. 26, n° 3-4, p. 463-471, 1999a

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E.; FISKUM, G. Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome *c* release via maintenance of reduced pyridine nucleotides. **Cell Death Differ.**, v. 7, n° 10, p. 903-910, 2000

KOWALTOWSKI, A. J.; TURIN, J.; INDIG, G. L.; VERCESI, A. E. Mitochondrial effects of triarylmethane dyes. **J Bioenerg Biomembr.**, v. 31, n° 6, p. 581-590, 1999b

KOZARAC, Z.; DHATHATHREYAN, A.; MIIBIUS, D. Adsorption of cytochrome *c* to phospholipid monolayers studied by reflection spectroscopy. **FEBS Lett.**, v. 229, n° 2, p. 372-376, 1988

KOSTRZEWA, A.; PALI, T.; FRONCISZ, W.; MARSH, D. Membrane location of spin-labeled cytochrome *c* determined by paramagnetic relaxation agents. **Biochemistry**, v. 39, n° 20, p. 6066-6074, 2000

KREBS, J. J.; HAUSER, H. CARAFOLI, E. Asymmetric distribution of phospholipids in the inner membrane of beef heart mitochondria. **J. Biol. Chem.**, v. 254, n° 12, p. 5308-5316, 1979

KROESEN, B-J.; JACOBS, S.; PETTUS, B. J.; SIETSMA, H.; KOK, J. W.; HANNUN, Y. A.; de LEIJ, L. F. BcR-induced apoptosis involves differential regulation of C16 and C24-ceramide formation and sphingolipid-dependent activation of the proteasome **J. Biol. Chem.**, v. 278, n° 17, p. 1423-1231, 2003

LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2° ed., **Kluwer Academic/Plenum Pub. Corp.**, New York, 95-135, 1999

LEE, S.; KIM, H. Fusion of phospholipid vesicles mediated by cytochrome *c*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 271, p. 188-199, 1989

LEGROS, F.; LOMBÈS, A.; FRACHON, P.; ROJO, M. Mitochondrial fusion in human cells is efficient requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. **Mol. Biol. Cell.**, v. 13, p. 4343-4354, 2002

LENAZ, G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1366, n° 1-2, p. 53-67, 1998

LI, H.; ZHU, H.; XU, C. J.; YUAN, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. **Cell**, v. 94, p. 491-501, 1998

LIU, X.; KIM, C. N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome *c*. **Cell**, v. 86, p. 147-157, 1996

LIU, P.; ANDERSON, G. G. W. Compartmentalized Production of Ceramide at the Cell Surface. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n° 45, p. 27179-27185, 1995

LONGWORTH, J. W. Luminescence of polypeptides and proteins. In Excited States of Proteins and Nucleic Acids. **Plenum Publishing Corp.**, New York. 319-484, 1971

MacFARLANE, M.; WILLIAMS, A. C. Apoptosis and disease: a life or death decision (Conference and Workshop on apoptosis and disease). **EMBO**, v. 5, n° 7, p.674-678, 2004, Figura disponível pelo site: <www.nature.com/embor/journal/v5/n7/fig_tab/7400191_f1.html>. Acesso em: 27 de jan. 2007

Manual de procedimento de Ion-Exchange Cellulose (Carboxymethyl Cellulose-CM 32), Whatman

MATROULE, J. Y., CARTHY, C. M., GRANVILLE, D. J., JOLOIS, O., HUNT, D. W.; PIETTE, J. Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-a methylester photosensitization. **Oncogene**, v. 20, n° 30, 4070-4084, 2001

MATTSON, M. P.; CHAN, S. L. Calcium orchestrates apoptosis. **Nature Cell Biology**, v. 5, n° 12, p. 1041-1043, 2003

McGINNITY, D. F.; DEVREESE, B.; PRAZERES, S.; BEEUMEN, J. V.; MOURA, I.; MOURA, J. J. G.; PETTIGREW, W. G. A single histidine is required for activity of cytochrome *c* peroxidase from *Paracoccus denitrificans*. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n° 19, p. 11126-11133, 1996

MERRILL, A. H., JR., LINGRELL, S.; WANG, E.; NIKOLOVA-KARAKASHIAN, M.; VALES, T. R.; VANCE, D. E. Sphingolipid Biosynthesis *de Novo* by Rat Hepatocytes in Culture. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n° 23, p. 13834-13841, 1995

MILES, W. Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. **Methods Enzymol.**, v. 47, p. 431-442, 1977

MINAMI, Y.; ISLAM, M. R.; FUNATSU, G. Chemical modifications of momordin-a and luff-a, ribosome-inactivating proteins from *Momordica charantia*: involvement of His140, Tyr165, and Lys231 in the protein-synthesis inhibitory activity. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 62, n° 5, p. 959-964, 1998

MITCHELL, P. A commentary on alternative hypotheses of protonic coupling in the membrane systems catalysing oxidative photosynthetic phosphorylation. **FEBS Lett.**, v. 78, n° 1, p. 1-20, 1977

MONTES, L. R.; RUIZ-ARGUELLO, M. B.; GONI, F. M.; ALONSO, A. Membrane restructuring via ceramide results in enhanced solute efflux. **A. J. Biol. Chem.**, v. 277, n° 14, p. 11788-11794, 2002

MORRISON, W. R. Polar lipids in bovine milk. I. Long-chain bases in sphingomyelin. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 176, n° 3, p. 537-546, 1969

MYER, Y. P.; SATURNO, A. F. Horse heart ferricytochrome *c*: conformation and heme configuration of low strength acidic forms. **J. Protein Chem.**, v. 9, n° 4, p. 379-387, 1990

MUSTONEN, P.; WRTANEN, J. A.; SOMERHAJU, P. J.; KINNUNEN, P. K. J. Binding of cytochrome *c* to liposomes as revealed by the quenching of fluorescence from pyrene-labeled phospholipids. **Biochemistry**, v. 26, n° 11, p. 2991-2997, 1987

MUSTONEN, P.; KINNUNEN, P. K. J. On the Reversal by Deoxyribonucleic Acid of the Binding of Adriamycin to Cardiolipin-containing liposomes. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n° 2, 1074-1080, 1993

NANTES, I. L.; CILENTO, G.; BECHARA, E. J. H.; VERCESI, A. E. Chemiluminescent diphenilacetaldehyde oxidation by mitochondria is promoted by cytochromes and leads to oxidative injury of the organelle. **Photochem. Photobiol.**, v. 62, p. 522-527, 1995

NANTES, I. L.; FALJONI-ALARIO, A.; VERCESI, A. E.; SANTOS, K. E.; BECHERA, E. J. H. Liposome effect on the cytochrome *c*-catalyzed peroxidation of carbonyl substrates to triplet species. **Free Radic. Biol. Med.** v. 25, n° 4-5, p. 546-553, 1998

NANTES, I. L.; FALJONI-ALARIO, A.; NACIMENTO, O. R.; BANDY, B.; GATTI, R.; BECHERA, 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 Radic. Biol. Med.** v. 28, n° 5, p. 786-796, 2000

NANTES, I. L.; ZUCCHI, M. R.; NACIMENTO, O. R.; FALJONI-ALARIO, A. Effect of heme iron valence state on the conformation of cytochrome *c* and its association with membrane interfaces. A CD and EPR. **J. Biol. Chem.** v. 276, n° 1, p. 153-158, 2001

NAVARRO, A.; BOVERIS, A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 292, n° 2, p. C670-686, 2007

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER. **Principles of Biochemistry**. 3° ed, New York, Worth Publishers, 2000

NICHOLSON, D. W.; KOHLER, H.; NEUPERT, W. Import of cytochrome *c* into mitochondria. Cytochrome *c* heme lyase. **Eur. J. Biochem.**, v. 164, n° 1, p. 147–157, 1987

NICHOLLS, P. Cytochrome *c* binding to enzymes and membranes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 346, n° 3-4, p. 261-310, 1974

NICHOLLS, D. G.; FEGUSON, S. J. **Bioenergetics2**. Academic Press, 1992

NOGUCHI, N.; NIKI, E. Dynamics of free radical formation from the reaction of peroxides with haemproteins as studied by stopped-flow chemiluminescence. **Free, Radic. Res.**, v. 23, n° 4, p. 329-338, 1995

NUNNARI, J.; MARSHALL, W. F.; STRAIGHT, A.; MURRAY, A.; SEDAT, J. W.; WALTER, P. Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. **Mol. Biol. Cell**, v. 8, p. 1233-1242, 1997

OLICHON, A.; BARICAULT, L.; GAS, N.; GUILLOU, E.; VALETTE, A.; BELENGUER, P.; LENAERS, G. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome *c* release and apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 7743-7746, 2003

OSHEROFF, N.; BORDEN, D.; KOPPENOL, W. H.; MARGOLIASH, E. Electrostatic interactions in cytochrome *c*. The role of interactions between residues 13 and 90 and residues 79 and 47 in stabilizing the heme crevice structure. **J. Biol. Chem.**, v. 255, n° 4, p. 1689-1697, 1980

OTT, M.; ROBERTSON, J. D.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Cytochrome *c* release from mitochondria proceeds by a two-step process. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, n° 3, p. 1259-1263, 2002

PEDERSEN, P. L.; GREENALWALT, J. W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G. L.; SOPER, J. W.; BUSTAMANTE, E. **Methods Cell Biol.**, v. 20, p. 411-481, 1978

PELLETIER, H.; KRAUT, J. Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome *c* peroxidase and cytochrome *c*. **Science**, v. 258, n° 5089 p. 1748-1755, 1992

PERRY, D. K.; HANNUN, Y. A. The role of ceramide in cell signaling. **Biochem. Biophys Acta.**, v. 1436, n° 1-2, p. 233-243, 1998

PICCOTTI, L.; BURATTA, M.; GIANNINI, S.; GRESELE, P.; ROBERTI, R.; CORAZZI, L. Binding and release of cytochrome *c* in brain mitochondria is influenced by membrane potential and hydrophobic interactions with cardiolipin. *J. Membr. Biol.*, v. 198, n° 1, p. 43-53, 2004

PINHEIRO, T. J. T. The interaction of horse heart cytochrome *c* with phospholipid bilayers. Structural and dynamic effects. **Biochimie**, v. 76, n° 6, p. 489-500, 1994

PINHEIRO, T. J. T.; ELÖVE, G. A.; WATTS, A.; RODER, H. Structural and kinetic description of cytochrome *c* unfolding induced by the interaction with lipid vesicles. **Biochemistry**, v. 36, n° 42, p. 13122-13132, 1997

QIN, K.; YANG, Y.; MASTRANGELO, P.; WESTAWAY, D. Mapping Cu(II) Binding Sites in Prion Proteins by Diethyl Pyrocarbonate Modification and Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-ToF) Mass Spectrometric Footprinting. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 1981-1990, 2002

QIN, W.; SANISHVILI, R.; PLOTKIN, B.; SCHEJTER, A.; MARGOLIASH, E. The role of histidine 26 and 33 in the structural stabilization of cytochrome *c*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1252, n° 1, p. 87-91, 1995

QUINN, P. J.; DAWSON, R. M. C. The interaction of cytochrome *c* with monolayers of phosphatidylethanolamine. **Biochem. J.**, v. 115, n° 1, p. 65-75, 1969

RADI, R.; TURRENS, J. F.; FREEMAN, B. A. Cytochrome *c*-catalyzed membrane lipid-peroxidation by hydrogen peroxide. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 288, n° 1, p. 118-125, 1991

RADI, R.; BUSH, K. M.; FREEMAN, B. A. The role of cytochrome *c* and mitochondrial catalase in hydroperoxide-induced heart mitochondrial lipid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 300, p. 409-415, 1993

RICH, P. R. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, n° 6, p. 1095-1105, 2003

RIZZUTO, R.; PINTON, P.; CARRINGTON, W.; FAY, F. S.; FOGARTY, K. E.; LIFSHITZ, L. M.; TUFT, R. A.; POZZAN, T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science*, v. 280, p. 1763-1766, 1998

RODKEY, F. L.; BALL, E. G. J. Oxidation-reduction potentials of the cytochrome *c* system, **J. Biol. Chem.**, v. 182, p. 17-28, 1950

RODRIGUES, T.; FRANÇA, L. P.; KAWAI, C.; de FARIA, P. A.; MUGNOL, K. C. U.; BRAGA, F. M.; TERSARIOL, I. L. S.; SMAILI, S. S.; NANTES, I. L. Protective role of mitochondrial unsaturated lipid on the preservation of the apoptotic ability of cytochrome *c* exposed to singlet oxygen. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n° 35, p. 25577-25587, 2007

ROJO, M.; LEGROS, F.; CHATEAU, D.; LOMBES, A. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. **J. Cell Sci.**, v. 115, p. 1663-1674, 2002

RYTÖMAA, M.; MUSTONEN, P.; KINNUNEN, P. K. J. Reversible, nonionic, and pH-dependent association of cytochrome *c* with cardiolipin-phosphatidylcholine liposomes. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n° 31 p. 22243-22248, 1992

RYTÖMAA, M.; KINNUNEN, P. K. J. Evidence for two distinct acidic phospholipid-binding sites in cytochrome *c*. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n° 3, p. 1770-1774, 1994

RYTÖMAA, M.; KINNUNEN, P. K. J. Reversibility of the binding of cytochrome *c* to liposomes. Implications for lipid-protein interactions **J. Biol. Chem.**, v. 270, n° 7, p. 3197-3202, 1995

SANDERS, M. M.; GROPPI, V. E.; BROWNING, E. T. Resolution of basic cellular proteins including histone variants by two-dimensional gel electrophoresis: evaluation of lysine to arginine ratios and phosphorylation. **Anal. Biochem.**, v. 103, n° 1, p. 157-165, 1980

SAILER, K.; VIAGGI, S.; NUSSE, M. Kinetics of radiation- and cytochrome *c*-induced modifications in liposomes analysed by FT-Raman spectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1329, n° 2, p. 259-268, 1997

SAUNER, M. T.; LEVY, M. Study of the transfer of phospholipids from the endoplasmic reticulum to the outer and inner mitochondrial membranes. **Journal of Lipid Research**, v. 12, p. 71-75, 1971

SCHENKMAN, S.; ARAUJO, P. S.; DIJKMAN, R.; QUINA, F. H.; CHAIMOVICH, H. Effects of temperature and lipid composition on the serum albumin-induced aggregation and fusion of small unilamellar vesicles. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 649, p. 633-641; 1981

SCHISSEL, S. L.; SCHUCHMAN, E. H.; WILLIAMS, K. J.; TABAS, I. Zn²⁺-stimulated Sphingomyelinase Is Secreted by Many Cell Types and Is a Product of the Acid Sphingomyelinase Gene. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n° 45, p. 18431-18436, 1996

SEN, T.; SEN, N.; TRIPATH, G.; CHATTERJEE, U.; CHAKRABARTI, S. Lipid peroxidation associated cardiolipin loss and membrane depolarization in rat brain mitochondria. **Neurochem. Int.**, v. 49, n° 1, p. 20-27, 2006

SESAKI, J.; JENSEN, R. E. Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 28298-28303, 2004

SVENNERHOLM, L.; BRUCE, A.; MÅNSSON, J. E.; RYNMARK, B. M.; VANIER, M. T. Sphingolipids of human skeletal muscle. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 280, n° 4, p. 626-636, 1972

SINIBALDI, F.; HOWES, D. B.; PIRO, M. C.; CAROPPI, P.; MEI, G.; ASCOLI, F.; SMULEVICH, G.; SANTUCCI, R. Insights into the role of the histidines in the structure and stability of cytochrome *c*. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 11, n° 1, p. 52-62, 2006

SHIPLEY, G. G.; LESLIE, R. B.; CHAPMAN, D. Small-angle X-ray scattering studies of cytochrome *c*-phospholipid complexes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 173, n° 1, p. 1-10, 1969

SINIBALDI, F.; PIRO, M. C.; HOWES, D. B.; SMULEVICH, G.; ASCOLI, F.; SANTUCCI, R. Rupture of the hydrogen bond linking two Omega-loops induces the molten globule state at neutral pH in cytochrome *c*. **Biochemistry**, v. 42, n° 24, p. 7604-7610, 2003

SISKIND, L.; COLOMBINI, M. The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n° 49, p. 38640-38644, 2000

SISKIND, L.; KOLESNICK, R. N.; COLOMBINI, M. Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n° 30, p. 26796-26803, 2002

SOUSSI, B.; BYLUND-FELLENISUS.A-C.; SCHERSTH, T.; ANGSTROM, J. 1H-N.M.R. evaluation of the ferricytochrome *c*-cardiolipin interaction. Effect of superoxide radicals. **Biochem. J.**, v. 265, n° 1, p. 227-232, 1990

SPIEGEL, S.; MERRILL, A. H., Jr. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. **Faseb J.**, v. 10, n° 12, p. 1388-1397, 1996

SPOONER, P. J. R.; WATTS, A. Cytochrome *c* interactions with cardiolipin in bilayers: a multinuclear magic-angle spinning NMR study. **Biochemistry**, v. 30, n° 41, p. 10129-10138, 1992

STEINEMANN, A.; LÄUGER, P. Interaction of cytochrome *c* with phospholipid monolayers and bilayer membranes. **J. Membr. Biol.**, v. 4, p. 74-86, 1971

STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 217-245, 2000

STRYER, L. Fluorescence energy transfer as spectroscopic ruler. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 47, p. 819-846, 1978

SUGAWARA, T.; LEWEN, A.; GASCHE, Y.; YU, F.; CHAN, P. H. Overexpression of SOD1 protects vulnerable motor neurons after spinal cord injury by attenuating mitochondrial cytochrome *c* release. **FASEB J.**, v. 16, n° 14, p. 1997-1999, 2002

TANAKA, K. Eukaryotes: Scanning Electron Microscopy of Intracellular Structures, **Intl. Rev. Cytology**, n° 17, p. 89-120, 1987. Disponível em: Mitochondrial Readings, <http://www.bio.utk.edu/kennedy/Mitoreadings421.htm>, acesso em 09 setembro 2007.

TAKANO, T.; DICKERSON, R. E. Conformation change of cytochrome *c*. Ferrocycytochrome *c* structure refined at 1.5 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, v. 153, n° 1, p. 79-94, 1981

TEISSIE, J. Interaction of cytochrome *c* with phospholipid monolayers. Orientation and penetration of protein as functions of the packing density of film, nature of the phospholipids, and ionic content of the aqueous phase **Biochemistry**, v. 20, n° 6, p. 1554-1560, 1981

TESTI, R. Sphingomyelin breakdown and cell fate. **Trends Biochem. Sci.**, v. 21, n° 12, p. 468-471, 1996

TYLER, D. D.; GONZE, J.; LAMY, F.; DUMONT, J. E. Influence of mitochondrial inhibitors on the respiration and energy-dependent uptake of iodide by thyroid slices. **Biochem. J.**, v. 106, p. 123-133, 1968

TRUMPOWER, B. L.; GENNIS, R. B. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondria and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. **Annu. Ver. Biochem.**, v. 63, p. 675-716, 1994

TUOMINEN, E. K. J.; ZHU, K.; WALLACE, C. J. A. CLARK-LEWIS, I.; CRAIG, D. B.; RYTÖMAA, M. AND KINNUNEN, P. K. J. ATP induces a conformational change in lipid-bound cytochrome *c*. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n° 22, p. 19356-19362, 2001

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

Van BLITTERSWIJK, W. J.; Van DER LUIT A. H.; VELDMAN, R. J.; VERHEIJ, M.; BORST, J.. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? **Biochem. J.**, v. 369, n° Pt2, p. 199-211, 2003

Van HOLDE; K. E.; JOHNSON, W. C.; HO, P. S. **Principles of Physical Biochemistry**, Prentice Hall, New Jersey, p. 452-477, 1998

VANDERKOOI, J.; ERECINSKA, M.; CHANCE, B. Cytochrome *c* interaction with membranes. II. Comparative study of the interaction of *c* cytochromes with the mitochondrial membrane. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 154, n° 1, p. 219-229, 1973

VANDERKOOI, J.; ERECINSKA, M.; Cytochrome *c* interaction with membranes. Absorption and emission spectra and binding characteristics of ion-free cytochrome *c*. **Euro. J. Biochem.**, v. 60, n° 1, p. 199-207, 1975

VICENT, J. S.; LEVIN, I. R. Interaction of ferricytochrome *c* with zwitterionic phospholipid bilayers: a Raman spectroscopic study. **Biochemistry**, v. 27, n° 9, p. 3438-3446, 1988

VINCENT, J. S.; KON, H.; LEVIN, I. R. Low-temperature electron paramagnetic resonance study of the ferricytochrome *c*-cardiolipin complex. **Biochemistry**, v. 26, n° 8, p. 2312-2314, 1987

Von HAEFEN, C; WIEDER, T.; GILLISSEN, B.; STARCK, L.; GRAUPNER, V.; DORKEN, B.; DANIEL, P. T. Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. **Oncogene**, v. 21, n° 25, p. 4009-4019, 2002

YANG, J.; LIU, X. S.; BHALLA, K.; KIM, C. N.; IBRADO, A. M.; CAI, J.; PENG, T.; JONES, D. P.; WANG, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome *c* from mitochondria blocked. **Science**, v. 275, n° 5303, p. 1129-1132, 1997

YU, X.; ACEHAN, D.; MÉNÉTRET, J. F.; BOOTH, C. R.; LUDTKE, S. J.; RIEDL, S. J.; SHI, Y.; WANG, X.; AKEY, C. W. A structure of the human apoptosome at 12.8 Å resolution provides insights into this cell death platform. **Structure**, v. 13, n° 11, p. 1725-1735, 2005

WALLACE, C. J. A. Modulation of the alkaline transition in cytochrome *c* and cytochrome *c*-T by full or specific partial acetimidylation. **Biochim. J.**, v. 217, n° 1, p. 601-604, 1984

WIEGMANN, K.; SCHUTZE, S.; MACHLEIDT, T.; WITTE, D.; KRONKE, M. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. **Cell**, v. 78, n° 6, p. 1005-1015, 1994

WIKSTROM, M.; KRAB, K.; SARASTE, M. Cytochrome *c* Oxidase: A synthesis, **Academic Press**, New York, 1981

WISPRIYONO, B.; SCHMELZ, E.; PELAYO, H.; HANADA, K.; SEPAROVIC, D. A role for the de novo sphingolipids in apoptosis of photosensitized cells. **Exp. Cell Res.**, v. 279, n° 1, p. 153-165, 2002

WODTKE, E. Lipid adaptation in liver mitochondrial membranes of carp acclimated to different environmental temperatures: phospholipid composition, fatty acid pattern and cholesterol content. **Biochim Biophys Acta**, v. 529, n° 2, p. 280-291, 1978

WODTKE, E. Temperature adaptation of biological membranes. The effects of acclimation temperature on the unsaturation of the main neutral and charged phospholipids in mitochondrial membranes of the carp (*Cyprinus carpio L.*). **Biochim Biophys Acta**, v. 640, n° 3, p. 698-709, 1981

WONG, E. D.; WAGNER, J. A.; SCOTT, S. V.; OKREGLAK, V.; HOLEWINSKE, T. J.; CASSIDY-STONE, A.; NUNNARI, J. The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. **J. Cell Biol.**, v. 160, p. 303-311, 2003

WOLTER, K. G.; HSU, Y. -T.; SMITH, C. L.; NECHUSHTAN, A.; XI, X. -G.; YOULE, R. J. Movement of Bax from the Cytosol to Mitochondria during Apoptosis, **J. Cell Biol.**, v. 139, n° 5, p. 1281-1292, 1997

WUTHRICH, K.; AVIRAM, I.; SCHEJTER, A. Structural studies of modified cytochromes *c* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 253, n° 1, p. 98-103, 1971

ZAMBRANO, F.; FLEISCHER, S.; FLEISCHER, B. Lipid composition of the Golgi apparatus of rat kidney and liver in comparison with other subcellular organelles. **Biochim Biophys Acta.**, v. 380, n° 3, p. 357-369, 1975

ZHANG, F.; ROWE, E. S. Calorimetric studies of the interactions of cytochrome c with dioleoylphosphatidylglycerol extruded vesicles: ionic strength effects. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1193, n° 2, p. 219-225, 1994

ZHAO, H.; TUOMINEN, E. K. J.; KINNUNEN, P. K. J. Formation of amyloid fibers triggered by phosphatidylserine-containing membranes. **Biochemistry**, v. 43, n° 32, p. 10302-10307, 2004

ZIMMERMANN, R.; HENNIG, B.; NEUPERT, W. Different transport pathways of individual precursor proteins in mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, v. 116, n° 3, p. 455-460, 1981

ZUCCHI, M. R.; NASCIMENTO, O. R.; FALJONI-ALARIO, A.; PRIETO, T.; NANTES, I. L. Modulation of cytochrome *c* spin states by lipid acyl chains: a continuous-wave electron paramagnetic resonance (CW-EPR) study of haem iron. **Biochem. J.**, v. 370, p. 671-6784, 2003

Figuras 7 e 21 foram elaboradas no programa Swiss-PDB Viewer utilizando dados, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=2554674>>, número de identificação **1AKK**. Acesso em: 24 de jan. 2007.

Figura 44 B foi elaborada no programa Swiss-PDB Viewer utilizando dados de BANCI et al., 1997 e DICKERSON et al., 1971, disponíveis pelo site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=2554674>>. Acesso em: 24 de jan. 2007.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

8.1. Estudos iniciados durante o período de doutoramento (não concluídos)

8.1.1. Monitoramento da fluorescência intrínseca de citocromo *c* associado a vesículas fosfolipídicas

A interação de citocromo *c* de cavalo com membranas que, contem fosfolipídios carregados negativamente, também foi estudada monitorando-se a fluorescência da porfirina e do triptofano 59 presentes na estrutura de citocromo *c*. Para essas medidas, foram utilizadas citocromo *c* base livre (ou porfirina citocromo *c*), no qual o átomo de Fe^{2+} foi removido, pois este suprime a fluorescência da porfirina e do triptofano.

A **Figura 46** mostra os espectros de fluorescência da porfirina de citocromo *c* base livre de cavalo com lipossomos POPC/POPE/CL (1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicerol-3-fosfocolina/ 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicerol-3-fosfoetanolamina/ cardiolipina). Como efeito de pH do meio na interação de citocromo *c* com membranas, verifica-se um desvio da banda de fluorescência da porfirina citocromo *c* para a região do vermelho em baixas razões citocromo *c*/ lipídio de maneira dependente de pH ácido (6,2).

O efeito do conteúdo de fosfolipídios carregado negativamente na interação de citocromo *c* base livre com lipossomos, também foi estudada. A **Figura 47** mostra os respectivos valores do centro espectral de massa, analisada na região entre 605 - 635 nm dos dados obtidos na **Figura 46**, de citocromo *c* de cavalo base livre em presença de lipossomos POPC/POPE/CL nas proporções 50/30/20 e 58/30/12 mol % e ainda, substituindo cardiolipina por fosfatidilglicerol (PG).

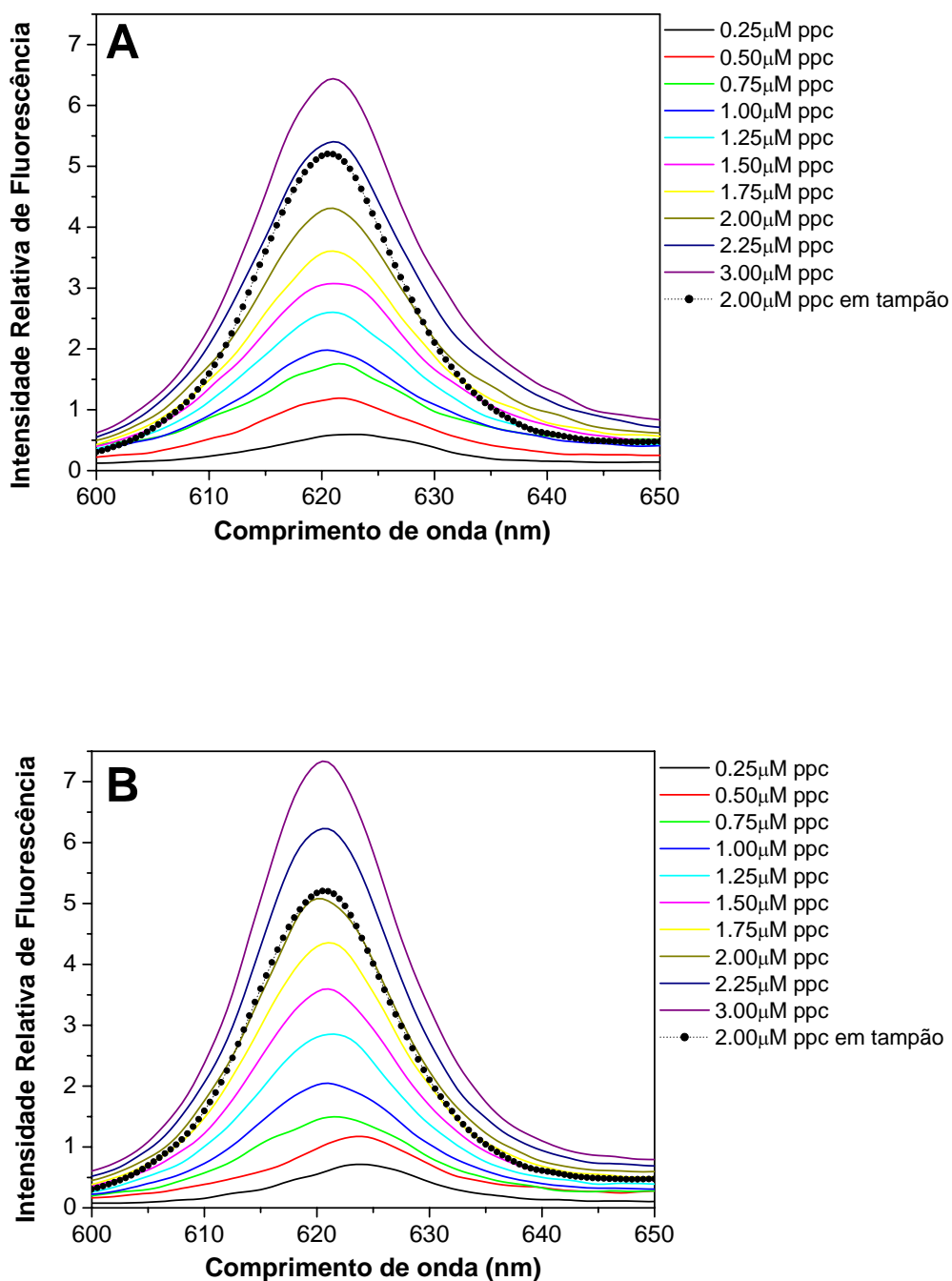


Figura 46. Titulação de citocromo *c* base livre em presença de lipossomos POPC/POPE/CL. Experimentos feitos nas seguintes condições: 50 μ M lipossomos POPC/POPE/CL na proporção 50: 30: 20 mol % em tampão HEPES 10 mM contendo EDTA 0,1 mM, 30° C, excitação em 500 nm, fenda de excitação 10 nm e emissão 5 nm. (A) em pH 7,4 e (B) em pH 6,2, em várias concentrações de cit *c* base livre (ppc).

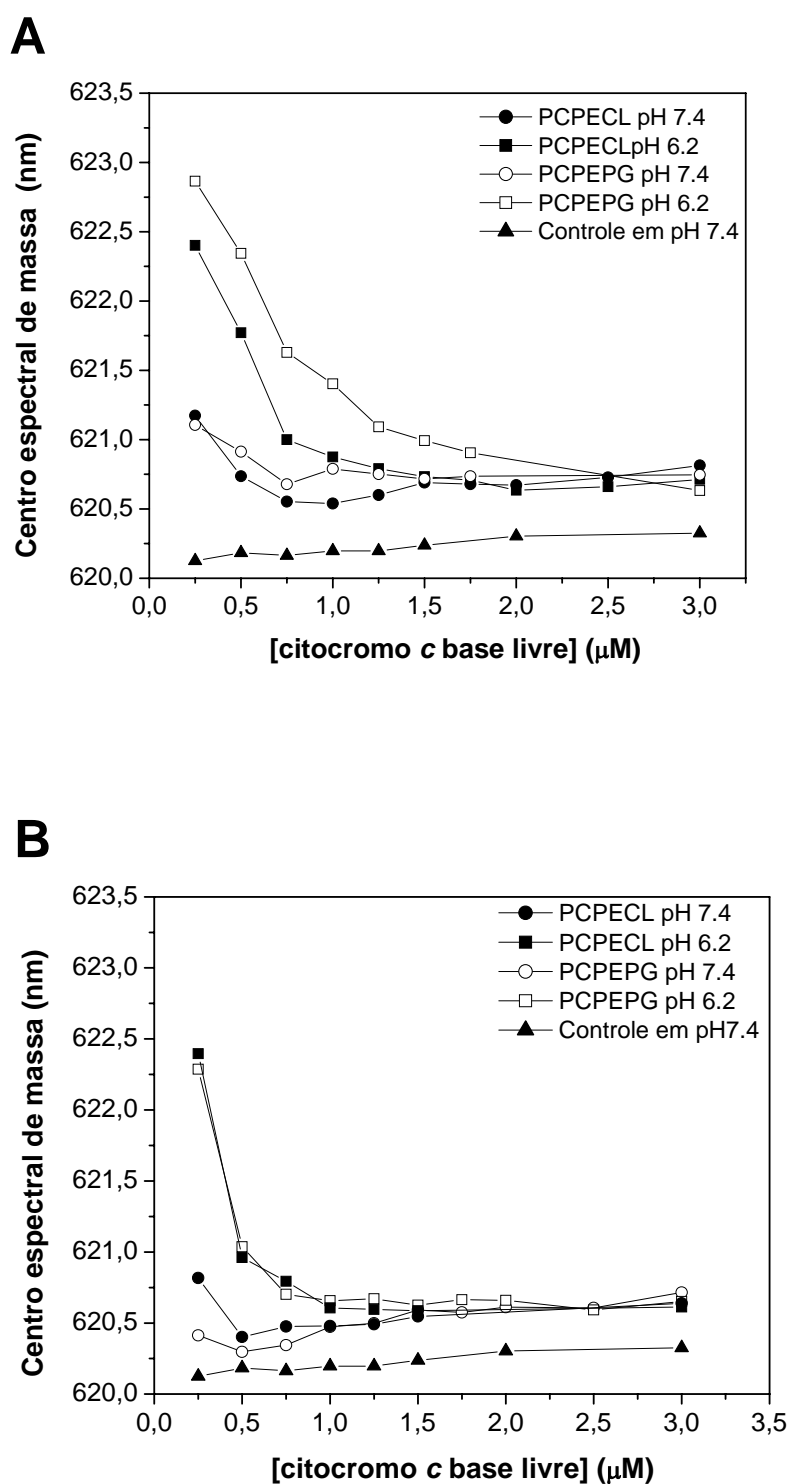


Figura 47. Efeito do conteúdo de fosfolipídio carregado negativamente na interação de citocromo *c* base livre com lipossomos POPC/POPE/CL em diferentes concentrações de proteína. Experimentos feitos nas seguintes condições: 50 μM lipossomos POPC/POPE/CL na proporção 50: 30: 20 mol % (A) e 58: 30: 12 mol % (B) em tampão HEPES 10 mM, pH 7,4 ou 6,2 contendo EDTA 0,1 mM, 30° C, excitação em 500 nm, fenda de excitação 10 nm e emissão 5 nm.

Com o decréscimo da quantidade de fosfolípido carregado negativamente em lipossomos PCPECL, o desvio da banda para o vermelho somente ocorre em concentrações de citocromo *c* abaixo de 0,5 μM , em pH 6,2, enquanto que, em presença de lipossomos contendo 20 mol % de cardiolipina, o desvio da banda ocorre em concentrações abaixo de 1,5 μM , em pH 6,2. Para excluir a possibilidade de formação de fase hexagonal promovida pela cardiolipina, os mesmo experimentos foram realizados substituindo cardiolipina por POPG (1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicerol-3-fosfoglicerol), como mostrado ainda na **Figura 47 B**, e a substituição de POPE por POPC nos lipossomos (dados não mostrado). Contudo, não foi encontrada significativa alteração com os resultados obtidos substituindo cardiolipina por fosfatidilglicerol ou POPE por POPC, indicando que o desvio da banda não envolve fase hexagonal entre a cadeia acil do fosfolípido e a proteína.

Esse desvio da banda de 620 nm para a região do vermelho, observado nestes experimentos, decorre provavelmente de uma alteração estrutural levando o grupo heme a um ambiente mais hidrofóbico. A **Figura 48** mostra o espectro de emissão de citocromo *c* base livre em diferentes meios, como etanol e DMSO.

Citocromo *c* base livre em meio mais hidrofóbico, apresenta o mesmo desvio da banda de fluorescência da porfirina, que pode ser decorrente das altas razões lipídio/proteína. Esses dados indicam uma possível alteração estrutural na proteína promovida pela inserção do grupo heme na bicamada lipídica ou uma interação do tipo lipídio estendida entre a cadeia acil do fosfolípido e a proteína. Contudo, outros resultados indicam que não ocorre o enterramento do grupo heme na bicamada lipídica uma vez que o desvio da banda para a região do vermelho observado é reversível quando o citocromo *c* é desligado da membrana por meio do aumento da força iônica do meio, como mostra a **Figura 49**.

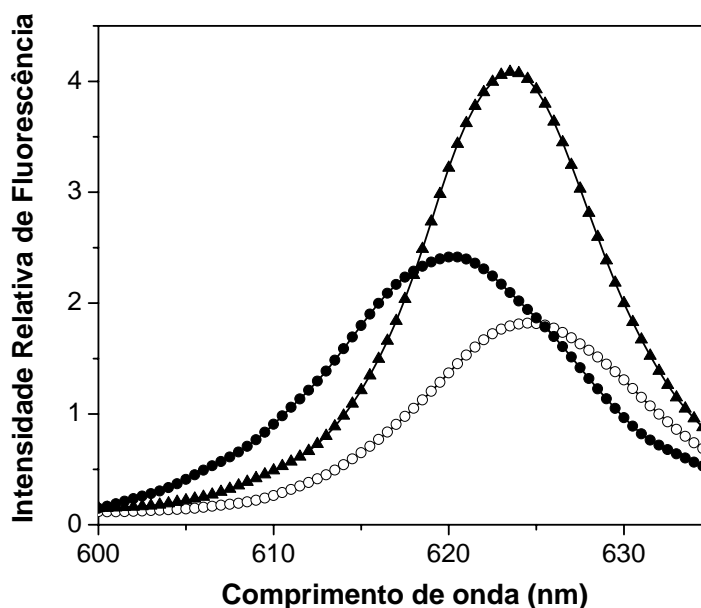


Figura 48. Espectro de emissão de citocromo *c* base livre em diferentes meios hidrofóbicos. Experimentos feitos nas seguintes condições: 1,0 μM de citocromo *c* base livre em tampão HEPES 10 mM, pH 7,4 contendo EDTA 0,1 mM, NaCl 150 mM (círculos fechados), etanol (círculos abertos) e DMSO (triângulos fechados), 30° C, excitação em 500 nm, fenda de excitação 10 nm e emissão 5 nm.

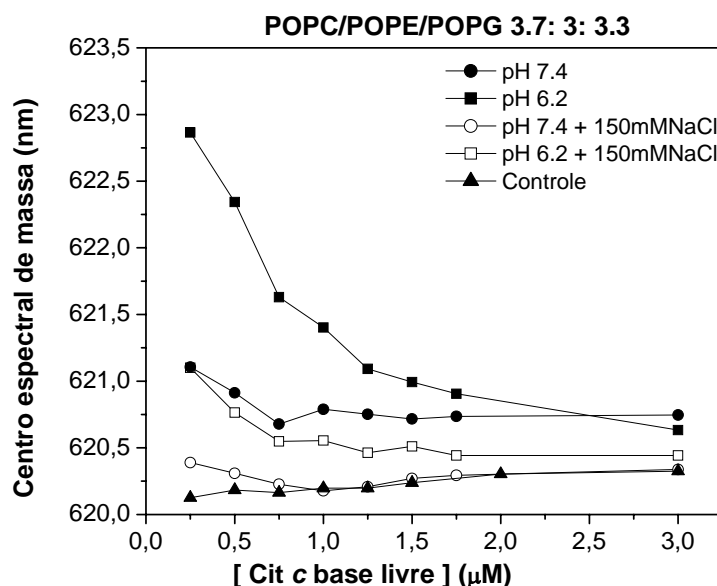


Figura 49. Efeito do aumento da força iônica (NaCl 150 mM) do meio na interação de citocromo *c* base livre com lipossomos POPC/POPE/POPG. Experimentos feitos nas seguintes condições: 50 μM lipossomos POPC/POPE/POPG na proporção 37: 30: 33 mol %, em tampão HEPES 10 mM, pH 7,4 (círculos) ou 6,2 (quadrados) contendo EDTA 0,1 mM 30° C, excitação em 500 nm, slit de excitação 10 nm e emissão 5 nm. 150 mM NaCl foram adicionados após a interação de cit *c* base livre com os lipossomos. Controle: cit *c* base livre em HEPES pH 7,4.

8.1.2. Comparação da fluorescência intrínseca de citocromo *c* de cavalo e atum associados a membranas fosfolipídicas

A presença do resíduo de triptofano 33 na estrutura de cit *c* de atum, além do triptofano 59, este encontrado em cit *c* cavalo, nos permite estudar o papel do sítio L na associação de citocromo *c* com membranas pela técnica de monitoramento da fluorescência intrínseca desses triptofanos. Pelo fato deste Trp33 estar localizado próximo a superfície da molécula de citocromo *c* (**Figura 50**) o ambiente em volta é mais hidrofílico em comparação com o triptofano 59, encontrado próximo ao grupo heme. A natureza do ambiente em volta do resíduo de triptofano geralmente afeta a sua emissão de fluorescência (Van HOLDE, JOHNSON, HO, 1988; LAKOWICZ, 1999).

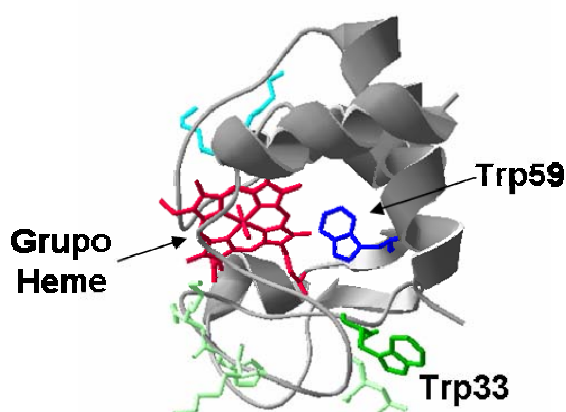


Figura 50. Esquema da estrutura de citocromo *c* de atum representada em modelo fita. A posição dos resíduos de triptofanos estão indicados. A figura está fora de escala. A estrutura ID 3CYT foi obtida pelo site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?form=6&db=t&Dopt=s&uid=3015>.

A **Figura 51** mostra os espectros de fluorescência de triptofano de citocromo *c* de atum e cavalo na forma nativa (em tampão pH 7,4) e desnaturada (em tampão pH 2,3) em comparação com os espectros de triptofano livre em meio hidrofílico (em tampão pH 7,4) e hidrofóbico (em presença de SDS).

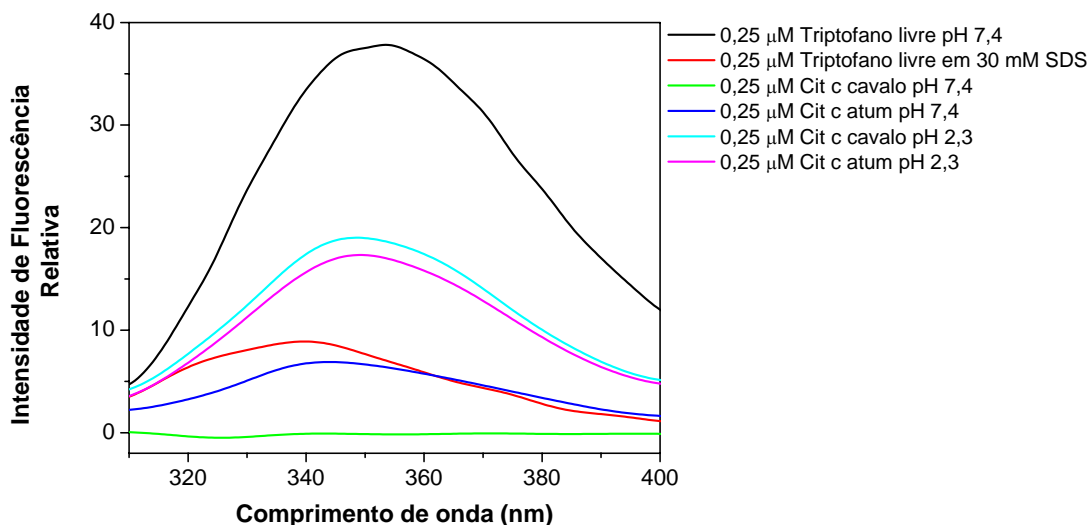


Figura 51. Espectro de fluorescência do triptofano de citocromo *c* de atum e cavalo na forma nativa e denaturada. Experimentos feitos nas seguintes condições: 0,25 μ M de proteína ou triptofano livre, tampões MES 20 mM pH 7,4 contendo EDTA 0,1 mM ou tampão fosfato de sódio 20 mM pH 2,3 contendo EDTA 0,1mM, SDS 30 mM preparado em água, 30°C, excitação em 292 nm, fenda de excitação 10 nm e emissão 10 nm.

Triptofano livre, em meio hidrofílico, exibe um pico de fluorescência por volta de 352 nm enquanto que, em meio hidrofóbico (SDS) o pico é desviado para 340 nm. Cit *c* atum na forma nativa, apresenta o pico de fluorescência em 344 nm, indicando que um dos triptofanos encontra-se em ambiente menos hidrofóbico, enquanto na forma desnaturada, na qual ambos os triptofanos encontram-se expostos ao ambiente hidrofílico, o pico de fluorescência está em 349 nm.

Citocromo *c* de cavalo, na forma nativa, não exibe fluorescência de triptofano devido à supressão de fluorescência pela presença do átomo de ferro localizado próximo ao resíduo que recebe a energia do tipo Föster, contudo em pH 2,3, na forma desnaturada, a distância entre o resíduo de triptofano e o átomo de ferro é maior, desfavorecendo a transferência de energia do tipo Föster.

As **Figuras 52 e 53** mostram os espectros de fluorescência de citocromo *c* nativo de cavalo e atum, respectivamente, em presença de lipossomos PCPECL, em pH 7,4 e 6,2.

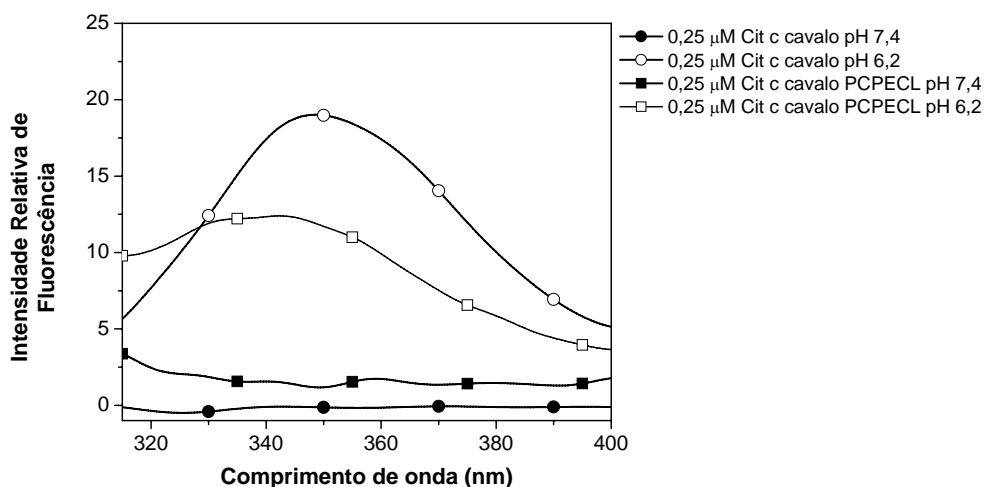


Figura 52. Espectro de fluorescência do triptofano de citocromo *c* de cavalo em presença de lipossomos PCPECL. Experimentos feitos nas seguintes condições: 0,25 μM de proteína, tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 2,3 contendo EDTA 0,1 mM, 50 μM lipossomos POPC/POPE/CL 50: 30: 20 mol % em tampão MES 20 mM, pH 7,4 ou 6,2 contendo EDTA 0,1 mM, 30°C, excitação em 292 nm, fenda de excitação 10 nm e emissão 10 nm.

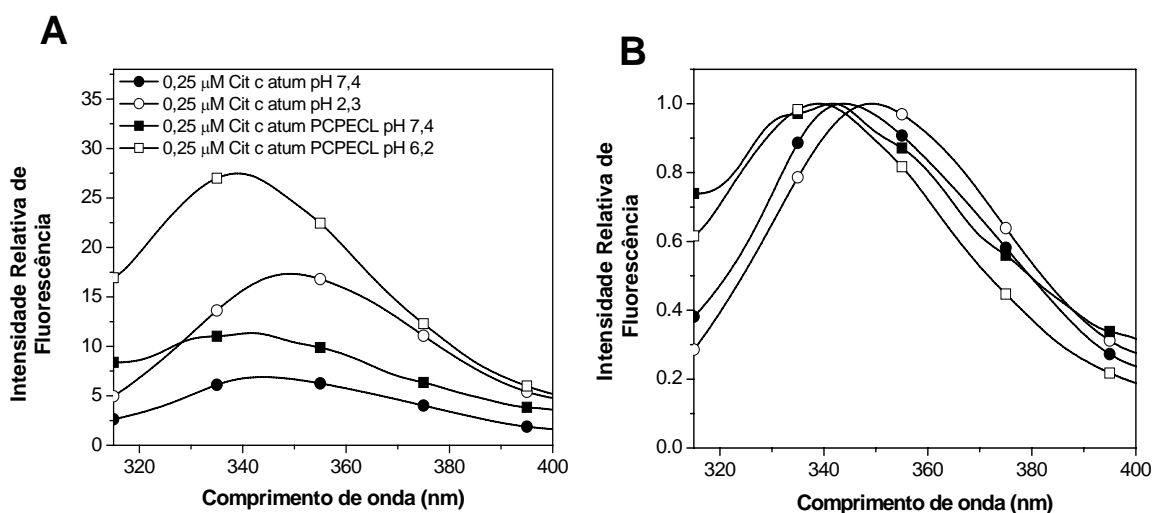


Figura 53. Espectro de fluorescência do triptofano de citocromo *c* de atum em presença de lipossomos PCPECL. Experimentos feitos nas seguintes condições: 0,25 μM de proteína, tampão fosfato de sódio 20 mM pH 2,3 contendo EDTA 0,1 mM, 50 μM lipossomos POPC/POPE/CL 50: 30: 20 mol % em tampão MES 20 mM pH 7,4 ou 6,2 contendo EDTA 0,1 mM, 30°C, excitação em 292 nm, fenda de excitação 10 nm e emissão 10 nm (A). (B) Dados da Figura 3A normalizados.

Em presença de lipossomos em pH 7,4, citocromo *c*, tanto de cavalo quanto de atum, não exibiram diferenças significativas no pico de emissão de fluorescência do triptofano (por volta de 342 nm). Contudo, em presença de lipossomos pH 6,2, houve um aumento significativo de intensidade de fluorescência e, a banda desviada para 342 e 339 nm em citocromo *c* de cavalo e atum, respectivamente, indicando a alteração estrutural da proteína nessas condições, levando possivelmente, a exposição dos resíduos de triptofano a um ambiente hidrofóbico.

A próxima figura, **Figura 54**, mostra o tempo de queda da fluorescência de triptofanos de citocromo *c* de atum na forma nativa, em presença e ausência de lipossomos e, a **Tabela 10** mostra os valores de lifetime obtidos por meio do ajuste de dados para duplo-exponencial.

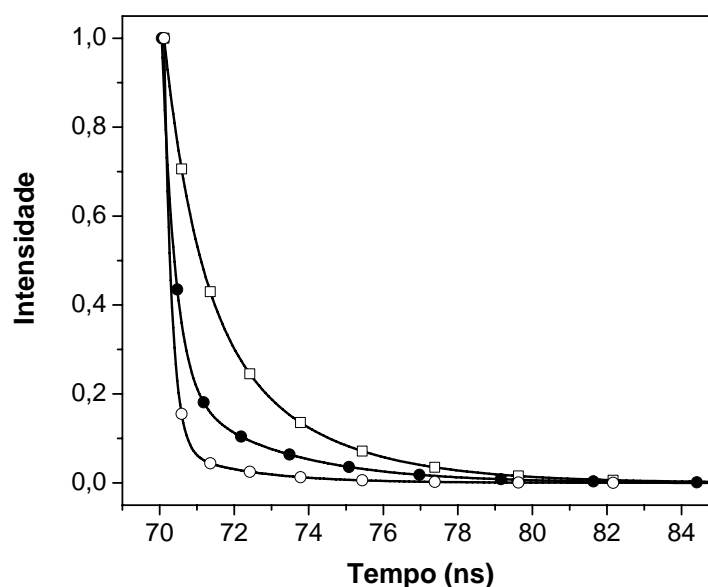


Figura 54. Queda da intensidade de fluorescência de citocromo *c* de atum versus o tempo. Círculos cheios: cit *c* atum em pH 7,4; Círculos abertos: cit *c* atum em pH 7,4 em presença de lipossomos; Quadrados abertos: cit *c* atum em pH 6,2 em presença de lipossomos; Dados ajustados com duplo-exponencial, deconvoluídos e normalizados. Experimentos feitos nas seguintes condições: cit *c* 1,0 μ M, 200 μ M lipossomos POPC/POPE/CL 50: 30: 20 mol % em tampão MES 20 mM pH 7,4 ou 6,2 contendo EDTA 0,1 mM, 30°C, excitação e emissão em 292 nm e 340 nm respectivamente, fenda de excitação e emissão 15 nm.

Tabela 10. Tempo de vida da fluorescência de citocromo *c* de atum na presença e ausência de lipossomos PCPECL.

Amostra	Lifetimes (ns)		Fatores	
			Preexponenciais	
1μM cit atum pH 7,4 ($\chi^2 = 1,482$) Fitting from 70,05 to 85 ns	τ_1	0,36	α_1	0,25
	τ_2	2,77	α_2	0,07
1μM cit atum PCPECL pH 7,4 ($\chi^2 = 1,195$) Fitting from 70,1 to 85 ns	τ_1	2,05	α_1	0,11
	τ_2	0,21	α_2	1,32
1μM cit atum PCPECL pH 6,2 ($\chi^2 = 1,561$) Fitting from 70,1 to 85 ns	τ_1	2,76	α_1	0,46
	τ_2	0,86	α_2	0,49

τ_1 e τ_2 representam o componentes do tempo de vida derivados do ajuste das curvas de queda com duplo-exponencial. Experimentos feitos nas condições descritas na **Figura 54**.

Esses resultados de *steady-state* e *lifetime* sugerem que, em tampão pH 7,4, na ausência de lipossomos, o resíduo de aminoácido Trp59 de citocromo *c* de atum provavelmente deve apresentar uma fluorescência com tempo de vida longo (lifetime $\tau_2 = 2,77$ ns, **Tabela 10**) por estar inserido na cavidade hidrofóbica da proteína. Enquanto que, o resíduo Trp33 apresentaria uma fluorescência com tempo de vida curto (lifetime $\tau_1 = 0,36$ ns) pois deve estar localizado próximo a superfície da molécula, em ambiente mais hidrofílico e distante do grupo heme, como representado no **Figura 55**.

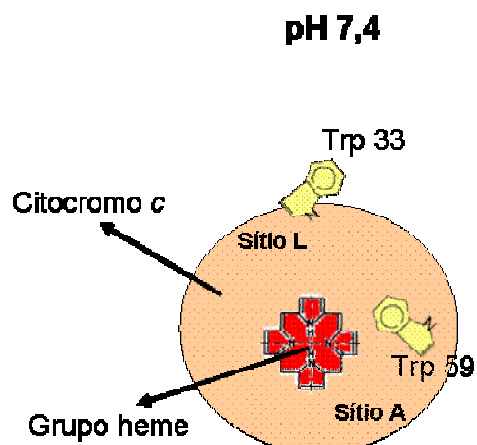


Figura 55. Representação do posicionamento dos resíduos de triptofano e do grupo heme de citocromo *c* de atum em tampão pH 7,4.

Na presença de lipossomos PCPECL, pH 7,4, ocorre a interação eletrostática entre o sítio A de cit *c* e a membrana, o que possivelmente altera a estrutura tridimensional da proteína (dado corroborado com os resultados de DSC adiante). Neste caso, possivelmente o resíduo de aminoácido Trp59, localizado próximo ao sítio A, deve se expor ao ambiente hidrofílico, como mostra o **Figura 56**, diminuindo assim, o tempo de vida da fluorescência para $\tau_2 = 0,21$ ns e aumentando o valor de fator preexponencial ($\alpha_2 = 1,32$), **Tabela 10**, pelo fato de não ser mais suprimido pelo grupo heme, uma vez que se encontra afastado do grupo hemínico. Já o resíduo Trp33, provavelmente deve estar posicionado para dentro da proteína, num ambiente mais hidrofóbico e próximo ao grupo heme, explicando assim, o aumento de tempo de vida da fluorescência de modo significativo para $\tau_1 = 2,05$ e diminuindo sua contribuição espectral ($\alpha_1 = 0,11$).

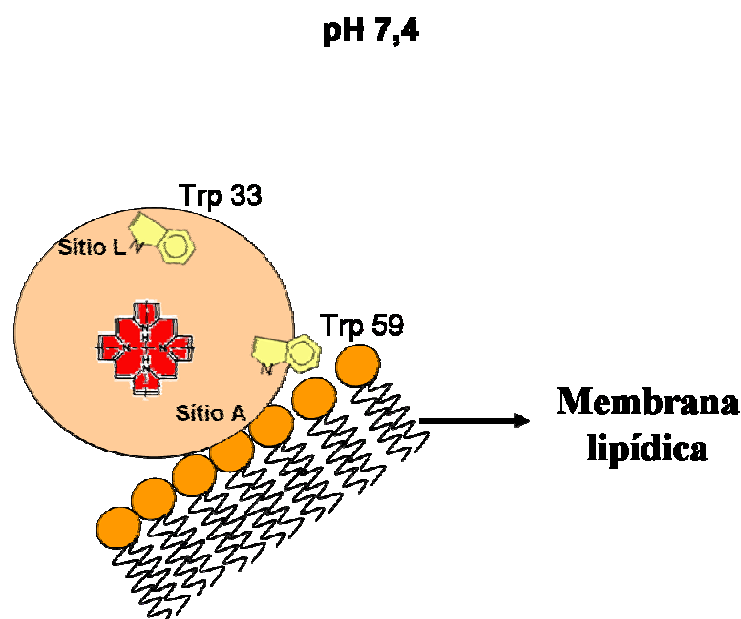


Figura 56. Representação do posicionamento dos resíduos de triptofano e do grupo heme de citocromo *c* de atum em tampão pH 7,4 na presença de lipossomos PCPECL.

Em pH 6,2, com o sítio L protonado e disponível para a interação de cit *c* com a membrana carregada negativamente, o resíduo de Trp33 provavelmente se desloca para a

região hidrofóbica dos lipossomos PCPECL, aumentando assim, o seu valor de lifetime ($\tau_1 = 2,76$) e o fator preexponencial ($\alpha_1 = 0,46$), uma vez que se encontra mais distante do grupo heme. A associação de cit *c* com membranas também ocorre via sítio A nesta condição, permitindo o resíduo de aminoácido Trp59 afaste-se do grupo heme e situe próximo à superfície da molécula, apresentando um lifetime $\tau_2 = 0,86$ e fator preexponencial de $\alpha_2 = 0,49$, como mostrado no **Figura 57**.

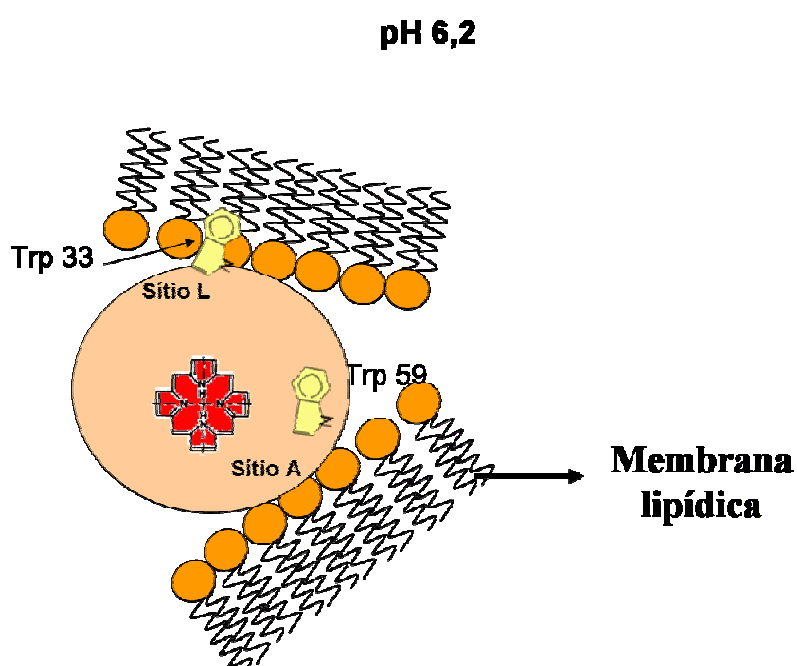


Figura 57. Representação do posicionamento dos resíduos de triptofano e do grupo heme de citocromo *c* de atum em tampão pH 6,2 na presença de lipossomos PCPECL.

Contudo, são necessárias outras medidas, para confirmar essas hipóteses, dentre elas, análise de lifetime de citocromo *c* de atum forma base livre na ausência e presença de lipossomos, uma vez que este não apresenta o átomo de ferro para suprimir a fluorescência dos triptofanos.

8.1.3. Estudo comparativo das propriedades termodinâmicas da associação de citocromo *c* com membranas de PCPECL via sítio A e L

O efeito da interação de citocromo *c* com lipossomos, de maneira dependente de pH, também foi estudado por meio de análise por calorimetria, *Differential Scanning Calorimetry* (DSC), técnica empregada para averiguar a temperatura de desnaturação da proteína. A **Figura 58** e **Tabela 11** mostram a temperatura de desnaturação de cit *c* de cavalo na presença e ausência de lipossomos contendo fosfolipídio carregado negativamente, tanto em pH 7,4 e 6,2.

Esses resultados estão de acordo com a literatura, na qual foram empregadas vesículas de DOPG (dioleoylphosphatidylglycerol) e DMPG (dimyristoylphosphatidylglycerol). Zhang e Rowe (ZHANG, ROWE, 1994) também observaram a queda na temperatura de desnaturação de citocromo *c*, de 82 para 50 graus Celsius, quando ligado a vesículas carregadas negativamente (DOPG) em pH 7,8, sugerindo perda da estabilidade estrutural da proteína e possível penetração parcial dela na bicamada lipídica. Heimborg e Biltonen (HEIMBURG, BILTONEN, 1994; HEIMBURG, HILDEBRANDT, MARSH, 1991), por meio de análises utilizando ^{31}P NMR (phosphorus nuclear magnetic resonance), DSC e titulação calorimétrica, demonstraram que a associação de cit *c* com membranas de DOPG tornou evidente o componente isotrópico ^{31}P NMR (contida na membrana), indicando alteração na organização tridimensional da membrana promovida por uma desordem local ou na sua curvatura no sítio de interação da proteína com a membrana. Contudo, são necessárias outras medidas e maior análise dos resultados.

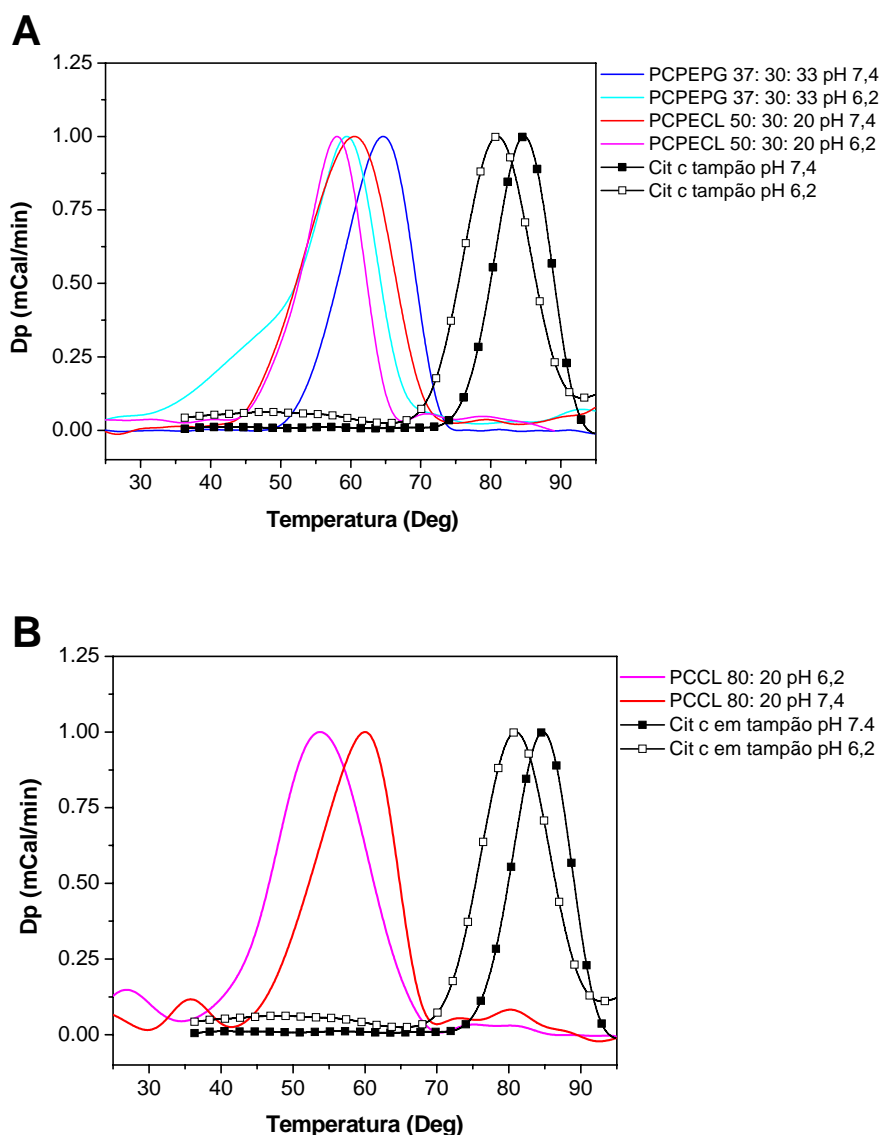


Figura 58. Análise de Differential Scanning Calorimetry (DSC) de citocromo *c* de cavalo na presença e ausência de lipossomos. Experimentos feitos nas seguintes condições: citocromo *c* de cavalo nativo 100 μ M, lipossomos 13,33 mM (razão lipídio/ proteína 133) POPC/POPE/POPG 37: 30: 30; POPC/POPE/CL 50: 30: 20 (A) e POPC/CL 80: 20 mol % (B), em tampão MES 20 mM pH 7,4 ou 6,2.

Tabela 11. Temperatura de desnaturação de citocromo *c* na ausência e presença de lipossomos, em pH 7,4 e 6,2

	pH 7,4 (°C)	pH 6,2 (°C)	Δ Temp
Citocromo <i>c</i>	84,7	80,9	3,8
POPC/POPE/POPG + cit <i>c</i>	64,6	59,4	5,2
POPC/POPE/CL + cit <i>c</i>	60,5	58,0	2,5
POPC/CL + cit <i>c</i>	59,9	53,8	6,1

Experimentos feitos nas condições descritas na Figura 58 acima.

8.2. Estudo das interações eletrostática e lipídeo estendida dos sítios A e L de citocromo *c* com modelos de membrana interna mitocondrial contendo lipídeos íntegros e oxidados por radicais livres e por oxigênio singlete

Durante o período de doutoramento da aluna, contribuiu para a discussão e elaboração de um trabalho que investiga a ação fotodinâmica de azul de metileno sobre citocromo *c* ligado a modelo de membrana mitocondrial interna (RODRIGUES et al., 2007), no qual foi descrito o papel protetor do fosfolípido insaturado em manter a capacidade apoptótica de citocromo *c*. Esse trabalho será continuado pela aluna durante seu pós-doutoramento, cujo projeto está em submissão na FAPESP. O resumo do projeto está descrito a seguir:

A capacidade de citocromo *c* exibir funções distintas dentro da mitocôndria e no citosol depende de sua associação com membranas. Dados na literatura descrevem que a ligação de citocromo *c* com membranas que mimetizam a membrana interna mitocondrial envolve interações do tipo eletrostática, via sítio A e hidrofóbica com o ancoramento da cauda acil do fosfolípido na cavidade hidrofóbica de citocromo *c* (interação lipídeo estendida). Além disso, no lado oposto ao sítio A, o citocromo *c* exibe o sítio eletrostático L, descrito recentemente, para interagir com vesículas PCPECL em pH abaixo de 7,0. Em vista disso, o foco desse projeto é determinar a possibilidade do envolvimento da interação lipídeo estendida entre citocromo *c* e membranas que mimetizam membrana interna mitocondrial via sítio L e A e, determinar o efeito da oxidação lipídica na interação do sítio A e L de citocromo *c* com membranas, distinguindo qual tipo de oxidação lipídica que exerce maior interferência na associação proteína/lipídeo: oxidação decorrente do ataque de oxigênio singlete, que leva a formação de peróxido de lipídeo; ou a oxidação promovida pelo ataque radicalar, que envolve a formação de peróxido de lipídeo e malondialdeído. Para isso, serão empregadas as técnicas

de ressonância plasmônica de superfície, para averiguar a afinidade de interação proteína-membrana, ressonância paramagnética de elétrons, para investigar a ocorrência de mudanças no estado de spin do ferro hemínico de citocromo *c* induzidas pelo tipo de cadeia acil dos fosfolípidios, dosagem de malondialdeído (MDA) e hidroperóxido de lipídeo (LOOH) para averiguar o dano na membrana.

Os resultados envolvendo a associação de citocromo *c* com membrana interna mitocondrial de mitoplastos em diferentes pHs, já estão sendo utilizados para confecção de um manuscrito, que será submetido em breve.

9. ANEXO 1 (*Parecer da Comissão de Ética em manipulação e experimentação animal – CEMEA/UMC autorizando o projeto*)

**COMISSÃO DE ÉTICA EM MANIPULAÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
CEMEA/UMC**

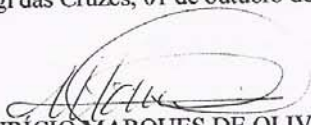
À Acadêmica
CÍNTIA KAWAI

PARECER

O trabalho intitulado: "IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO SÍTIO DE INTERAÇÃO DE CITOCROMO c COM FOSFOLIPÍDIOS PRESENTES NA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL" de autoria da acadêmica CÍNTIA KAWAI, sob orientação da Prof. Dra. ISELI LOURENÇO NANTES, foi considerado APROVADO por esta comissão. Consideramos a seleção, alojamento, manipulação e número de sujeitos experimentais adequados aos princípios bioéticos da utilização de animais em experimentação.

Sem mais no momento, despedimo-nos.

Mogi das Cruzes, 01 de outubro de 2007.



MAURÍCIO MARQUES DE OLIVEIRA
Presidente do CEMEA/UMC

Artigos publicados pela aluna durante o período de doutoramento

pH-dependent Interaction of Cytochrome *c* with Mitochondrial Mimetic Membranes

THE ROLE OF AN ARRAY OF POSITIVELY CHARGED AMINO ACIDS*[§]

Received for publication, November 5, 2004, and in revised form, July 11, 2005. Published, JBC Papers in Press, July 11, 2005, DOI 10.1074/jbc.M412532200

Cintia Kawai^{†1}, Fernanda M. Prado[§], Gabriel L. C. Nunes[†], Paolo Di Mascio[§], Ana M. Carmona-Ribeiro[§], and Iseli L. Nantes^{‡2}

From the [†]Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, São Paulo CEP 08780-911, Brazil and the [§]Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo CEP 05508-970, Brazil

The interaction of cytochrome *c* (cyt *c*) with mitochondrial mimetic vesicles of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, and heart cardiolipin (PCPECL) was investigated over the 7.4–6.2 pH range by means of turbidimetry and photon correlation spectroscopy. In the presence of cyt *c*, the decrease of pH induced an increase in vesicle turbidity and mean diameter resulting from vesicle fusion as determined by a rapid decrease in the excimer/monomer ratio of 2-(10-(1-pyrene)-decanoyl)-phosphatidylcholine (PyPC). *N*-acetylated cyt *c* and protamine, a positively charged protein, increased vesicle turbidity in a pH-independent manner, whereas albumin did not affect PCPECL vesicle turbidity. pH-dependent turbidity kinetics revealed a role for cyt *c*-ionizable groups with a $pK_{a(\text{app})}$ of ~ 7.0 . The carbethoxylation of these groups by diethylpyrocarbonate prevented cyt *c*-induced vesicle fusion, although cyt *c* association to vesicles remained unaffected. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight analysis revealed that Lys-22, Lys-27, His-33, and Lys-87 cyt *c* residues were the main targets for carbethoxylation performed at low pH values (< 7.5). In fact, these amino acid residues belong to clusters of positively charged amino acids that lower the pK_a . Thus, at low pH, protonation of these invariant and highly conserved amino acid residues produced a second positively charged region opposite to the Lys-72 and Lys-73 region in the cyt *c* structure. These two opposing sites allowed two vesicles to be brought together by the same cyt *c* molecule for fusion. Therefore, a novel pH-dependent site associating cyt *c* to mitochondrial mimetic membranes was established in this study.

Cytochrome *c* (cyt *c*)³ has become an object of great interest because, besides its known role in the respiratory chain, it exhibits the ability to detach from the inner mitochondrial membrane and trigger events in

the cytosol that promote apoptosis (1, 2). Events that lead to cellular oxidative stress and loss of mitochondrial membrane potential, such as Ca^{2+} -induced permeability transition or photodynamic therapy, are known inducers of apoptosis and cyt *c* release (3–12).

The ability of cyt *c* to exhibit distinct functions within mitochondria and in the cytosol is related to the cellular localization of the heme protein, the only peripheral protein that interacts with the external face of the inner mitochondrial membrane (13, 14). The detachment of cyt *c* from the mitochondrial membrane involves reversible interaction of the protein with the lipid bilayer. Therefore, the nature and specificity of the interaction of cyt *c* with lipid bilayers have been a focus of several studies (13, 15, 17, 18). Both electrostatic and hydrophobic interactions have been found to be important factors in the association of cyt *c* with phospholipid membranes (19–21). Studies conducted with model systems have indicated the existence of two different cyt *c* sites, A and C, which are responsible for the association with lipid bilayers (19, 22, 23). Site A is an electrostatically interacting site constituted of basic residues in cyt *c*, probably Lys-72 and Lys-73. Site C is another lipid-binding site in cyt *c* with a high affinity to protonated acidic phospholipids. The invariant Asn-52 in horse heart cyt *c* has been assigned as the amino acid residue that binds to protonated acidic phospholipids via hydrogen bonds (19, 22, 23). Whatever the site involved in the interaction of cyt *c* with the phospholipid head group, one phospholipid acyl chain can be accommodated within a hydrophobic channel of the protein. In cyt *c*, this channel is lined by hydrophobic amino acid residues and leads from the surface of the protein to the heme crevice. In this regard, the cyt *c* amino acid residues Lys-72 and Lys-73 (site A) are located at one side of the channel opening, whereas Asn-52 (site C) is located at the opposite side. Electron paramagnetic resonance studies (21) have shown a clear correlation between the nature of the lipid acyl chain and the spin states of cyt *c* interacting with different types of lipid membranes.

Kostrzewa *et al.* (24) determined the membrane location of spin-labeled cyt *c* using paramagnetic agents and found that this protein does not penetrate the membrane's interior and that the electrostatic interaction occurs on the side where Lys-86, Lys-87, and Lys-72 are located (7, 24). However, on the external surface of the inner mitochondrial membrane the clusters of positively charged amino acid side chains (site A) are important for the recognition and binding of the cyt *c* reductase

* This work was supported in part by the Brazilian research funding agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa da Universidade de Mogi das Cruzes (FAEP-UMC), and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) as well as the John Simon Guggenheim Memorial Foundation (fellowship to P. D. M.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[§] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental material that includes MALDI-TOF mass spectrometry analysis of cyt *c* (Figs. 9 and 10) and data on identifiable tryptic fragments of native and DEPC-modified cyt *c*.

¹ A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo fellow.

² To whom correspondence should be addressed: Universidade de Mogi das Cruzes, Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica-CIIB, Prédio I, Sala 15-15, CEP 08780-911 São Paulo, Brazil. Tel.: 55-11-4798-7103; Fax: 55-11-4798-7102; E-mail: ilnantes@umc.br.

³ The abbreviations used are: cyt *c*, cytochrome *c*; CL, cardiolipin; DEPC, diethylpyrocarbonate; DPPC, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; DPPE, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; E/M, excimer/monomer ratio; H_{ij} , hexagonal

inverted; MALDI, matrix-assisted laser desorption ionization; PCPECL, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, and heart cardiolipin; PCPEPG, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, and phosphatidylglycerol; PyPC, 2-(10-(1-pyrene)-decanoyl)-phosphatidylcholine; TOF, time-of-flight.

Interaction of Cytochrome *c* with Membranes

and oxidase (13, 25). Therefore, the assignment of the cyt *c* sites that interact with the membrane and neighboring respiratory proteins continues to pose a challenge. In this regard, the occurrence of cyt *c*-mediated fusion of phospholipid vesicles suggests the existence of at least two sites for cyt *c* attachment to membranes (26). In this work, we present results of cyt *c*-mediated vesicle fusion that suggest the existence of one more site for electrostatic interaction of cyt *c* with acidic phospholipids involving the amino acid residues Lys-22 and Lys-27.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals—Cyt *c* (horse heart, type III), acid-modified (*N*-acetylated) cyt *c*, HEPES, egg yolk phosphatidylethanolamine, egg yolk phosphatidylcholine, bovine heart cardiolipin (CL), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE), 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, (Ile-7)-angiotensin III acetate salt, and ACTH fragment 18–39 were purchased from Sigma. 2-(10-(1-Pyrene)-decanoyl)-phosphatidylcholine (PyPC) was supplied by Molecular Probes (Eugene OR).

Preparation of Liposomes—Lipids were first dissolved in chloroform, which was evaporated with N₂ gas. The lipid residue was kept under reduced pressure for at least 2 h, after which it was hydrated by adding cold 5 mM HEPES buffer. After the addition of buffer, the mixture was stirred with a vortex and sonicated at on ice in 30-s bursts with 1-min cooling intervals using a microtip-equipped Thornton ultrasonic processor at an output of 60 watts. Liposome preparations were centrifuged at 8,000 \times *g* at 4 °C for 10 min to precipitate the titanium released by the sonicator tip.

Electronic Absorption Spectrometry and Turbidity—Electronic absorption and turbidity measurements were conducted in a photodiode spectrophotometer (Shimadzu Scientific Instruments Inc., Columbia, MD) by using quartz cuvettes of 1-cm light path and a slit of 0.5 nm.

pH Dependence of Cyt *c*-Promoted Vesicle Fusion—The kinetics of vesicle fusion was monitored continuously by the increase in turbidity at 480 nm by using a Shimadzu model MultiSpec 1501 photodiode array spectrophotometer. Vesicles alone, without cyt *c*, were used as blanks.

pK_a Measurements—The pK_a values of the prototropic groups influencing vesicle fusion were determined by measuring the pH-dependent turbidity increase. The data on turbidity increase (Δ turbidity at 480 nm) as a function of pH were analyzed according to Equation 1.

$$\Delta\text{turbidity} = \frac{\text{lim}_1 \cdot 10^{(\text{pH} - \text{p}K_a)}}{10^{(\text{pH} - \text{p}K_a)} + 1} \quad (\text{Eq. 1})$$

Determination of Mean Zeta Average Diameters (*Dz*) and Zeta Potentials (ζ) for Vesicles in the Presence or Absence of Cyt *c*—At 25 °C *Dz* and ζ were determined by dynamic light scattering and laser-Doppler microelectrophoresis, respectively, using a ZetaPlus-ZetaPotential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY) equipped with a 570-nm laser and dynamic light scattering at 90° for particle sizing (27). Particle size (*Dz*) and ζ were mean values calculated from at least 10 independent measurements with S.D. <5% from the mean. ζ was determined in pure water from electrophoretic mobility μ and Smoluchowski's equation $\zeta = \mu\eta/\epsilon$, where η is the medium viscosity and ϵ the medium dielectric constant. The final lipid concentration varied from 0.25 to 1.0 mM.

Vesicle Fusion Detected by PyPC—For fluorescence measurements, aliquots of small unilamellar 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, and heart cardiolipin (PCPECL; 50:30:20% mol) vesicles containing PyPC (7% mol) were added to identical unlabeled PCPECL vesicles to a final

ratio of 1:10 labeled/unlabeled vesicles. Fluorescence emission spectra were recorded at 30 °C using a F-2500 Hitachi fluorescence spectrometer.

Carboxyethylation of Cyt *c* by Diethylpyrocarbonate (DEPC)—Samples of 100 μ M cyt *c* in 10 mM HEPES buffer, pH 7.4, or in 10 mM acetate buffer, pH 5.25, were reacted with 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 9-, 15-, 25-, 50-, and 100-fold molar excess DEPC at room temperature for 1 min. The samples were then dialyzed for 2 h before subjecting them to matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) mass spectrometry analysis.

MALDI-TOF Mass Spectrometry—All linear, reflectron (not shown), and post-source decay (not shown) spectra were acquired on an Ettan MALDI-TOF Pro mass spectrometer that can operate in linear mode or in reflectron mode using a harmonic reflectron that increases resolution and sharpens time focusing. The accelerating voltage was set at 20 kV. The samples were mixed with an equal volume of a saturated solution (5 mg/ml) of 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile and 0.5% trifluoroacetic acid, and 0.5 μ l of the mixture was loaded onto the stainless steel MALDI slides for analysis. Cyt *c* was digested by trypsin. Prior to MALDI-TOF analysis, the supernatant containing tryptic peptide was dried by vacuum centrifugation and dissolved in 10 μ l of water. An equal volume of the peptide solution was mixed with a saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (prepared such as described above), and 0.5 μ l of the 8-pmol peptide solution was loaded onto the stainless steel MALDI slides for analysis. The external calibration for the linear mode was performed before analysis with bovine cyt *c*. Reflectron mode calibration was conducted using (Ile-7)-angiotensin III acetate salt and ACTH fragment 18–39. The data were analyzed using the Ettan MALDI-TOF Pro software. Sequencing of cyt *c* tryptic peptides was made with Ettan CAFTM MALDI sequencing kit (Amersham Biosciences).

RESULTS

Effect of pH on the Instability of Mitochondrial Mimetic PCPECL Vesicles Promoted by Cyt *c*—Fig. 1A shows the effect of pH on the cyt *c*-promoted colloidal instability of mitochondrial mimetic PCPECL vesicles. The turbidity kinetic mediated by cyt *c* was carried out over a pH range of 6.2–7.4. This pH range was chosen because it is expected in the mitochondrial intermembrane space under different conditions such as respiring and coupled mitochondria or in the presence of respiratory inhibitors or uncoupling compounds (28, 29). The drop in pH from 7.4 to 6.2 promoted a corresponding increase in the sample's turbidity, as indicated by the arrow (Fig. 1A). The kinetic data did not fit to the first order equation Δ turbidity = Δ turbidity_∞[1 - e^{-*k**t*}] (figure not shown). The log(Δ turbidity) versus log(time) plot revealed that the increase in vesicle turbidity followed a multiphasic process (Fig. 1B). In fact, this observation is expected because, during the course of the fusion process, the size and radius of the curvature of the liposomes are changing. These results indicate that in-depth physico-chemical studies of this process should yield the basic mechanism of fusion of the PCPECL vesicles mediated by cyt *c*.

Fig. 2 shows the effect of pH on the turbidity of PCPECL (closed circle) and PCPEPG (closed triangle) vesicles after 10 min of interaction with cyt *c* over a pH range of 1.5–9.0. PCPEPG was used here for purposes of comparison with PCPECL to discard the possible formation of hexagonal phase *H*_{ii} mediated by cyt *c* as a consequence of its interaction with CL (30). In the absence of cyt *c* and at a pH below 2.5, instability of PCPECL (Fig. 2, open circle) and PCPEPG (open triangle) vesicles occurred because of the protonation of phosphate moieties in acidic phospholipids. Above pH 2.5, vesicles were stable, and instability was

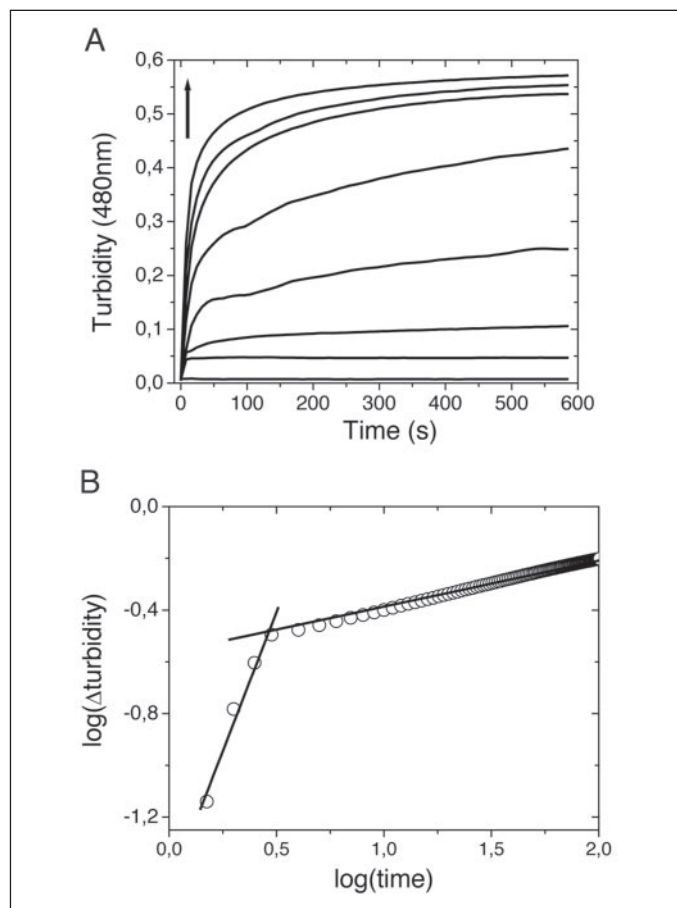


FIGURE 1. A, effect of pH on the turbidity of the medium containing PCPECL vesicles and cytochrome *c*. Experiments were carried out at 30 °C using 0.25 mM lipids containing 50% DPPC, 30% DPPE, and 20% CL in 10 mM HEPES buffer at pH 6.2 in the absence of cytochrome *c* and pH 7.4, 7.2, 7.0, 6.8, 6.6, 6.4, and 6.2 in the presence of 4 μ M cytochrome *c*, as indicated by the arrow. The experiments performed at pH 6.4 and 6.2 were reproduced with 10 mM carbonate buffer (see Fig. 9 in the supplemental materials in the on-line version of this article). B, plot of $\log(\Delta$ turbidity) \times \log (time) by using the data of turbidity increase at pH 6.2 shown in panel A.

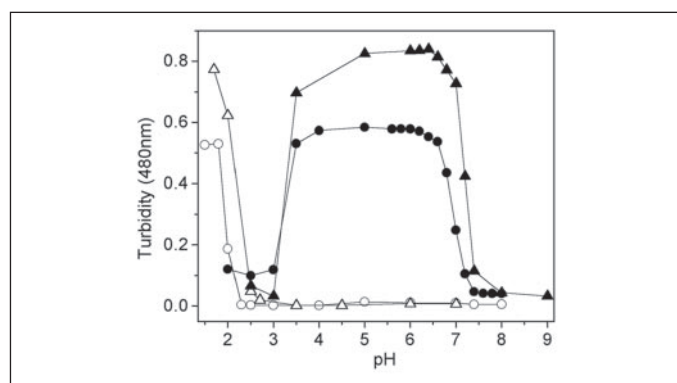


FIGURE 2. Effect of pH on the turbidity at 480 nm of the medium containing PCPECL vesicles (open circles), PCPECL vesicles plus 4 μ M cytochrome *c* (solid circles), PCPEPG vesicles (open triangles), and PCPEPG vesicles plus 4 μ M cytochrome *c* (solid triangles). The turbidity was determined 10 min after incubation at 30 °C. Experiments were carried out at with 0.25 mM lipids containing 50% DPPC, 30% DPPE, and 20% CL or phosphatidylglycerol. The medium was acidified and alkalinized by the addition of HCl and NaOH, respectively.

detected only upon the addition of cytochrome *c* (Fig. 2, closed circle and closed triangle). An analysis of the pH curves in the presence of cytochrome *c* reveals two transitions. The first transition, around pH 3.0, suggests that the native cytochrome *c* structure was crucial to induce vesicle fusion because it was close to the cytochrome *c* acid transition (15, 31). The pK_a value for the second

TABLE ONE
Effect of pH on the diameter of PCPECL liposomes

Experimental condition ^a	pH 7.4	pH 6.8	pH 6.2
	nm	nm	nm
PCPECL	61.1 \pm 0.3 ^b	69.9 \pm 0.2 ^b	76.2 \pm 1.0 ^b
PCPECL + cyt <i>c</i>	54.0 \pm 0.4 ^b	104.0 \pm 2.5 ^b	1030.4 \pm 17.8 ^b

^a Experiments were carried out under the following conditions: 10 mM HEPES, 30 °C, 4 μ M cytochrome *c* in the presence of 0.25 mM liposomes containing phosphatidylcholine (50%), phosphatidylethanolamine (30%), and CL (20%).
^b The error value refers to the value obtained by the measurement and not to the vesicles diameter in the sample.

transition was obtained by fitting pH data to Equation 1 by non-linear regression analysis, yielding values of 6.95 \pm 0.08 and 7.19 \pm 0.01 in the presence of PCPECL and PCPEPG vesicles, respectively.

As expected, the increased turbidity of the sample mediated by cytochrome *c* was associated with an increase of the mean vesicle size, as shown by photon correlation spectroscopy (TABLE ONE). In the absence of cytochrome *c*, the decrease in pH led to a minor change in the mean size of the vesicles. However, in the presence of cytochrome *c*, decreasing the pH from 7.4 to 6.2 led to a dramatic increase in the mean vesicle size (TABLE ONE).

The Cause of Cyt c-promoted Turbidity Increase in PCPECL Vesicles—To determine whether fusion or aggregation was responsible for the cytochrome *c*-promoted colloidal instability of PCPECL vesicles, changes in the vesicles' average size were compared with a decrease in the excimer/monomer (E/M) ratio of PyPC present in PCPECL vesicles, which were mixed with unlabeled vesicles in the presence or absence of cytochrome *c*. Similarly to what was observed in small unilamellar egg phosphatidylcholine vesicles containing 7 mol % PyPC (33), control experiments demonstrated that the E/M ratio of PCPECL vesicles containing 7 mol % PyPC in PCPECL was unaffected by dilution, remaining virtually unchanged after 2 h of incubation at two pH values, 6.2 and 7.4, in the presence of a 10-fold excess of unlabeled PCPECL vesicles (not shown). The addition of cytochrome *c* to a mixture of 7 mol % PyPC-labeled and unlabeled small unilamellar vesicles caused the E/M ratio to drop from 0.25 to 0.13 at pH 6.2 (Fig. 3). At pH 7.4 the E/M ratio remained constant as a function of time and equal to 0.25 after the addition of the same amount of cytochrome *c* (Fig. 3). The insert compares the kinetic curves of the cytochrome *c*-promoted E/M ratio decrease for PyPC in PCPECL vesicles at pH 7.4 and 6.2.

Assignment of the pK_a Values to Specific Ionizable Groups—At this point a question was raised. Was the pK_a value of 6.95, obtained in the presence of PCPECL, or the value of 7.19, measured in the presence of PCPEPG vesicles, related to the ionization of phospholipid head groups or to the amino acid residues of the protein? If the first possibility was correct, the ζ potential of the PCPECL vesicles should have varied significantly over the pH range of 6.2–7.4, indicating a decrease in the negative charge density at the vesicle surface due to protonation of phosphate moieties. In a pH range of 6.2–7.4, PCPECL vesicles containing 20% CL did not display a significant variation in ζ potential, which remained practically constant at -100 mV. In PCPECL vesicles containing cytochrome *c*, the ζ potential was also constant but at -50 mV over the same pH range, indicating that cytochrome *c* was electrostatically attached to the vesicles. Therefore, the electrostatic interaction of cytochrome *c* with PCPECL vesicles occurs below this protein's pI (10.5), but fusion should be dependent on the ionization of specific amino acid side chains, suggesting specificity of cytochrome *c* to promote the fusion of PCPECL vesicles in a pH-dependent manner. Fig. 4 compares the ability of two basic proteins (cytochrome *c*, lines *a* and *d*, and protamine, lines *b* and *c*) and one acidic protein (serum albumin, lines *e* and *f*) to promote PCPECL vesicle fusion in a

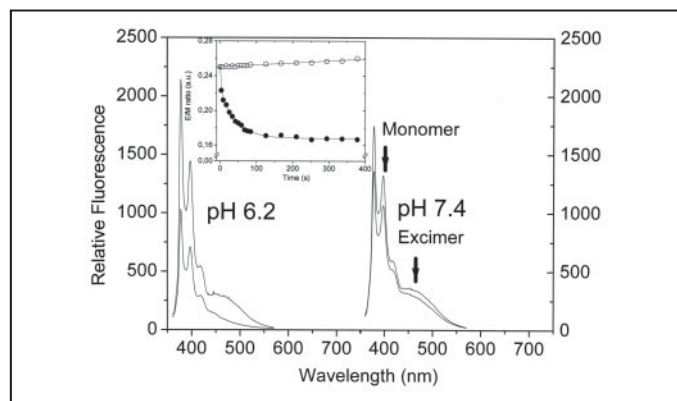


FIGURE 3. Effect of cyt *c* on the fluorescence emission spectra of small unilamellar PCPECL vesicles containing 7 mol % PyPC. Vesicles (0.05 mM PCPECL; labeled/unlabeled = 1:10) incubated at 30 °C in 10 mM HEPES buffer with 0.9 μ M cyt *c* for 378 s at pH 6.2 and pH 7.4. The inset shows the temporal variation of E/M at pH 6.2 (solid circle) and pH 7.4 (open circle).

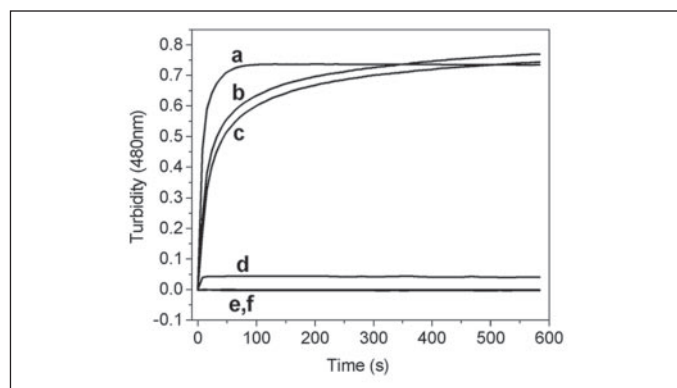


FIGURE 4. Comparison of the ability of cyt *c*, protamine, and serum albumin to induce fusion of PCPECL vesicles. The experiments were carried out at 30 °C in the presence of 0.25 mM PCPECL and the following proteins at 4 μ M: cyt *c* at pH 6.2 (a); protamine at pH 7.4 (b); protamine at pH 6.2 (c); cyt *c* at pH 7.4 (d); serum albumin at pH 7.4 (e); and serum albumin at pH 6.2 (f). Experiments were carried out with 0.25 mM lipids containing 50% DPPC, 30% DPPE, and 20% CL in 10 mM HEPES buffer.

pH-dependent manner. Protamine exhibited the same efficiency at pH 7.4 and 6.2 (Fig. 4, lines *b* and *c*, respectively) to promote colloidal instability in PCPECL vesicles, whereas serum albumin failed to promote instability at these pH values (lines *e* and *f*, respectively). The decrease in PCPECL vesicle fusion promoted by the increase of the pH was substantial only with cyt *c*.

Considering the possibility that the pK_a of ~ 7.0 is attributable to cyt *c* amino acid residues, imidazole groups of histidine emerged as the probable ionizable residues. However, clusters of lysine residues in which the proximity of positively charged groups led to significantly reduced pK_a values should not be discarded. An analysis of the cyt *c* structure revealed a cluster of positively charged residues encompassing Lys-22, Lys-25, Lys-27, His-26, and His-33 in a region on the opposite side of sites A (Lys-72 and Lys-73) and C (Asn-52). In this region, the side chains of lysine residues are confluent, possibly favoring the decrease of the pK_a values in their lateral side chains. Therefore, this region is a probable site of interaction with acidic phospholipids at pH 6.2, but not at pH 7.4, at which these residues should be deprotonated. Interestingly, the side chains of Lys-72 and Lys-73 residues are divergent at site A, suggesting a high pK_a value for these side chain amino groups. This possibility was checked by carboxylation of cyt *c* with DEPC at different pH values and also at different protein/DEPC ratios. Fig. 5, left section, shows how the pH (5.6–8.0) in which cyt *c* was treated with DEPC in 3-fold molar excess affects the efficiency of cyt *c* to mediate

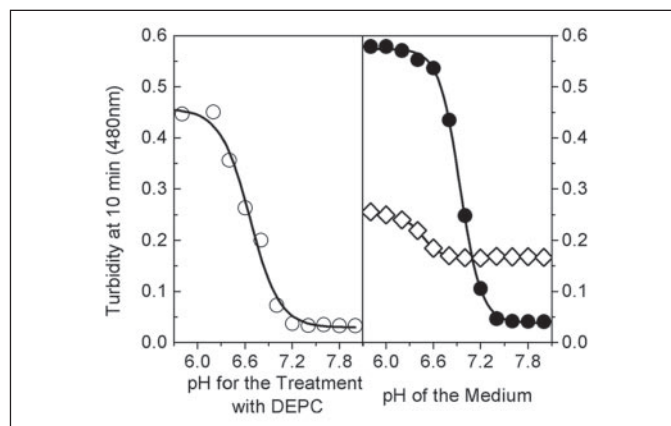


FIGURE 5. Effect of carboxylation and *N*-acetylation on the ability of cyt *c* to induce PCPECL vesicle fusion. The left section shows the effect of the pH in which the cyt *c* carboxylation was carried out on its ability to induce fusion of PCPECL vesicles. The fusion was determined according to the increase in turbidity at 480 nm after 10 min of incubation with DEPC-treated cyt *c* at pH 6.2. The right section shows the effect of pH on the turbidity of the medium containing PCPECL vesicles incubated with native (solid circles) and *N*-acetylated (open diamonds) cyt *c* for 10 min. The experiments were carried out at 30 °C in the presence of 0.25 mM PCPECL and native or chemically modified cyt *c* at 4 μ M.

PCPECL vesicle fusion at pH 6.2 (open circle). This result was compared with the pH curve for PCPECL vesicle fusion mediated by native cyt *c* over the same pH range (Fig. 5, closed circle in the right section). The right side in Fig. 5 shows that the pronounced effects of pH on turbidity changes induced by cyt *c* (closed circles) were in striking contrast to the almost complete absence of a pH effect for *N*-acetylated cyt *c* (open diamonds). The pK_a value of 6.75 ± 0.07 obtained for the effect of pH in which cyt *c* was treated with DEPC 1:3 (open circles) was close to the pK_a value (6.95 ± 0.08) for native cyt *c*-mediated PCPECL vesicle fusion. These results suggest that contrary to *N*-acetylation, which blocked all cyt *c* lysine residues, the carboxylation of cyt *c* blocked ionizable amino groups with a pK_a of around pH 7.0 involved in the interaction with lipid bilayers responsible for the fusion process.

The identification of the number of carboxylated amino acid residues in the cyt *c* structure was done by MALDI-TOF mass spectrometry analysis. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of DEPC-modified cyt *c* obtained at pH 7.4 in the presence of different DEPC/cyt *c* ratios, from 1 to 100, revealed that, at most, 12 cyt *c* residues could be modified by DEPC under this condition. (Fig. 6A, open circles, and Table II of the supplemental materials, available in the on-line version of this article). Tryptic digestion of these samples identified, at most, 11 carboxylated amino acids (Fig. 6A, closed circle). The carboxylated amino acids identified by tryptic digestion were as follows; Lys-22, Lys-27, and Lys-87 when the DEPC/cyt *c* ratio = 3; Lys-22, Lys-27, His-33, and Lys-87 when the DEPC/cyt *c* ratio = 5; Lys-22, Lys-27, His-33, Lys-87, Lys-39, and/or Lys-53, Lys-60, and/or Lys-72 when the DEPC/cyt *c* ratio = 6; Lys-22, Lys-27, His-33, Lys-87, Lys-39 and/or Lys-53, Lys-60, and/or Lys-72, Lys-79, and Lys-86 when the DEPC/cyt *c* ratio = 9; and Lys-22, Lys-27, His-33, Lys-87, Lys-39, and/or Lys-53, and/or Lys-55, Lys-60, and/or Lys-72, Lys-79, and Lys-86 when the DEPC/cyt *c* ratio = 50. A more detailed explanation about the identification of the carboxylated amino acid residues is provided in the supplemental material (Figs. 9 and 10 and Table II, available in the on-line version of this article).

All of the carboxylated cyt *c* samples were tested regarding their ability to induce vesicle fusion at pH 6.2 (not shown) and to interact with acidic phospholipids, as attested by pyrene fluorescence quenching. The quenching observed under these conditions was prevented by the prior

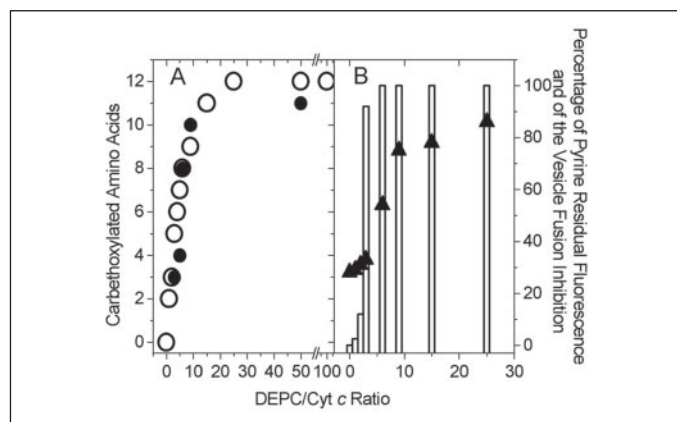


FIGURE 6. A, effect of the DEPC/cyt *c* ratio on the number of carboxylated amino acid residues. MALDI-TOF mass spectrometry was carried out as described under "Materials and Methods." The *open circle* represents the maximal number of modified amino acids detected in the sample, and the *closed circle* represents the maximal number of carboxylated amino acid residues identified in cyt *c* tryptic fragments of the corresponding samples. The amino acid types, identified by tryptic digestion, were as follows; Lys-22, Lys-27, and Lys-87 for DEPC/cyt *c* ratio = 3; Lys-22, His-33, and Lys-87 for DEPC/cyt *c* ratio = 5; Lys-22, Lys-27, His-33, Lys-87, Lys-39, and/or Lys-53, Lys-60, and/or Lys-72 for DEPC/cyt *c* ratio = 6; Lys-22, Lys-27, His-33, Lys-87, Lys-39, and/or Lys-53, Lys-60, and/or Lys-72, Lys-79, and Lys-86 for DEPC/cyt *c* ratio = 9; Lys-22, Lys-27, His-33, Lys-87, Lys-39, and/or Lys-53, and/or Lys-55, Lys-60, and/or Lys-72, Lys-79, and Lys-86 for DEPC/cyt *c* ratio = 50. B, percentage of pyrene residual fluorescence at 398 nm in PyPC-marked PCPECL vesicles (*solid triangles*) and the corresponding percentage of the inhibition of vesicle fusion detected after the addition of native or carboxylated cyt *c*. The increase of the pyrene residual fluorescence indicates impairment of cyt *c* binding to PCPECL vesicles.

addition of NaCl (not shown). Fig. 6B shows the effect of the number and location of cyt *c* carboxylation on the impairment of vesicle fusion (*open bar*) and on the protein's ability to bind to PCPECL vesicles (*closed triangles*). For the DEPC/cyt *c* ratios of 1:1, 1:2, 1:3, and 1:4, the percentage of fusion inhibition was 2.5, 12, 92, and 100%, respectively (*open bars*). Although cyt *c* treated with DEPC in the protein/modifier ratio of 1:3 was unable to induce significant vesicle fusion at pH 6.2, it remained able to bind acidic phospholipids as attested by the low percentage of residual pyrene fluorescence (Fig. 6, *closed triangles*). As expected, when modifications in fragments containing Lys-72 were detected, the capacity to bind in PCPECL vesicles was significantly decreased. This result suggests that a significant population of cyt *c* molecules exhibits carboxylated Lys-72 only in samples treated with a DEPC molar excess of ~5. Although MALDI-TOF was not quantitative, the results presented in Fig. 6A showed that in this case the detection of modified residues by MALDI-TOF was correlated with the amount of such residues in the sample. According to MALDI-TOF mass spectrometry analysis, cyt *c* treated with 3-fold molar excess of DEPC, a condition that significantly inhibits its capacity to fuse PCPECL vesicles, exhibits predominantly three carboxylated amino acid residues and attains, at most, five chemical modifications (not shown). However, as shown previously, MALDI-TOF mass spectrometry analysis of DEPC-modified cyt *c* fragments obtained by digestion with trypsin could identify only three modified amino acid residues, namely Lys-22, Lys-27, and Lys-87 (see supplemental materials in the on-line version of this article). Therefore, we decided to chemically modify cyt *c* in a condition in which a more homogeneous sample could be obtained. Fig. 7A shows that the treatment of cyt *c* with a 15-fold molar excess of DEPC at pH 5.25 inhibited vesicle fusion by ~85%. MALDI-TOF analysis of this sample revealed two main peaks (around 85% of the area) exhibiting one and two modifications (Fig. 7B). The digestion of this sample revealed modifications in Lys-27 and/or His-26 and His-33 (see comments and Table II of the supplemental materials). The results

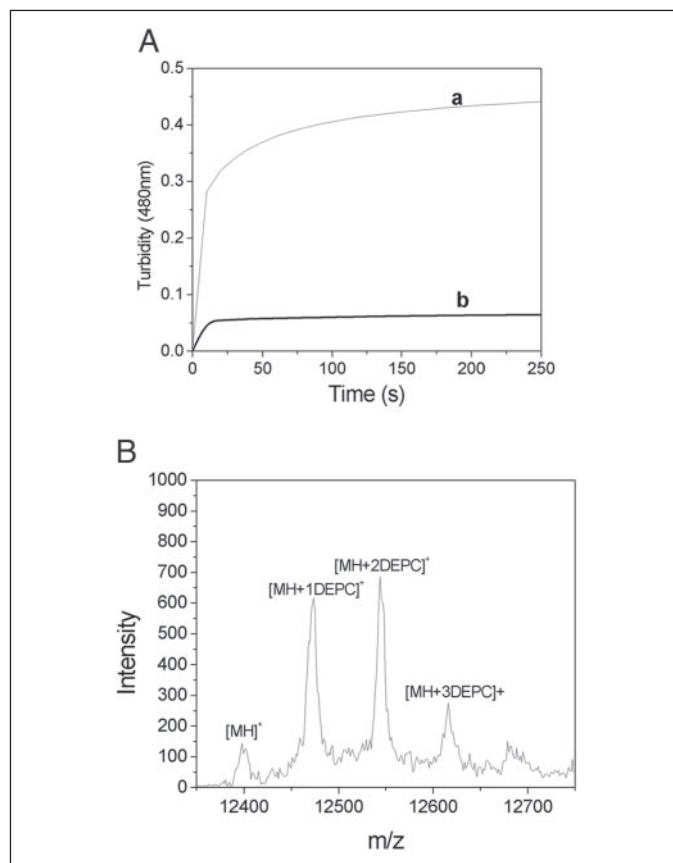


FIGURE 7. A, effect of the carboxylation of cyt *c* on the turbidity of the medium containing PCPECL vesicles and cyt *c*. Experiments were carried out at 30 °C using 0.25 mM lipids containing 50% DPPC, 30% DPPE, and 20% CL in 10 mM HEPES buffer at pH 6.2 in the presence of native cyt *c* (*line a*) and in the presence of cyt *c* treated with a 15-fold molar excess of DEPC in 10 mM acetate buffer at pH 5.25 (*line b*). B, MALDI-TOF mass analysis of cyt *c* carboxylation. Cyt *c* was reacted with 15-fold molar excess of DEPC in 10 mM acetate buffer, pH 5.25, at room temperature for 2 min. A linear positive ion MALDI-TOF spectrum of carboxylation of cyt *c* was acquired on an Ettan MALDI-TOF Pro mass spectrometer with linear detector and reflectron detector using a harmonic reflectron that increases resolution and sharpens time focusing. The accelerating voltage was set at 20 kV.

obtained with a 3-fold molar excess of DEPC at pH 7.4 and a 5-fold molar excess of DEPC at pH 5.25 are in accordance with the postulation that the region of cyt *c* structure located at the opposite side of site A and herein named site L is the site involved in vesicle fusion promoted by cyt *c* at low pH values. Considering that site L is located on the opposite side of site A in the cyt *c* structure (Fig. 8) (32), it is logical to assume that, because cyt *c* was electrostatically attached to PCPECL vesicles at one site, the other site was accessible to interaction with another vesicle, thus favoring the fusion process. However, the occurrence of vesicle fusion was favored by the presence of the hexagonal inverted phase H_{II} . The importance of this hexagonal inverted phase was evidenced by the fact that cyt *c*-mediated fusion in acidic pH was impaired in vesicles that did not contain phosphatidylethanolamine (not shown).

DISCUSSION

pH-dependent Cyt c-induced Fusion of PCPECL Vesicles—The increased turbidity observed upon the addition of cyt *c* to PCPECL vesicles in acidic pH suggests the formation of micron-sized aggregates consisting of small unilamellar vesicles and cyt *c* (Fig. 1 and TABLE ONE). The use of a fluorescent phospholipid probe allowed us to determine the nature of these aggregates. In a mixture of unlabeled and PyPC-labeled PCPECL vesicles, the occurrence of cyt *c*-induced vesicle

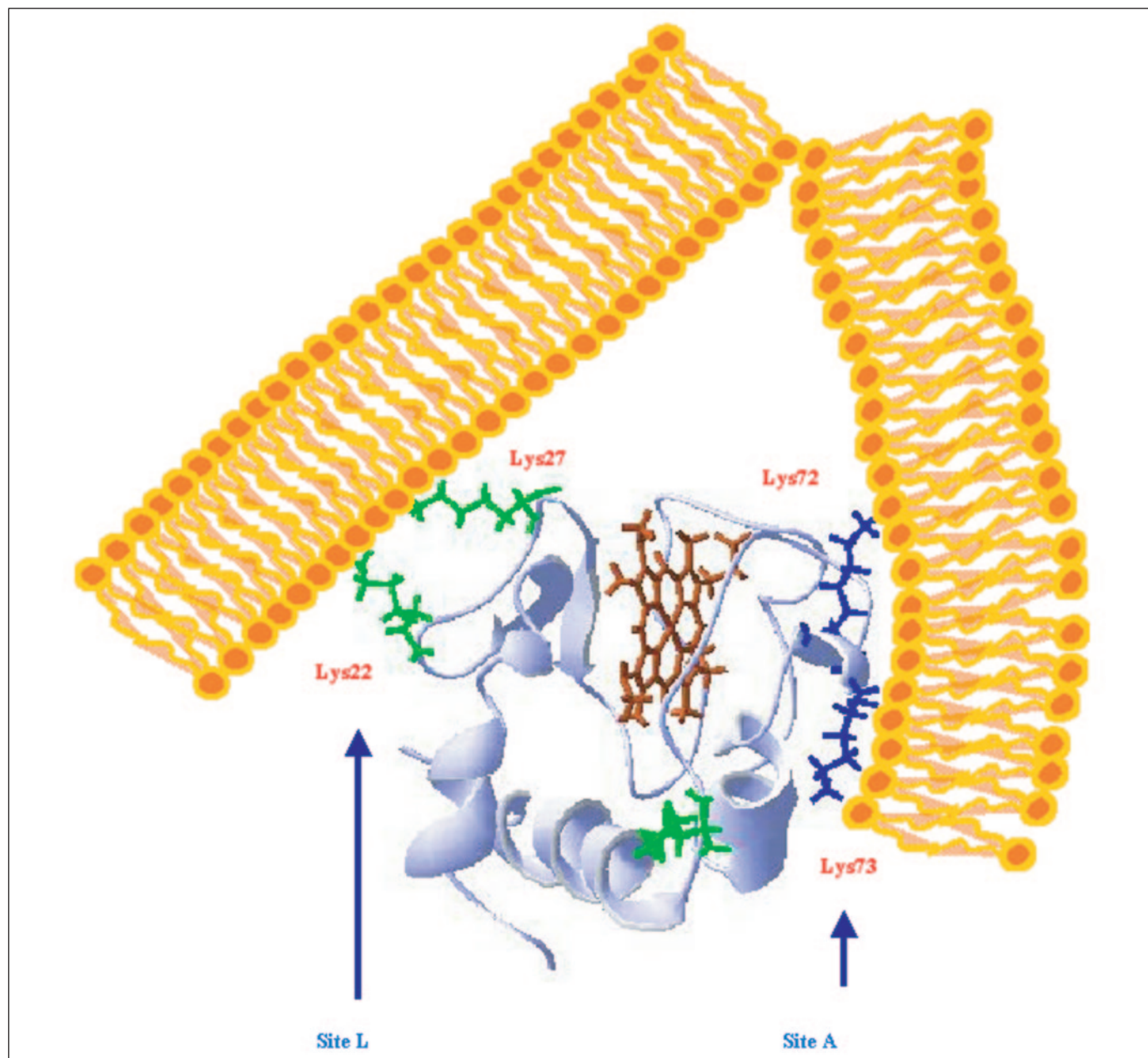


FIGURE 8. Solution structure of oxidized horse heart cytochrome *c* showing Lys-22, Lys-27, His-33 (site L), and Lys-86, Lys-72, and Lys-73 (site A) interacting with lipid bilayers of two vesicles. The figure is out of scale. The structure (gene identification number 2554674; Protein Data Bank code 1AKK) was obtained from the National Center for Biotechnology Information site (www.ncbi.nlm.nih.gov) and Ref. 32.

fusion was indicated by a concomitant decrease in the E/M ratio due to redistribution (*i.e.* dilution) of the fluorescent probe over the available lipid phase. This behavior is depicted in the Fig. 3 *inset*, which shows the E/M ratio decreasing rapidly from 0.25 to 0.13 after the addition of cyt *c*, corresponding to an effective dilution of the probe by a factor of 2. The possibility that the E/M ratio changes in PyPC might result from a spontaneous phospholipid transfer between small unilamellar vesicles was discarded because the time scale of spontaneous label exchange in non-aggregated, small unilamellar vesicles is slower (in the order of hours) than in the presence of cyt *c* (33, 34).

The Effect of pH on Cyt c-mediated PCPECL and PCPEPG Vesicles Pointed to the Existence of Two Sites in the Protein Structure Interacting Electrostatically with Acidic Phospholipids—The ability of cyt *c* to induce vesicle fusion suggests the existence of at least two sites in the

protein structure prone to interact with negatively charged lipid head groups. At pH 7.4, in association with negatively charged bilayers, one cyt *c* positively charged amino acid neutralized the lipid charge, thus favoring the merging of the acyl chain and promoting the hydrophobic interaction. These hydrophobic and electrostatic interactions changed the protein structure and heme iron spin states. This type of cyt *c*/bilayer association can occur with CL in pure vesicles or in PCPECL vesicles and with other negatively charged lipids such as dihexadecylphosphate, phosphatidylglycerol, and phosphatidylserine vesicles (21), because most positively charged amino acids are arrayed in clusters on one face of the protein (35). This idea was reinforced by the observed modulation of cyt *c* spin states by the lipid acyl chain at a pH of 7.4 (21). At pH 6.2, the protonation of the residues located at site L, which should display low pK_a values (~ 7.0) due to the proximity of their ionizable

groups to other positively charged amino acid side chains, could create a new positively charged site prone to interact with another negatively charged vesicle. If the H_{ii} phase is present because of the presence of phosphatidylethanolamine, contact between the two vesicles promoted by the attachment of cyt *c* favors vesicle fusion. This explains the absence of cyt *c*-mediated fusion in CL vesicles in the pH range investigated (6.2–7.4, not shown) and in PCPECL vesicles at pH 7.4.

According to the ζ potential measurements under our experimental conditions, the total surface area of the PCPECL vesicles was not covered with cyt *c*, and fusion was not mediated by pH-induced alterations in the charge of the vesicles in the pH range of 7.4–6.2 (TABLE ONE). Therefore, the pK_a observed in the cyt *c*-mediated fusion of PCPECL and PCPEPG vesicles could not have resulted from the ionization of a lipid group. The results of the ζ potential are in accordance with the fact that the fusion process mediated by cyt *c* is dependent on the cyt *c*/lipid ratio (not shown). For cyt *c*-promoted PCPECL vesicle fusion to be efficient, a reasonable number of the vesicles must contain cyt *c* on their surface, but the vesicle surface must not be completely covered by cyt *c*, which could impair contact with another vesicle. In vesicle fusion mediated by lysine *N*-acetylated cyt *c* (Fig. 5), the process was not pH-dependent, because it was promoted by the insertion of the heme protein hydrophobic domains into the lipid bilayers.

The pH-Dependent Site for Cyt c Interaction with PCPECL Vesicles Encompasses a Region in Which Lys-22, Lys-25, Lys-27, His-26, and His-33 Are Located—The effect of pH on the association of cyt *c* with acidic phospholipids is described in the literature (22, 23). Two sites for cyt *c* association with lipid bilayers have been identified, namely site A, which interacts electrostatically with a deprotonated head group of acidic phospholipids, and site C, which interacts with a protonated head group of acidic phospholipids via hydrogen bonds. When attached to acidic phospholipids via site C, cyt *c* cannot be displaced by high ionic strength. The association of cyt *c* with a protonated acidic phospholipid via site C is favored by acid pH. However, over a range of 8–29 mol % CL in PCCL liposomes, pK_a values for CL ranged from 4.0 up to 5.5, and similar results were obtained for PCPG liposomes (23). Under our experimental conditions, with maximum 20 mol % CL content, CL pK_a could not have been above 5.0. Because the effect of the pH on cyt *c*-mediated PCPECL and PCPEPG vesicles could not be attributed to ionization of the phospholipids, a pK_a of the process of ~ 7.0 should be assigned to amino acid residues of the protein. In a structured protein, the pK_a of the ionizable amino acid side chains often differ from those found in the amino acid-free form because the microenvironment provided by the folding alters these values. Although a pK_a of ~ 7.0 could be assigned to histidine residues, lysine ϵ -amino groups could not be discarded. The impairment of the carbethoxylated cyt-*c*-mediated vesicle fusion (Fig. 6, *open bars*) under conditions in which the capacity to bind in PCPECL vesicles were retained (Fig. 6, *closed triangle*) suggests that the site located on the opposite side of site A, *i.e.* Lys-72 and Lys-73, was blocked. This assumption is reinforced by the data presented in Fig. 5. The proximity between the pK_a value exhibited by the cyt *c*-mediated fusion process and that resulting from the effect of the pH in which cyt *c* was treated on the impairment of the vesicle fusion confirmed that the ionizable groups responsible for this process were chemically modified by DEPC. In this regard, the small but significant difference in pK_a values obtained in the presence of PCPECL and PCPEPG vesicles (Fig. 2) suggests that the pK_a of the ionizable groups involved in the pH-dependent interaction with acidic phospholipids should be affected by the interfacial microenvironment. It is important to note that the pK_a values determined in the presence of PCPECL and PCPEPG vesicles must be considered apparent pK_a values that were calculated with the pH values

of the bulk solution. However, at the vesicle interfaces where acidic phospholipids are present (36) the pH could be somewhat lower.

At pH 7.4, treatment of cyt *c* with DEPC impaired vesicle fusion only under conditions in which the samples were generated with the majority of the protein molecules containing at least three modifications (DEPC/cyt *c* ratio ≥ 3). This happened because, at pH 7.4, different amino acid residues are deprotonated and are prone to be modified by DEPC. The samples of cyt *c* obtained by treatment with a 3-fold molar excess of DEPC at pH 7.4 exhibited five modified populations, and most protein molecules contained three modifications. This predominant population was not homogeneous but was formed by a combination of three different carbethoxylated amino acids. The lower the pK_a of an amino acid, the higher its contribution to the number of modified cyt *c* is expected to be. In this regard, at pH 7.4 cyt *c* samples with a relatively high number of carbethoxylated amino acids were needed to attain the minimal amounts of modified forms that were able to impair the fusion, *i.e.* with chemical modification in amino acids of site L. When the treatment was done at pH 5.25, probably only Lys-27 and/or His-26 and His-33 were deprotonated in a significant amount and prone to be modified by DEPC. In this case, considering that $\sim 40\%$ of the sample contained only one modified amino acid and that the fusion was inhibited $\sim 85\%$, we concluded that blocking one residue in site L is enough to inhibit the fusion process. This result unequivocally corroborated site L as the region involved in the pH-dependent membrane fusion. Considering that chemical modification of amino acids was chosen as the technique to identify site L, even one modification at this site independent of the modified amino acid residue should be enough to prevent the interaction with PCPECL, because a steric hindrance is generated. Site-directed mutagenesis techniques, with restrictions, could also provide information about the individual role of the amino acids in site L. In this case, without the presence of steric hindrance, the change of one amino acid residue in site L is expected to be effective only if this change significantly alters the pK_a of unchanged residues at this site.

Carbethoxylated Lys-72 and Lys-73 residues (site A) were not detected in modified cyt *c* samples that retained their ability to attach to PCPECL, indicating that site A remained unchanged in these samples. The modification of Lys-87 close to site A was insufficient to prevent the cyt *c* attachment to PCPECL vesicles (Fig. 6, *closed triangles*), suggesting that this amino acid residue is not important for cyt *c*/PCPECL vesicle interaction via site A. In addition, Lys-22, Lys-27, and Lys-87, the new carbethoxylation points identified in cyt *c* samples treated at pH 7.4 with DEPC/cyt *c* ratios above 3 (Fig. 6, *panel A*), suggest a ranking of amino acid reactivity with DEPC according to their pK_a and accessibility in the native cyt *c* structure. Therefore, in cyt *c* samples treated with a 3-fold molar excess of DEPC, the most abundant population of modified molecules probably exhibits carbethoxylation in Lys-22, Lys-27, and Lys-87. The population with four chemical modifications probably contains His-33 as the predominant fourth carbethoxylated amino acid. It is interesting to notice that carbethoxylation of His-33 was favored when cyt *c* was treated by DEPC at pH 5.25 (Table II in the supplemental material). At pH 5.25 the amount of deprotonated lysine residues should be very low and, except for Lys-27, no other lysine residue could efficiently compete with His-33 for the carbethoxylation. The absence of chemical modifications detected in the His-26 residue when cyt *c* was treated with DEPC at pH 7.4 suggests that this amino acid residue situated close to Lys-22 and Lys-27 is less accessible to the carbethoxylation promoted by the reaction with DEPC. The population with five chemical modifications could exhibit modifications in one of the following amino acid residues: Lys-39, Lys-53, Lys-60, and Lys-72. Carbethoxylation of Lys-72 was present in a significant amount of cyt *c* molecules

Interaction of Cytochrome *c* with Membranes

only in samples treated with DEPC/cyt *c* ratios ≥ 6 , conditions in which cyt *c* loses its capacity to bind in PCPECL vesicles (Fig. 6B).

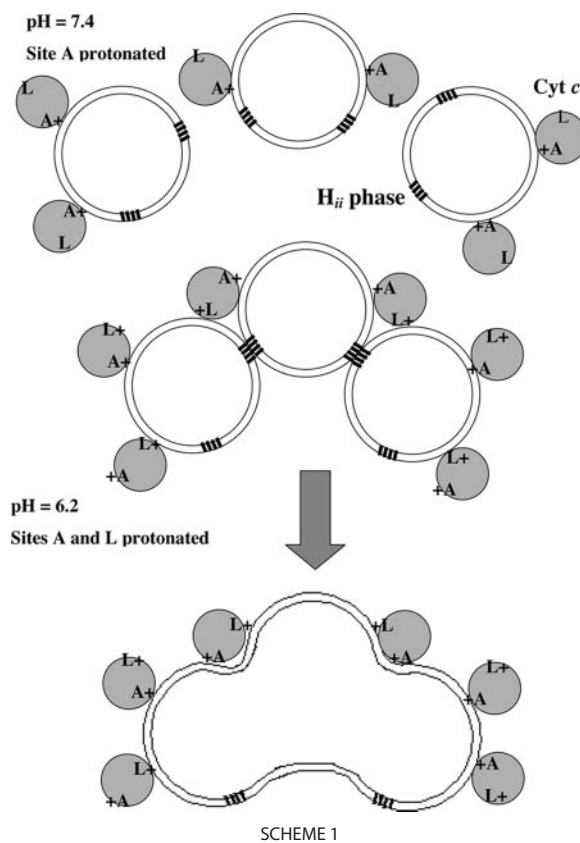
*The Role of pH on Protein-mediated Fusion of PCPECL Vesicles Is Specific for Cyt *c**—The failure of *N*-acetylated cyt *c* to promote pH-dependent PCPECL vesicle fusion indicated the importance of the electrostatic interaction of a positively charged protein with a negatively charged lipid, in this case CL. However, if the electrostatic interaction was the only prerequisite for inducing PCPECL vesicle fusion, any polycation could display the same effect, and the process would not be favored by changes in such a narrow range of pH. Interestingly, within the range of the mitochondrial trans-membrane potential the effect of pH on protein-induced PCPECL vesicle fusion was specific for cyt *c*, and a comparison of the structure of the tested proteins provided an explanation for this phenomenon. The surfaces of the cyt *c* molecules of all the species studied thus far display clusters of lysine side chains around the heme crevice on one face of the protein (36). This alkaline site, composed of Lys-72 and Lys-73 (site A), was available to interact with negatively charged vesicles in a pH range of 7.4–6.2, but Lys-22, Lys-25, Lys-27, His-33, and His-26 (site L) became available to interact with negatively charged interfaces only at lower pH values. This array of positive charges on the surface of cyt *c* differentiates it from protamine, the positive charges of which are distributed homogeneously on its surface, and from albumin, an acidic protein negatively charged in the pH range investigated here. Therefore, protamine could attach simultaneously to two PCPECL vesicles via electrostatic interaction with CL over the investigated pH range, whereas albumin would be repelled. Presumably, at higher pH values cyt *c* can interact with PCPECL vesicles only on one face (site A), thus failing to approximate vesicles and favor the fusion, because site L would not be protonated. In this condition, the interaction of cyt *c* with CL or phosphatidylglycerol allows for the lipid-extended interaction at this contact face (21). When the pH of the medium was below the pK_a of amino acids in site L, the interaction of cyt *c* with a second PCPECL vesicle possibly allowed for the occurrence of vesicle contact and subsequent fusion, which was favored when H_{ii} phase was present. Over the pH range of 5.0–3.0, the fusion observed in cyt *c* added to PCPECL and PCPEPG vesicles (Fig. 2) might involve simultaneous interaction of cyt *c* with site L and site C (22, 23).

As proposed previously (16), the extended conformation of phosphatidylethanolamine molecules during fusion could also be favored by the contact site between two vesicles in close proximity, leading to the extension of the acyl chains of a phospholipid molecule in opposite directions, *i.e.* embedded into the two opposing bilayers while maintaining the head group at the interface.

Thus, only cyt *c* possesses the structure and the distribution of charged residues needed to induce PCPECL vesicle fusion regulated by ionization of the site L amino acids and, considering the high degree of conservation of the three-dimensional structure of cyt *c*, this phenomenon is possibly correlated with biological events in the mitochondria. Scheme 1 illustrates the proposed model.

Possible Biological Implications—The clusters of positively charged amino acid side chains (site A) on the external surface of the inner mitochondrial membrane are important for the recognition and binding of negatively charged cyt *c* reductase and oxidase (13, 25), and site L possibly plays a role in keeping cyt *c* attached to the bilayer.

The higher pH in the intermembrane space resulting from the loss of the trans-membrane potential may lead to deprotonation of site L. This may be one of the events in the mitochondrial intermembrane space that favors the detachment of cyt *c* and apoptosis. We are currently



SCHEME 1

testing carboxylated cyt *c* with cyt *c*-depleted mitoplasts,² and the results have pointed to the validity of this proposal.

Conclusions—This paper demonstrated that, at low pH values similar to those of respiring mitochondria, protonated site A (Lys-72 and Lys-73) and site L (Lys-22, Lys-25, His-26, Lys-27, and His-33) of the cyt *c* structure favored a simultaneous electrostatic interaction of cyt *c* with CL phosphate-deprotonated moieties of two PCPECL vesicles. In this mechanism, one cyt *c* molecule brings two vesicles together that fuse in the presence of H_{ii} at the contact surface. These results lead to the postulation of a novel site for the interaction of cyt *c* with the inner mitochondrial membrane, an attachment possibly modulated by the mitochondrial trans-membrane potential.

Acknowledgments—We thank Dr. Alicia J. Kowaltowski and Prof. Paavo K. J. Kinnunen for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Kluck, R. M., Bossy-Wetzell, E., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (1997) *Science* **275**, 1132–1136
2. Yang, J., Liu, X. S., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T., Jones, D. P., and Wang, X. (1997) *Science* **275**, 1129–1132
3. Crompton, M. (1999) *Biochem. J.* **341**, 233–249
4. Lenaz, G. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1366**, 53–67
5. De Giorgi, F., Lartigue, L., Bauer, M. K., Schubert, A., Grimm, S., Hanson, G. T., Remington, S. J., Youle, R. J., and Ichas, F. (2002) *FASEB J.* **16**, 607–609
6. Matroule, J. Y., Carthy, C. M., Granville, D. J., Jolios, O., Hunt, D. W., and Piette, J. (2001) *Oncogene* **20**, 4070–4084
7. Sugawara, T., Lewen, A., Gasche, Y., Yu, F., and Chan, P. H. (2002) *FASEB J.* **16**, 1997–1999
8. Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F., and Vercesi, A. E. (2001) *FEBS Lett.* **495**, 12–15
9. Kowaltowski, A. J., Vercesi, A. E., and Fiskum, G. (2000) *Cell Death Differ.* **7**, 903–910

² C. Kawai, T. Rodrigues, F. S. Pessoto, V. A. Milicchio, P. Di Mascio, A. M. Carmona-Ribeiro, and I. L. Nantes, manuscript in preparation.

10. Kowaltowski, A. J., and Vercesi, A. E. (1999) *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 463–471
11. Barros, M. H., Netto, L. E., and Kowaltowski, A. J. (2003) *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 179–188
12. Kowaltowski, A. J., Turin, J., Indig, G. L., and Vercesi, A. E. (1999) *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 581–590
13. Nicholls, P. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **346**, 261–310
14. Dickerson, R. E., and Timkovich, R. (1979) in *The Porphyrins* (Dolphin, D., ed) pp. 397–547, Academic Press, New York
15. Wuthrich, K., Aviram, I., and Schejter, A. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* **253**, 98–103
16. Kinnunen, P. K. (1992) *Chem. Phys. Lipids* **63**, 251–258
17. Pinheiro, T. J. T. (1994) *Biochimie (Paris)* **76**, 489–500
18. Nantes, I. L., Zucchi, M. R., Nascimento, O. R., and Faljoni-Alario, A. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 153–158
19. Rytömaa, M., and Kinnunen, P. K. J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 3197–3202
20. Tuominen, E. K., Wallace, C. J., and Kinnunen, P. K. J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 8822–8826
21. Zucchi, M. R., Nascimento, O. R., Faljoni-Alario, A., Prieto, T., and Nantes, I. L. (2002) *Biochem. J.* **370**, 671–6784
22. Rytömaa, M., Mustonen, P., and Kinnunen, P. K. J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 22243–22248
23. Rytömaa, M., and Kinnunen, P. K. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 1770–1774
24. Kostrzewa, A., Pali, T., Froncisz, W., and Marsh, D. (2000) *Biochemistry* **39**, 6066–6074
25. Pelletier, H., and Kraut, J. (1992) *Science* **258**, 1748–1755
26. Lee, S., and Kim, H. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 188–199
27. Grabowski, E. F., and Morrison, I. D. (1983) in *Measurements of Suspended Particles by Quasi-elastic Light Scattering* (Dahneke, B., ed) pp. 199–236, Wiley Interscience, New York
28. Nicholls, D. G., and Ferguson, S. J. (1992) *Bioenergetics 2*, Academic Press, San Diego, CA
29. Ernster, L. (ed.) (1992) *Molecular Mechanisms in Bioenergetics*, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam
30. De Kruijff, B., and Cullins, P. R. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **602**, 477–490
31. Antalík, M., and Sedlak, E. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1434**, 347–355
32. Banci, L., Bertini, I., Gray, H. B., Luchinat, C., Reddig, T., Rosato, A., and Turano, P. (1997) *Biochemistry* **36**, 9867–9877
33. Schenkman, S., Araujo, P. S., Dijkman, R., Quina, F. H., and Chaimovich, H. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **649**, 633–641
34. Carmona-Ribeiro, A. M., Yoshida, L. S., and Chaimovich H. (1985) *J. Phys. Chem.* **89**, 2928–2933
35. Takano, T., and Dickerson, R. E. (1981) *J. Mol. Biol.* **153**, 79
36. Zhao, H., Tuominen, E. K., and Kinnunen, P. K. (2004) *Biochemistry* **43**, 10302–10307

Protective Role of Mitochondrial Unsaturated Lipids on the Preservation of the Apoptotic Ability of Cytochrome *c* Exposed to Singlet Oxygen*

Received for publication, January 2, 2007, and in revised form, June 12, 2007. Published, JBC Papers in Press, June 13, 2007, DOI 10.1074/jbc.M700009200

Tiago Rodrigues[‡], Lucimar P. de França[§], Cintia Kawai^{‡1}, Priscila A. de Faria^{‡2}, Katia C. U. Mugnol^{‡3},
Fernanda M. Braga[‡], Ivarne L. S. Tersariol[‡], Soraya S. Smaili[§], and Iseli L. Nantes^{‡4}

From the [‡]Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica Universidade de Mogi das Cruzes, Prédio I, Sala 15-15, Mogi das Cruzes 08780-911, São Paulo and the [§]Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

Cytochrome *c*-mediated apoptosis in cells submitted to photodynamic therapy raises the question about the ability of photodynamically oxidized cytochrome *c* (cytc405) to trigger apoptosis as well as the effect of membranes on protein photo-oxidation. Cytochrome *c* was submitted to irradiation in the presence of MB⁺ in phosphate buffer and in the presence of four types of phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine/cardiolipin (PCPECL) liposomes (50/30/20%): *totally saturated* lipids (*tsPCPECL*), *totally unsaturated* lipids (*tuPCPECL*), *partially unsaturated* (80%) lipids, with unsaturation in the PC and PE content (*puPCPECL80*), and *partially unsaturated* (20%) lipids, with unsaturation in the CL content (*puPCPECL20*). Cytc405 was formed by irradiation in buffered water and in *tsPCPECL* and *puPCPECL20* liposomes. In the presence of *tuPCPECL* and *puPCPECL80*, cytochrome *c* was protected from photodynamic damage (lipid-protected cytochrome *c*). In CL liposomes, 25% unsaturated lipids were enough to protect cytochrome *c*. The presence of unsaturated lipids, in amounts varying according to the liposome composition, are crucial to protect cytochrome *c*. Interesting findings corroborating the unsaturated lipids as cytochrome *c* protectors were obtained from the analysis of the lipid-oxidized derivatives of the samples. Native cytochrome *c*, lipid-protected cytochrome *c*, and cytc405 were microinjected in aortic smooth muscle cells. Apoptosis, characterized by nucleus blebbing and chromatin condensation, was detected in cells loaded with native and lipid protected cytochrome *c* but not in cells loaded with cytc405. These results suggest that photodynamic therapy-promoted apoptosis is feasible due to the protective effect of the mitochondrial lipids on the cytochrome *c* structure and function.

Singlet oxygen ($O_2 (^1\Delta_g)$)⁵ is an excited state of molecular oxygen that can be generated by an energy transfer mechanism from a triplet excited state of a compound to the ground state of molecular oxygen (1, 2). Singlet oxygen $O_2 (^1\Delta_g)$ can be produced in biological systems, and, due to its high electrophilicity, reactivity and relatively long lifetime (2–4 μ s in H₂O and ~700 μ s in CCl₄) can promote damage in biological molecules (3–5). In mammalian cells, $O_2 (^1\Delta_g)$ can be generated during oxidative stress, and it is able to attack DNA, protein thiol groups, and membrane lipids (6–15).

The pro-oxidant activity of singlet oxygen, triplet excited species, and free radicals has been used in medicine for the treatment of tumors in a process that is known as photodynamic therapy (PDT) (16). PDT involves *in situ* generation of reactive species promoting tumor regression (17). The mechanism of tumoral destruction involves the direct oxidation (type I mechanism) of biological targets (membranes, proteins, and DNA), as well as oxidation mediated by $O_2 (^1\Delta_g)$ (type II mechanism) (18). In the type II mechanism, $O_2 (^1\Delta_g)$ is generated through energy transfer from excited triplet species to molecular oxygen (17).

Proteins are important targets for the pro-oxidant action of $O_2 (^1\Delta_g)$. In the case of heme proteins, this excited species can damage both the apoproteins and the prosthetic group (19–21). Among the potential protein targets for $O_2 (^1\Delta_g)$, cytochrome *c* deserves special consideration, because it is a mitochondrial protein fundamental to the cell respiration and activation of the apoptosis cascade (22, 23). Therefore, $O_2 (^1\Delta_g)$ -mediated alterations in cytochrome *c* structure and reactivity can influence activation of caspases in the apoptosome.

Previously we compared the effect of photogenerated singlet oxygen ($O_2 (^1\Delta_g)$) (type II mechanism) and free radicals (type I

* This work was supported in part by the Brazilian research founding agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa da Universidade de Mogi das Cruzes, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ An FAPESP fellow.

² A CNPq fellow.

³ A CAPES fellow.

⁴ To whom correspondence should be addressed: Tel.: 55-11-4798-7103; Fax: 55-11-4798-7102; E-mail: ilnantes@umc.br.

⁵ The abbreviations used are: $O_2 (^1\Delta_g)$, singlet molecular oxygen; CL, cardiolipin; cytc405, singlet oxygen-oxidized cytochrome *c*; LOH, lipid-derived alcohol; LOO[•], lipid-derived hydroxyl radical; LOOH, lipid-derived peroxide; MB⁺, methylene blue; MDA, malonyldialdehyde; PC, phosphatidylcholine; PDT, photodynamic therapy; PE, phosphatidylethanolamine; *puCL25*, -50, and -75, CL liposomes containing 25, 50, and 75% unsaturated lipids, respectively; *puPCPECL20*, PCPECL liposomes containing partially unsaturated (20%) lipids, with unsaturation in the CL content; *puPCPECL80*, PCPECL liposomes containing partially unsaturated (80%) lipids, with unsaturation in the PC and PE content; SMC, smooth muscle cell; *tsCL*, CL liposomes containing totally saturated lipids; *tsPCPECL*, PCPECL liposomes containing totally saturated lipids; *tuCL*, CL liposomes containing totally unsaturated lipids; *tuPCPECL*, PCPECL liposomes containing totally unsaturated lipids.

Protection of Cytochrome *c* by Unsaturated Lipids

mechanism) on cytochrome *c* structure and reactivity. Both reactive species were obtained by photoexcitation of methylene blue (MB^+) in the monomer and dimer forms obtained by varying the micelle/ MB^+ ratio. Over a pH range in which cytochrome *c* is in the native form, O_2 ($^1\Delta_g$) and free radicals induced the conversion of heme iron from its native low spin state to a high spin state with axial symmetry ($g \sim 6.0$) and with the Soret band shifted from 409 to 405 nm (cytc405). The direct attack on the heme group was only detected under conditions that favored free radical production (MB^+ dimer in SDS micelles) or in the presence of a less structured form of the protein (above pH 9.3). cytc405 exhibited no alterations in the mass of heme group but showed oxidative modifications in methionine (Met-65 and Met-80) and tyrosine (Tyr-74) residues. Damage of cytc405 tyrosine residue impaired its reduction by diphenylacetaldehyde, but not by β -mercaptoethanol, which was able to reduce cytc405, generating cytochrome *c* Fe(II) in the high spin state (spin 2) (24). Considering that PDT can induce cytochrome *c* detachment from the inner mitochondrial membrane leading to apoptosis, it remained to be ascertained whether the oxidative stress produced by photodynamic therapy also affects cytochrome *c* ability to trigger apoptosis. In this regard, the well known ability of polyunsaturated fatty acids to trap O_2 ($^1\Delta_g$) (25), points out the lipid fraction of the inner mitochondrial membrane, with which cytochrome *c* is peripherally associated, as a potential protector against the photodynamic protein oxidation. In this case, the attack to the inner mitochondrial membrane and membrane-bound proteins can promote lack of the transmembrane potential ($\Delta\Psi$), detachment of cytochrome *c* from the membrane and triggering of apoptosis in the cytosol (26, 27). In this regard, in a model system, liposomes containing polyunsaturated lipids were able to protect cytochrome *c* from the attack by free radicals produced in the course of the reaction of the protein with *t*-butylhydroperoxide (28). In this study, we investigated the ability of mitochondrial lipids to protect cytochrome *c* against photodynamic oxidation and the loss of the ability to trigger apoptosis.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals—Cytochrome *c* (horse heart, type III) was acquired from Sigma. Lipids were acquired from Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL). MB^+ was purchased from Aldrich and twice recrystallized using ethanol.

Generation of O_2 ($^1\Delta_g$) by Photosensitization of MB^+ —Samples were irradiated at 35 °C in a glass chamber, in 5 mM phosphate-buffered water or in 5 mM phosphate-buffered liposomes (PCPECL or CL). A 500-watt halogen light bulb, set at a distance of 30 cm, was used with a cutoff glass filter (500 nm \pm 50 nm; wavelength mean value \pm half bandwidth, Melles Griot, CA). The glass chamber was cooled by circulating water. Other additions are indicated in the figure legends.

Purification of Cytochrome *c* Modified by Reactive Species—The samples containing cytochrome *c* with Soret band peaking at 405 nm (cytc405) obtained in buffered water were purified with Chelex 100[®], which has a binding affinity for MB^+ . Purification of MB^+ with Chelex 100[®] particles was monitored by spectrophotometry, indicating the disappearance of the MB^+ absorbance spectrum. The samples containing cytochrome *c*

submitted to MB^+ photodynamic action associated with PCPECL liposomes were purified in a fast-protein liquid chromatography system (Amersham Biosciences) equipped with two P-500 pumps, a Superdex HR200 column, and a UV-visible detector. The flow rate was 0.5 ml/min, and the buffer consisted of 0.3 M sodium phosphate, pH 7.5. The high ionic strength buffer was used to promote dissociation of cytochrome *c* from the liposomes. The liposomes were eluted in the void volume, cytochrome *c* was included in the resin, and MB^+ was eluted in the total volume of the beds. The elution of liposomes, cytochrome *c*, and MB^+ was monitored by turbidity at 280 nm, absorbance at 409 nm (Soret band peak), and absorbance at 660 nm, respectively. The fractions that contained cytochrome *c* were pooled and dialyzed exhaustively against deionized water. After dialysis the sample was lyophilized.

Electronic Absorption Spectrometry—Electronic absorption measurements of cytochrome *c* were conducted in a photodiode spectrophotometer (Shimadzu Scientific Instruments Inc., Columbia, MD), using quartz cuvettes of 1-cm light path and a slit of 0.5 nm.

Preparation and Analysis of Liposomes—Lipids were first dissolved in chloroform, which was evaporated with N_2 gas. The lipid residue was kept under reduced pressure for at least 2 h, after which it was hydrated by adding cold 5 mM phosphate buffer. After the addition of buffer, the mixture was then stirred with a vortex, and sonication was performed in a Ney Ultrasonik sonicator (J. M. Ney Co., Bloomfield, CT) during 30 min. The mean diameter of sonicated unilamellar liposomes was previously determined (27) as being 61.1 ± 0.3 nm by dynamic light scattering using a ZetaPlus-ZetaPotential analyzer (Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY). When indicated, unilamellar liposomes were also obtained by extrusion of hydrated lipid dispersions in an Avanti Mini-extruder acquired from Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL). Samples were subjected to 11 passes through two polycarbonate filters (100 nm pore size, Nucleopore, Pleasanton, CA) installed in tandem. The mean diameter of both sonicated and extruded liposomes was in agreement with images obtained by atomic force microscopy in an SPM 9600 scanning probe microscope (Shimadzu Corp.). Atomic force microscopy images (Fig. 1, A and B) were obtained by measurement of the interaction forces between the tip and the sample surface (29, 30) containing liposomes. The samples were analyzed in the contact mode at room temperature (20 °C) and atmospheric pressure (760 mmHg). A triangular silicon tip was used for this analysis, and the resonant frequencies of the cantilever were found to be ~ 200 kHz. Cardiolipin liposome films were obtained by immobilization on silicon-based support. Immediately before the analysis, the samples of fresh liposomes were diluted to 1 mM in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, and a droplet of constant volume (10 μl) was deposited onto a small plate of silicon (~ 0.5 cm²) previously submitted to stringent cleaning (31). 2 min after deposition on the silicon plate, the sample excess was removed by using filter paper, and the drying was completed at 4 °C.

Lipid Oxidation Assays—Oxidative damage of liposomes was measured by dosage of the lipid hydroperoxide and malonyldialdehyde content. Lipid hydroperoxide (LOOH) measurement was done by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol

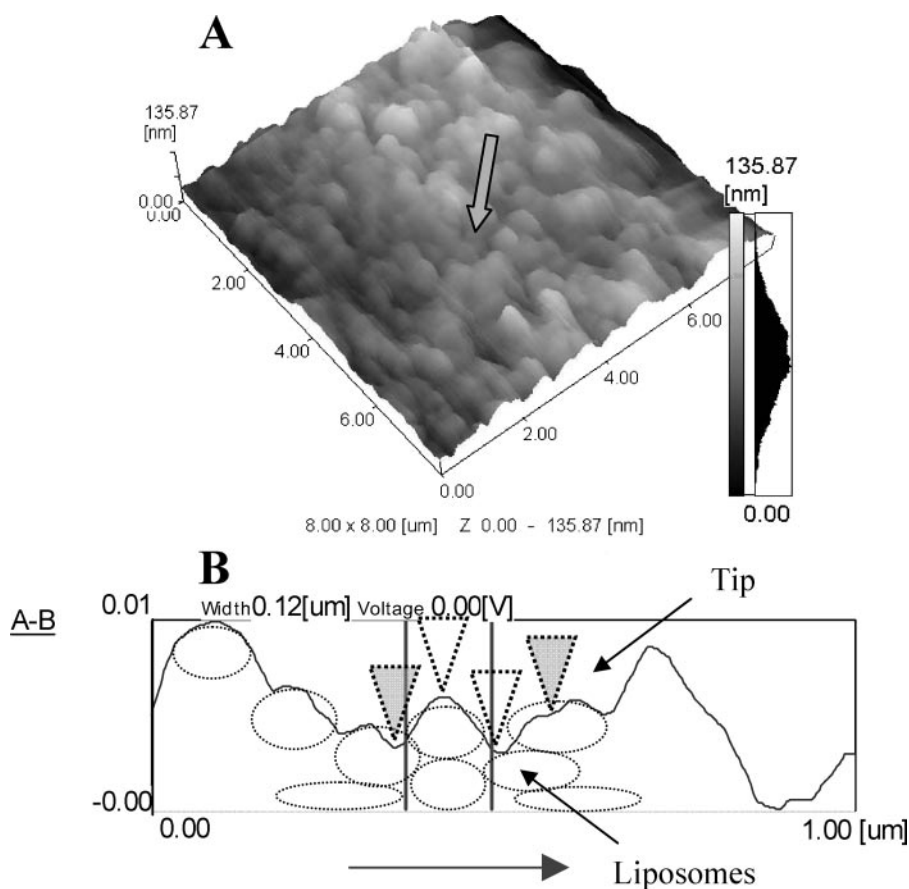


FIGURE 1. Atomic force microscopy image of CL liposomes. *A*, three-dimensional topographic atomic force microscopy image of 100 nm-diameter *ts*CL liposomes deposited on a silicon plate. Aggregates and single liposomes are discernible. *B*, height profile of marked liposomes indicated by the arrow. The height profile is compatible with layers of collapsed and distorted 100 nm-diameter liposomes schematized as *dashed deformed balls*. Possible distortions of the liposome surface due to the tip trajectory and indentation (*gray tips*) are also represented in the figure. The two vertical lines near the center delimitate 120- μ m thickness. Cardiolipin liposome films were obtained by immobilization on silicon-based support on which 10 μ l of fresh liposomes was deposited onto the small plate of silicon (~ 0.5 cm²) and dried at 4 °C. Atomic force microscopy images were obtained by measurement of the interaction forces of the tip with the sample surface and the liposomes, in the contact mode, at room temperature (20 °C) and at atmospheric pressure (760 mmHg). Triangular silicon tips were used for this analysis, and the resonant frequencies of the cantilever were found to be ~ 200 kHz.

orange. Sonicated unilamellar liposomes (1 mM) were incubated in the presence or in the absence of 4 μ M cytochrome *c* and/or 8 μ M MB⁺ during 30 min, at 4 °C. An aliquot of the sample (50 μ l) was mixed, and the mixture was incubated during 30 min at room temperature (25 °C) with 950 μ l of hydroperoxide reagent, containing 100 μ M xylenol orange, 250 μ M (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, 25 mM H₂SO₄ and 4 mM butylated hydroxytoluene in 90% methanol. The oxidation of Fe²⁺ by LOOH generates Fe³⁺ that reacts with xylenol orange forming the colored compound that absorbs at 560 nm. LOOH concentration was calculated from $\epsilon_{560 \text{ nm}} = 4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. For the determination of MDA content present in liposomes, samples of lipids (1 mM) were incubated in the presence or absence of 4 μ M cytochrome *c* and/or 8 μ M MB⁺ during 30 min, at 4 °C (final volume, 150 μ l). To determine malonyldialdehyde (MDA), 150 μ l of 1% thiobarbituric acid prepared in 50 mM NaOH plus 15 μ l of 10 M NaOH and 75 μ l of 20% H₃PO₄ was added to the sample, followed by further incubation during 20 min at 85 °C. The MDA-thiobarbituric acid complex was extracted with 300 μ l of *n*-butanol, and the absorbance was

measured at 532 nm. MDA concentration was calculated from $\epsilon_{532 \text{ nm}} = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Cell Culture and Apoptosis Assay—Rabbit aortic smooth muscle cells (SMCs) were grown in RPMI 1640 containing 10% fetal bovine serum, 200 μ g/ml G418, and 100 μ g/ml hygromycin. Cells were plated on glass cell locate coverslips (Eppendorf) at a density of 40,000/well in 24-well plates for 17–20 h prior to microinjection. Following microinjection, flat cells (normal) and round/shrunk cells with condensed nuclei (apoptotic) were counted and are presented as percent apoptotic cells. In microinjection experiments, 50 cells were counted for each condition.

Microinjection—Cell microinjection was performed on the stage of a Nikon Diaphot 300 inverted microscope using an Eppendorf pressure injector (model 5246) and micro-manipulator (model 5171). Microinjection needles (~ 0.1 - μ m inner diameter) were pulled from glass capillaries using a horizontal electrode puller (Sutter Instrument, model P-97) and loaded using Eppendorf microloaders. Cells were plated on glass cell locate coverslips (Eppendorf) 24 h prior to injection. To identify injected cells, the solution for microinjection contained 0.3% dextran-conjugated Texas Red dye (M_r 10,000,

lysine-fixable, Molecular Probes) in H₂O. Dye alone or dye plus cytochrome *c* (Sigma, C7752 from horse heart, diluted in H₂O and freshly prepared for each experiment) was injected into the cytoplasm of cells (pressure, 80–100 hPa; time, 0.3 s). Cells were switched into fresh medium immediately after injection. The intracellular concentrations of microinjected proteins are estimated to represent a 10- to 100-fold dilution of the pipette concentration based on previous calibrations using similar microinjection apparatus and an estimated cellular volume of 4–5 pl (32). Thus, we estimate that the amount of cytochrome *c* injected is proportional to the pipette concentration and that 40–400 fg are delivered when the pipette concentration is 1 mg/ml. Accordingly, with a pipette concentration of 30 mg/ml (our maximal concentration) we estimate that 1.2–12 pg per cell are delivered. At various times, injected cells were scored for apoptosis as described above. After scoring for apoptosis, Hoechst dye 33342 (Sigma) was added to the medium to a final concentration of 4 μ g/ml. Cells were incubated at 37 °C for 120 min and photographed under UV light.

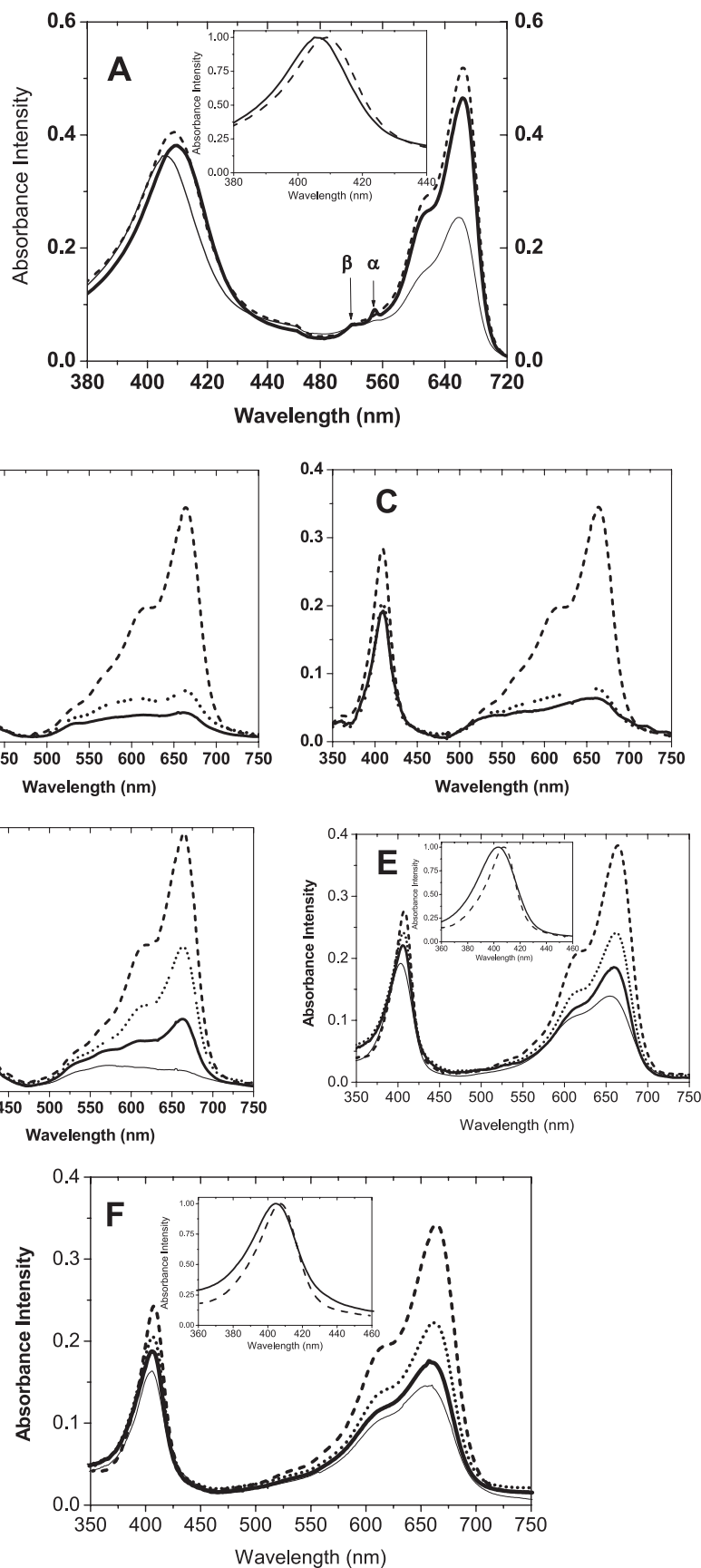
Protection of Cytochrome *c* by Unsaturated Lipids

Caspase-3 Fluorometric Assay—SMCs were collected, counted, and centrifuged at $250 \times g$ for 10 min. The supernatant was gently removed and discarded, and the cell pellet was lysed by the addition of Cell Lysis Buffer (R&D Systems) according to the number of cells present in the pellet ($25 \mu\text{l}$ of cold Cell Lysis Buffer per 1×10^6 cells). This number can be estimated from the number of initially cultured cells. The cells were incubated for 10 min, and the amount of protein was determined by BCA protein assay. For the reaction, $100 \mu\text{l}$ of cell lysate was mixed with an equal volume of $2 \times$ Reaction Buffer (R&D Systems) and 3 ml of fresh dithiothreitol stock solution. To each reaction well $25 \mu\text{M}$ native cytochrome *c*, lipid-protected cytochrome *c*, or cyt c 405 was added prior to the addition of 10 ml of Caspase-3 fluorogenic substrate (DEVD-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin). The plate was incubated for 2 h, and the fluorescence was read (excitation at 400 nm and reading at 505 nm).

Statistical Analysis—The statistical analysis for Figs. 4A, 4B, 4C, 6, and 7 data were done by using analysis of variance calculating software (GraphPad). The post-hoc tests (Bonferroni correction) were done by using QuickCalcs (GraphPad).

RESULTS

Effect of the Membrane Composition on O_2 ($^1\Delta_g$)-induced Oxidative Modifications on Cytochrome *c*—Horse heart cytochrome *c* ($4 \mu\text{M}$) was submitted to irradiation in the presence of $10 \mu\text{M}$ MB⁺ in phosphate-buffered water and in the presence of four types of 2 mM PC/PE/CL liposomes (50/30/20%). The liposome composition differed according to the saturation degree of the lipid acyl chains: *totally saturated* lipids (*ts*PCPECL), *totally unsaturated* lipids (*tu*PCPECL), *partially unsaturated* (80%) lipids, with unsaturation in the PC and PE content (*pu*PCPECL80), and *partially unsaturated* (20%) lipids, with unsaturation in the CL content



(*pu*PCPECL20). Fig. 2A shows the alterations in the cytochrome *c* spectra promoted by O₂ (¹Δ_g), in phosphate buffer at pH 7.4. Singlet oxygen was generated by the irradiation of MB⁺ with a 500-watt halogen lamp. As previously described, upon irradiation, two phenomena occurred concomitantly: the reduction of cytochrome *c* by excited MB⁺ and irreversible conversion of cytochrome *c* Fe(II) to Fe(III) mediated by O₂ (¹Δ_g) associated with blue shift of the Soret band compatible with the formation of cyt_c405 (24). A percentage of reduced cytochrome *c* can be identified in the spectrum obtained after 10 min of irradiation that exhibited Q bands β and α (indicated in the figure) overlapped by the MB⁺ spectrum. Fig. 2B shows the spectra of cytochrome *c* associated with *tu*PCPECL and obtained at 0, 5, and 10 min after the irradiation in the same conditions. The presence of *tu*PCPECL promoted significant differences in cytochrome *c* and MB⁺ behavior during the irradiation. In this condition, the cytochrome *c* Soret band did not exhibit progressive blue shift but only bleaching. On the other hand, the presence of unsaturated lipids drastically increased MB⁺ bleaching percentage exhibited after 10 min under irradiation (87%) as compared with aqueous buffered medium (10%). Fig. 2C shows the spectra of cytochrome *c* and MB⁺ obtained before and after 5- and 10-min exposure to the halogen lamp. In this condition, after 5 min of irradiation, 300 mM NaCl was added to the medium to promote cytochrome *c* dissociation from the liposome surface. The irradiation of the system after increase of ionic strength did not promote significant cytochrome *c* bleaching when compared with Fig. 2B. This result suggests that cytochrome *c* bleaching was promoted by free radicals generated in the membrane. The addition of 300 mM NaCl led to a progressive increase in turbidity of the sample, and thus, it was not possible to get UV-visible spectra at 50 min. Because of high turbidity of the sample containing NaCl, the spectra obtained at 50 min were omitted from Fig. 2 (B and C). Fig. 2D shows the alterations in the cytochrome *c* and MB⁺ spectra during the irradiation with visible light in the presence of *pu*PCPECL80. For cytochrome *c*, the result obtained in this condition was quite similar to that obtained in the presence of *tu*PCPECL, an expected result due to the high content of unsaturated lipids present in *pu*PCPECL80.

Considering that in this model of membrane the CL content consists exclusively of the saturated form of the lipid, this result suggests that the electrostatic and principally lipid-extended interaction of CL with cytochrome *c* did not affect the impairment of cytochrome *c* blue shift observed in the presence of *tu*PCPECL. However, in the presence of saturated CL, a decrease in the degree of MB⁺ bleaching (from 87% to 70%) was observed. Fig. 2, E and F, and their insets, show, respectively, the results obtained in the presence of *pu*PCPECL20 and

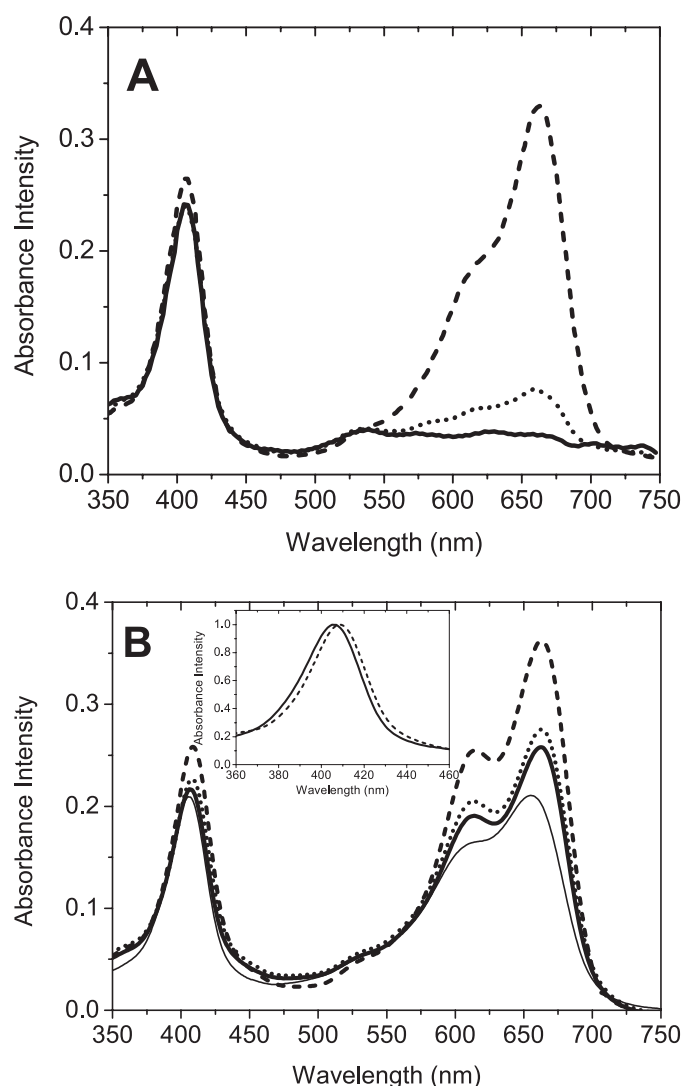


FIGURE 3. Spectra of cytochrome *c* and MB⁺ before and after irradiation in CL liposomes. The cytochrome *c* samples were irradiated, at most, during 50 min with a 500-watt halogen lamp in: A, 2 mM *pu*CL25 liposomes and the spectra were run before (dashed line) and after 5 (dotted line) and 10 min (thick solid line) under irradiation; B, 2 mM *ts*CL and the spectra were run before (dashed line) and after 5 (dotted line), 10 (thick solid line), and 50 min (thin solid line) under irradiation. The inset in B shows normalized Soret band at initial (dashed line) and final (thin solid line) irradiation time. The liposome suspensions were buffered with 5 mM phosphate, pH 7.4.

*ts*PCPECL. In the presence of *pu*PCPECL20 and *ts*PCPECL, photodynamically generated O₂ (¹Δ_g) led to the blue shift of cytochrome *c* Soret band compatible with the formation of cyt_c405. Compared with the results obtained in the presence of membranes with high unsaturated acyl chain content, the degree of MB⁺ bleaching was also decreased in the presence

FIGURE 2. Spectra of cytochrome *c* and MB⁺ before and after irradiation in homogeneous and heterogeneous media. The samples were irradiated, at most, during 50 min with a 500-watt halogen lamp in: A, 5 mM phosphate buffer, pH 7.4, and the spectra were run before (dashed line) and after 10 (thick solid line) and 50 min (thin solid line) under irradiation; B, 2 mM *tu*PCPECL and the spectra were run before (dashed line) and after 5 (dotted line) and 10 min (thick solid line) under irradiation; C, experimental conditions identical to that described in B, except 300 mM NaCl was added to the sample after 5 min under irradiation; D, 2 mM *pu*PCPECL80 and the spectra were run before (dashed line) and after 5 (dotted line), 10 (thick solid line) and 50 min (thin solid line) under irradiation; E, 2 mM *pu*PCPECL20 and the spectra were run before (dashed line) and after 5 (dotted line), 10 (thick solid line) and 50 min (thin solid line) under irradiation; F, 2 mM *ts*PCPECL and the spectra were run before (dashed line) and after 5 (dotted line), 10 (thick solid line), and 50 min (thin solid line) under irradiation. The insets in A, E, and F show normalized Soret band at initial (dashed line) and final (thin solid line) irradiation time. The liposome suspensions were buffered with 5 mM phosphate, pH 7.4.

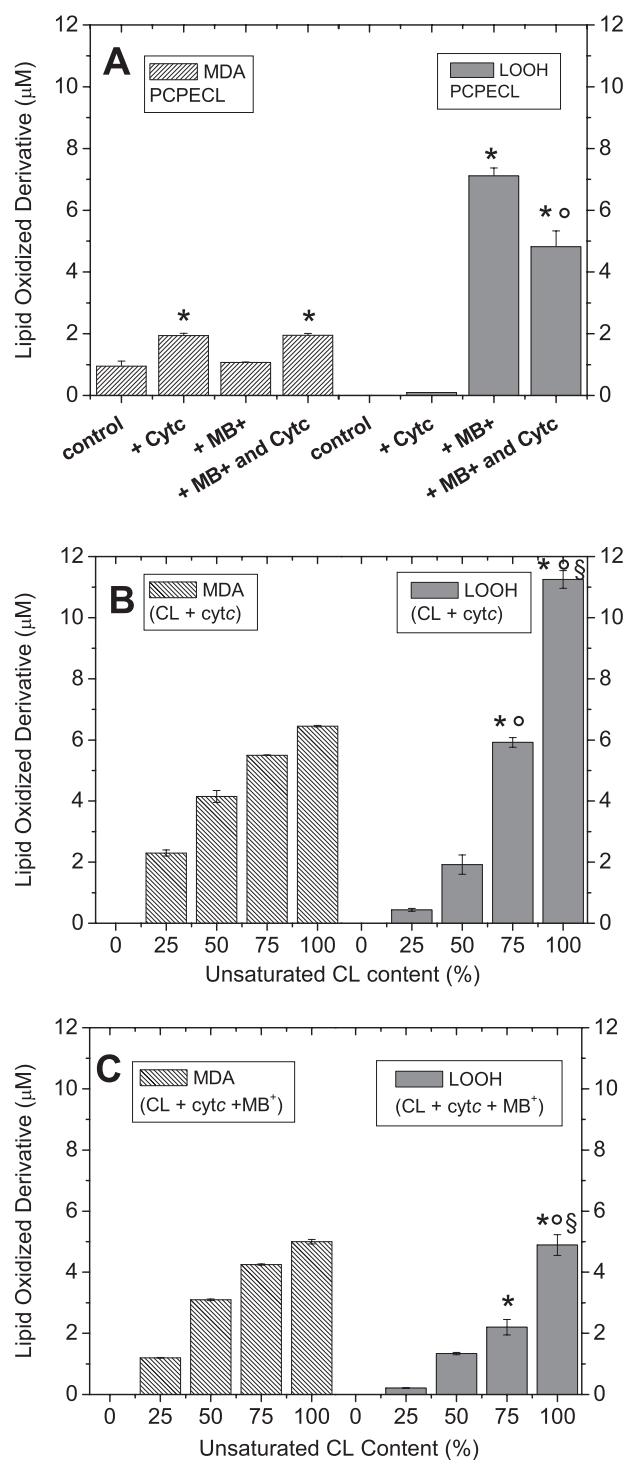


FIGURE 4. Dosage of oxidized lipid products of *tu*PCPECL and CL liposomes. *A*, lipid-oxidized products from *tu*PCPECL liposomes: MDA (dense pattern) and lipid hydroperoxide (gray color) were determined in 2 mM *tu*PCPECL liposomes after 50 min under irradiation in the following conditions: 2 mM *tu*PCPECL liposomes (control); 2 mM *tu*PCPECL liposomes plus 4 μM cytochrome *c* (+Cyt_c); 2 mM *tu*PCPECL liposomes plus 10 μM methylene blue (+MB⁺); 2 mM *tu*PCPECL liposomes plus 4 μM cytochrome *c* and 10 μM methylene blue (+MB⁺ and +Cyt_c). The asterisk indicates significantly different ($p < 0.05$) from the control, and the symbol "o" indicates significantly different ($p < 0.05$) from cytochrome *c* and MB⁺ alone. *B*, lipid-oxidized products of CL liposomes containing 0, 25, 50, 75, and 100% of unsaturated CL. For MDA, statistical analysis considered that the means are significantly different each other. The symbols *, °, and § indicate significantly different ($p < 0.05$) from 25%, 50, and 100% *pu*CL, respectively.

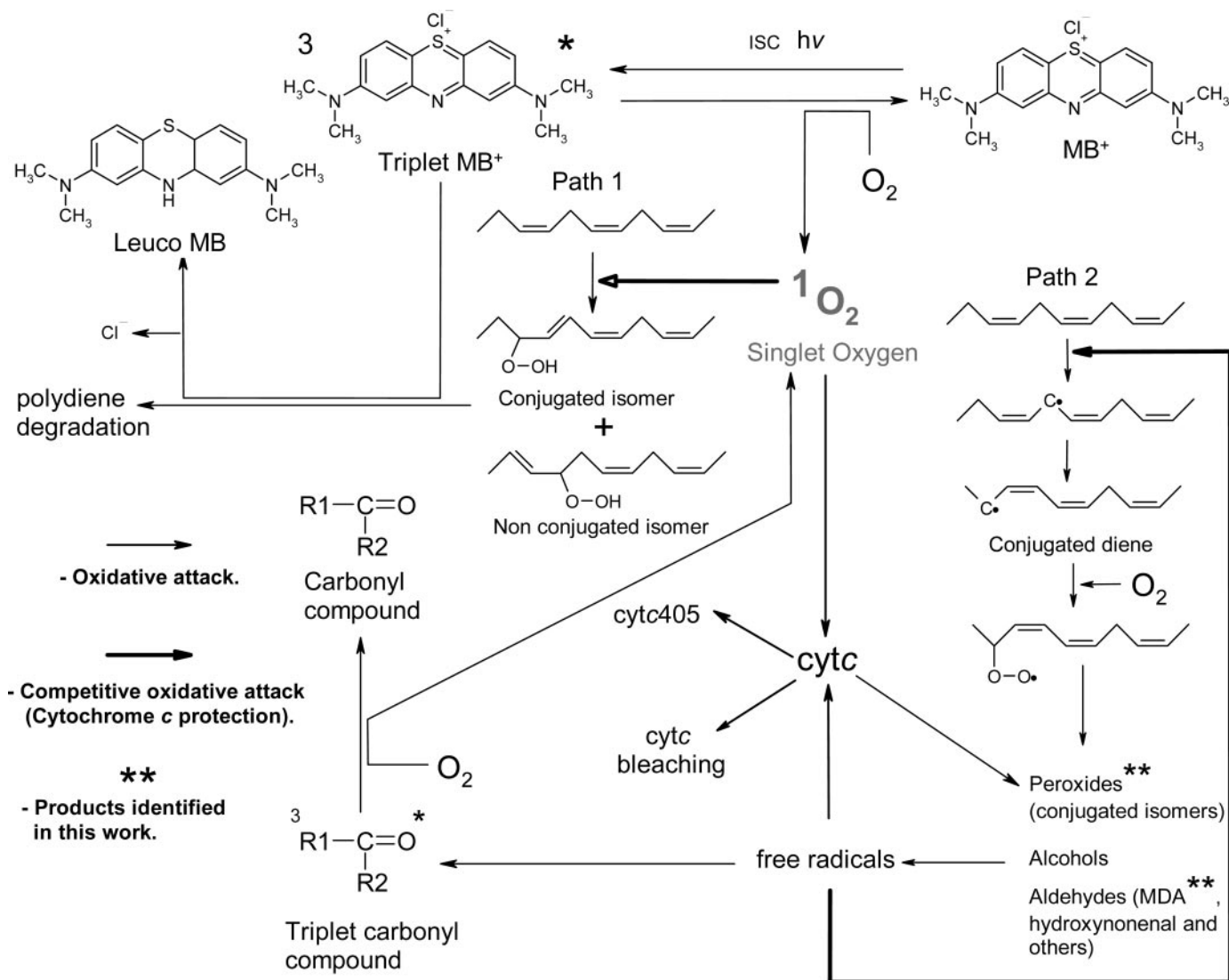
of *pu*PCPECL20 and *ts*PCPECL (~50% at 10 min). Although the various compositions of lipids could affect the size or shape of the sonicated liposomes, identical results were obtained with round 100 nm extruded PCPECL liposomes (not shown). To establish whether the lipid composition influences the protection of cytochrome *c* against O₂ (¹Δ_g)-promoted oxidation, the protein was submitted to photodynamic action in the presence of 100 nm-diameter-extruded CL liposomes containing 0, 25, 50, 75, and 100% unsaturated lipid (*ts*CL, *pu*CL25, *pu*CL50, *pu*CL75, and *tu*CL, respectively).

Fig. 3, *A* and *B*, show, respectively, the spectra of cytochrome *c* associated with *pu*CL25 and *ts*CL obtained at 0, 5, and 10 min after irradiation in the same previously described conditions. In CL liposomes, 25% unsaturated lipid was sufficient to protect cytochrome *c* as well as to increase even more the MB⁺ bleaching percentage that attained almost 100% after 10 min under irradiation (Fig. 3*A*). The liposomes *pu*CL50, *pu*CL75, and *tu*CL were equally efficient to protect cytochrome *c* and promoted total MB⁺ bleaching after 5 min of irradiation (not shown). Fig. 3*B* shows that, similarly to *ts*PCPECL, *ts*CL was inefficient in protecting cytochrome *c* that was converted to cyt_c405 after 50 min of irradiation. By comparing with the results obtained in *pu*PCPECL20 (Fig. 2*E*) and *ts*PCPECL (Fig. 2*F*), *ts*CL liposomes were the most efficient lipid to prevent MB⁺ bleaching. However, in the presence of *ts*CL, the MB⁺ spectrum peaking at 664 nm exhibited a 6 nm blue shift. The cause of the MB⁺ spectral changes remains to be elucidated and is not the scope of the present work.

Effect of O₂ (¹Δ_g) on Cytochrome *c*-Containing PCPECL and CL Liposomes—From the above results we concluded that the presence of unsaturated lipids prevented the formation of O₂ (¹Δ_g)-promoted cyt_c405 as well as favored the formation of leuco-MB⁺. Thus, it was important to determine the oxidative lipid damage that accompanied the photochemically promoted changes in the dye and in the protein (Fig. 4, *A*–*C*).

Fig. 4*A* shows that the association of cytochrome *c* with *tu*PCPECL liposomes increased ~2-fold the MDA content, whereas increased only slightly the hydroperoxide (LOOH) content. The reaction of cytochrome *c* with either traces of LOOH, which could be present in the *tu*PCPECL vesicles, or with O₂ (¹Δ_g)-produced LOOH generates LOO[•], that triggers the propagation of the lipid peroxidation. The free radical-promoted lipid peroxidation culminates with the production of MDA. As expected, the lipid-oxidized products were drastically lowered when cytochrome *c* was assayed with *pu*PCPECL80 liposomes (not shown). This result indicates specificity of the basic protein, cytochrome *c*, to attack the oxidized products of CL, an acidic phospholipid. The irradiation of MB⁺-containing *tu*PCPECL led to a drastic increase of LOOH content without

C, lipid-oxidized products of CL liposomes in the presence of cytochrome *c* and MB⁺: MDA (dense pattern) and lipid hydroperoxide (gray color) were determined in liposomes containing 0, 25, 50, 75, and 100% unsaturated CL. For MDA, statistical analysis considered that the means are significantly different from each other. The symbols *, °, and § indicate significantly different ($p < 0.05$) from 25%, 50, and 100% *pu*CL, respectively. The results are the mean of at least three independent experiments, and the error bars correspond to the standard deviations. Statistical analysis was done by using GraphPad analysis of variance calculating software. The post-hoc tests (Bonferroni correction) were done by using QuickCalcs (GraphPad).



SCHEME 1. Proposed mechanisms for the photochemically promoted oxidative damage of lipids, cytochrome *c*, and dye during PDT produced by MB⁺ photosensitization. The scheme depicts the proposed photo-oxidative events that occurred in the system formed by cytochrome *c*, membranes, and MB⁺.

affecting MDA content present in the sample (see control MDA content). In fact, it is well known that the oxidative attack of O₂ (¹Δ_g) on lipid acyl chain produces lipid peroxides (33) (Scheme 1). The lipid hydroperoxide content was significantly lowered in the presence of cytochrome *c* that competed with MB⁺ for the lipid damage. In fact, the MDA content determined in *tu*PCPECL liposomes containing both cytochrome *c* and MB⁺ was almost identical to that obtained when MB⁺ was absent. Interesting findings were those from the results obtained with CL liposomes (Fig. 4, B and C). Similarly to that observed for *tu*PCPECL, CL liposomes containing unsaturated lipids did not exhibit an increase of MDA content after irradiation in the presence of MB⁺ (not shown). However, in this condition, the LOOH present in control sample decreased to zero (not shown). This result is in agreement with the ability of triplet MB⁺ to react with LOOH (34) and suggests that contrary to PCPECL, MB⁺ should be bound to the negatively charged CL liposomes. In the absence (Fig. 4B, dense pattern bars) and in the presence of MB⁺ (Fig. 4C, dense pattern bars), cytochrome *c*-promoted increase of MDA content was proportional to the

unsaturated CL content and exhibited a hyperbolic profile. Otherwise, the LOOH content of CL liposomes assayed with cytochrome *c* (Fig. 4B, gray bars) exhibited an exponential growth. As expected, although exhibiting similar growing profile, the amount of LOOH was significantly lower when MB⁺ was also present, because the triplet dye can react with LOOH (34) (Fig. 4C, gray bars). In the presence of cytochrome *c*, the exponential growth of LOOH content proportional to the unsaturated CL content suggested that secondary oxidative routes contributed to the formation of the lipid-derivative peroxide. Previously, it was demonstrated that the reaction of cytochrome *c* with aldehydes produces triplet carbonyls prone to generate O₂ (¹Δ_g) via energy transfer (35–38). In fact the LOOH content in CL liposomes containing unsaturated lipids increased 10-fold in phosphate-buffered D₂O (not shown). Despite the generation of O₂ (¹Δ_g), no significant cytochrome *c* damage was detected in the conditions of Fig. 4B (not shown). Taken together, the result described above and the results presented in Figs. 2B, 2D, 3A, 4A, and 4B suggest that, whatever the O₂ (¹Δ_g)

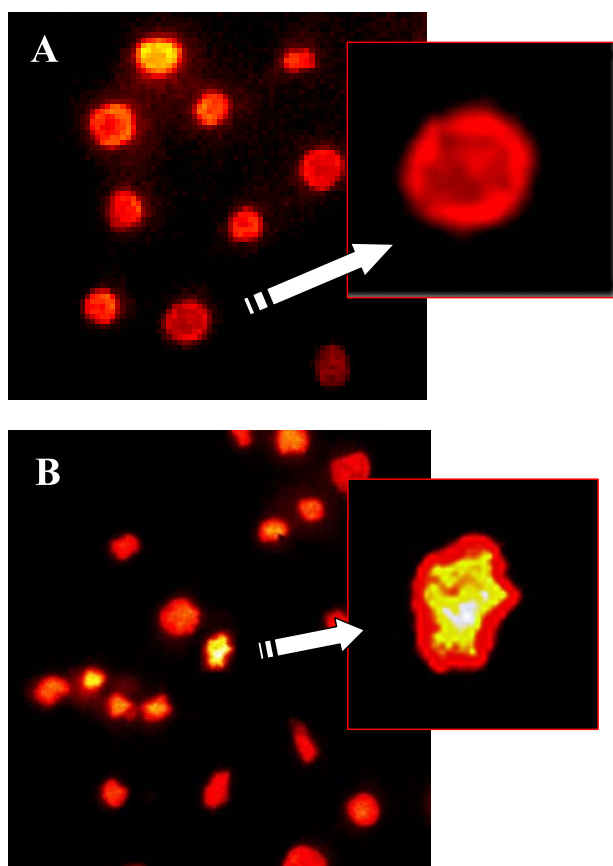


FIGURE 5. Induction of apoptosis in rabbit aortic SMCs by different cytochrome *c* types. Cells were microinjected with 0.5 mg/ml of the following cytochrome *c* types: cytc405 (A) and lipid-protected cytochrome *c* (B). For these experiments Hoechst 33342 was used to visualize the cells. The arrows point to zoom images of normal and apoptotic cells.

source, unsaturated lipids are actually efficient to protect cytochrome *c* against the oxidative damages promoted by this excited species.

Pro-apoptotic Activity of cytc405 and Lipid-protected Cytochrome *c*—Previously, the characterization of cytc405 revealed that this oxidized form of cytochrome *c* exhibited significant structural and functional differences as compared with the native form (24). However, the capacity of cytc405 to trigger apoptosis remains to be investigated. Altogether, considering that the mitochondrial model membranes were able to protect cytochrome *c* against photochemically generated $O_2 (^1\Delta_g)$, it was important to investigate whether the lipid-protected cytochrome *c* retained its capacity to trigger apoptosis.

The physiologically relevant dose of cytochrome *c* for cellular microinjection in SMCs was determined as described by Li *et al.* (32). In SMCs the onset of apoptosis with half-maximal effects was observed 2 h after the microinjection of 0.4 mg/ml native cytochrome *c*. Having determined the appropriate cytochrome *c* dose to trigger apoptosis in SMCs, the effects of the microinjection of cytc405 and lipid-protected cytochrome *c* (Fig. 5, A and B) were analyzed. Fig. 5A shows that, 2 h after microinjection of cytc405, most cells remained with a round well defined nucleus border and absence of chromatin condensation. Similar results were obtained with the microinjection of the buffered medium (not shown). Fig. 5B shows that, at the same time

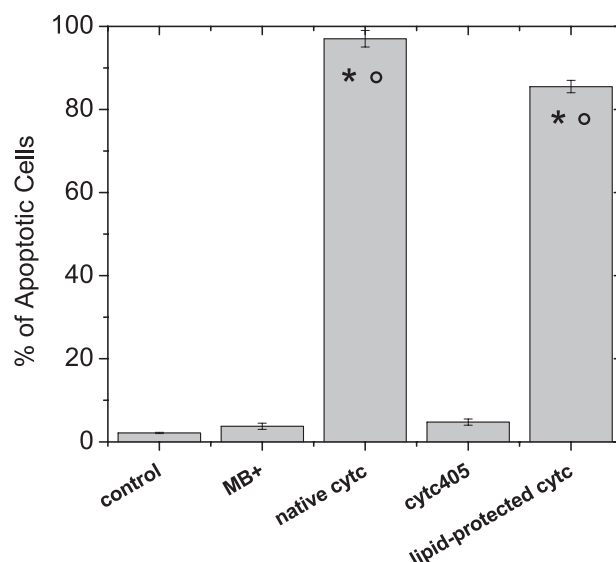


FIGURE 6. Percentage of apoptotic nuclei in SMCs scored after microinjection procedures. The percentage of apoptotic nuclei in SMCs was scored 2 h after the microinjection of saline-buffered medium (*control*), saline-buffered medium plus methylene blue (*MB⁺*), saline-buffered medium plus native cytochrome *c* (*native cytc*), saline-buffered medium plus cytochrome *c* 405 (*cytc405*), and saline-buffered medium plus lipid-protected cytochrome *c* (*lipid-protect cytc*). Each bar represents the mean percentage ± range of apoptotic cells in two isolated experiments. Fifty cells were microinjected for each condition in each experiment. The results correspond to the mean of at least two independent experiments, and the error bars correspond to the standard deviations. The asterisk indicates significantly different ($p < 0.05$) from the control, and the symbol "o" indicates significantly different ($p < 0.05$) from cytc405, according to statistical analysis performed by using GraphPad software (an analysis of variance calculating program) and post-hoc tests (Bonferroni correction) that were done by using QuickCalcs (GraphPad).

interval after lipid-protected cytochrome *c* microinjection, most cells exhibited condensed and fragmented nuclei typical of apoptosis. This result was similar to that observed after microinjection of native cytochrome *c* (not shown). The corresponding insets of Fig. 5 (A and B) are zoom images of normal and apoptotic cell nuclei, respectively.

Following microinjection, cells were counted, and the results were presented as percentage of apoptotic cells (Fig. 6). According to Fig. 6, the microinjection of cytc405 did not induce a significant increase in the percentage of apoptosis of SMCs as compared with the control (microinjection of buffered saline) and the microinjection of MB^+ . However, the microinjection of lipid-protected cytochrome *c* induced apoptosis of ~85% of SMCs, a percentage very close to that induced by native cytochrome *c* (~97%).

These results indicate that in homogeneous medium photo-generated $O_2 (^1\Delta_g)$ induced oxidative damage in the cytochrome *c* structure and promoted the loss of its capacity to activate caspases. The presence of unsaturated lipids protected the cytochrome *c* structure and the ability to activate caspases, because they were the principal target for $O_2 (^1\Delta_g)$. To confirm that caspase activation was involved in the apoptosis observed in our experimental conditions, we performed caspase-3 fluorometric assays by using native cytochrome *c*, cytc405, and lipid-protected cytochrome *c*. Caspase-3, also known as CPP-32, Yama, or Apopain (39), is an intracellular cysteine protease that exists as a proenzyme, becoming activated during caspase events associated with apoptosis. The SMC cell lysate was incu-

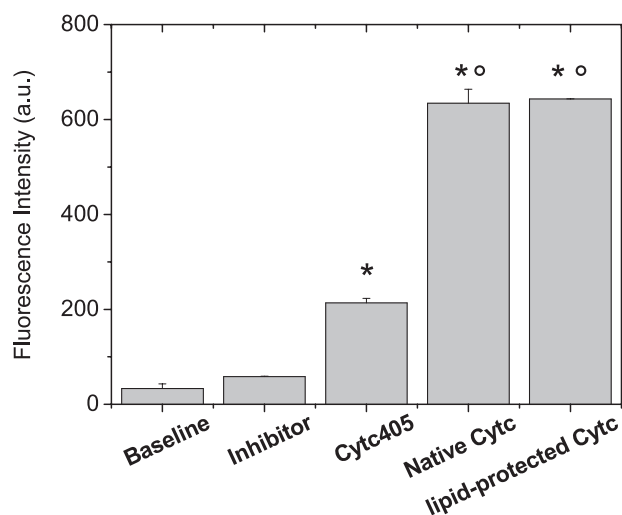


FIGURE 7. **Caspase activation by different cytochrome *c* types.** SMC pellet was lysed by the addition of 25 μ l of cold Cell Lysis Buffer (R&D Systems) per 1×10^6 cells. For the reaction, 100 μ l of cell lysate was mixed with an equal volume of 2 \times reaction buffer and 3 ml of fresh dithiothreitol stock solution. To each reaction well 25 μ M native cytochrome *c*, lipid-protected cytochrome *c*, or cytc405 were added prior to the addition of 10 ml of Caspase-3 fluorogenic substrate (DEVD-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin). The plate was incubated for 2 h, and the fluorescence was read (excitation at 400 nm and reading at 505 nm). The results correspond to the mean of at least two independent experiments, and the error bars correspond to the standard deviations. The asterisk indicates significantly different ($p < 0.05$) from the control, and the symbol "o" indicates significantly different ($p < 0.05$) from cytc405, according to statistical analysis performed by using GraphPad software (an analysis of variance calculating program) and post-hoc tests (Bonferroni correction) that were done by using QuickCalcs (GraphPad).

bated for 2 h with the caspase-3 fluorogenic substrate DEVD-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin. Prior to the addition of the substrate native cytochrome *c*, lipid-protected cytochrome *c* and cytc405 were added to different cell lysate-containing wells. The fluorescence intensity detected in the wells containing cytc405 was 3.3-fold lower than that detected in the presence of native and lipid-protected cytochrome *c* (Fig. 7). Although the fluorescence intensity measured in the assays with cytc405 was significantly higher than the control result, it was also significantly lower than the results obtained with native and lipid-protected cytochrome *c*. In fact, it is not possible to compare quantitatively results obtained from measurement of different phenomena, apoptosis and caspase activation, that are triggered, respectively, in different conditions, *i.e.* living cell and cell lysate.

DISCUSSION

Previously we characterized the effect of the photodynamic action of methylene blue on cytochrome *c* structure and reactivity (24). In that work, it was established that, in conditions in which the native structure of cytochrome *c* was not changed, both photogenerated $O_2 (^1\Delta_g)$ and free radicals attacked preferentially the amino acid residues of cytochrome *c*. The principal targets were identified as being Met-80 and Tyr-74 that led, respectively, to the conversion of heme iron from low to high spin state and the loss of the capacity to be reduced by aromatic compounds. On the other hand, the heme group was also attacked by both the photogenerated oxidant species, $O_2 (^1\Delta_g)$, and free radicals, in conditions that increased heme exposure

degree, *e.g.* highly alkaline pH. In conditions in which exclusively $O_2 (^1\Delta_g)$ was generated, only the amino acid residues were the target for the excited species at the expense of alterations in cytochrome *c* structure and spin state produced by different factors such as the presence of SDS micelles. However, the previously studied model system, *i.e.* cytochrome *c* in phosphate buffer and in phosphate-buffered SDS micelles, had the objective to identify the types of modifications that $O_2 (^1\Delta_g)$ could produce in the cytochrome *c* structure, but it did not reproduce the biological conditions in which the photodynamically generated reactive species could act on cytochrome *c* during PDT. In mitochondria, cytochrome *c* is associated with the inner membrane, which contains high amounts of unsaturated phospholipids. Thus, the polyunsaturated lipids present in the inner mitochondrial membrane could protect cytochrome *c* against the attack of $O_2 (^1\Delta_g)$. Actually, as demonstrated by Fig. 2 (A–F), the cytochrome *c* Soret band blue shift, an indication of $O_2 (^1\Delta_g)$ attack on the Met-80 residue, was observed only in the presence of *ts*PCPECL and *pu*PCPECL20. In the presence of *tu*PCPECL and *pu*PCPECL80, cytochrome *c* remained in the low spin state during the irradiation. The experiments carried out with *pu*CL25 (Fig. 3A), *pu*CL50 (not shown), *pu*CL75 (not shown), and *ts*CL (Fig. 3B) liposomes showed that, whatever the lipid composition, the presence of unsaturated lipids was crucial for cytochrome *c* protection against $O_2 (^1\Delta_g)$ -promoted oxidation. However, the percentage of unsaturated lipids necessary to protect significantly cytochrome *c* varied according to the composition of the membrane. Thus, in PCPECL liposomes 20% of unsaturated lipids were not enough to protect cytochrome *c*, but CL liposomes containing 25% unsaturated CL were efficient to completely protect cytochrome *c*. However, PCPECL and CL liposomes containing exclusively saturated lipids were both inefficient to protect cytochrome *c*. The partial bleaching of cytochrome *c* observed in the presence of lipids could be attributed to the attack of lipid- or dye-derived free radicals on the porphyrin ring (24, 28, 40).

In the experimental conditions used in the present study in which oxidized lipid derivatives were detected (presence of cytochrome *c*, and presence of photoexcited MB^+ and both protein and photoexcited dye) the occurrence of two oxidative routes for lipids can be presumed. Polyunsaturated fatty acids react with $O_2 (^1\Delta_g)$ to give a mixture of conjugated and non-conjugated isomers of the produced hydroperoxides, whereas a radical attack leads to the production of the conjugated isomers only (25). The reaction mechanism of $O_2 (^1\Delta_g)$ with polyunsaturated lipids differs from that exhibited by free radicals (Scheme 1, *paths 1* and 2, respectively) (42). In a peroxide-free lipid system (Scheme 1, *path 2*), highly reactive free radicals can abstract a hydrogen atom from a methylene group whose C–H bond is weakened by the presence of an adjacent double bond. The carbon radical tends to be stabilized by a molecular rearrangement to form a conjugated diene. Under aerobic conditions conjugated dienes can react with O_2 to give a peroxy radical, LOO^* . The formation of peroxy radical leads to the propagation of the lipid peroxidation. The termination of the process is achieved by the following processes: (i) formation of lipid peroxide $LOOH$ by a reducing agent; (ii) reaction of L^* with LOO^* to form the stable $LOOL$ dimers; and (iii) combination of

Protection of Cytochrome *c* by Unsaturated Lipids

two peroxide molecules to form hydroxylated derivatives (LOH). Some bonds between lipid peroxides and membrane proteins are also possible. However, $O_2 (^1\Delta_g)$ can react and be added to either end carbon of a double bond (Scheme 1, *path 1*), which assumes the *trans* configuration. As described for alkenes and polydienes, the formed hydroperoxide can react with the triplet MB^+ and lead to the bleaching of the dye (34). In fact, the percentage of MB^+ bleaching observed during irradiation was increased by changing phosphate buffer by phosphate-buffered *tu*PCPECL and *pu*PCPECL80 liposomes (Fig. 2, *B–D*) and even more exacerbated in the presence of unsaturated CL liposomes (Fig. 3A and not shown results) whose negatively charged surface should exhibit high affinity for the dye.

The reaction of cytochrome *c* with lipid-oxidized derivatives such as aldehydes and peroxides could lead to the formation of free radical derivatives that initiate a cascade of oxidative processes that terminate with the production of MDA (*path 2*) (43, 44). In fact, the presence of cytochrome *c* increased the MDA content both in the presence and in the absence of MB^+ (Fig. 4, *A–C*). Among the lipid-oxidized derivatives able to react with cytochrome *c*, LOOH seemed to be one of the principal candidates. However, the exponential growth of LOOH observed in CL liposomes assayed with cytochrome *c* in the absence of MB^+ suggests that lipid-derived carbonyl compounds should be the best substrates for cytochrome *c* in this condition. As mentioned before, the triplet products that are expected from this reaction could generate $O_2 (^1\Delta_g)$ that contributed to the increase of LOOH content (Scheme 1, *path 1*). Thus, the lowering of LOOH content observed in MB^+ -containing liposomes (Fig. 4, *A* and *C*) when cytochrome *c* was present could be better explained by the competition for the damage between the protein and the dye than by LOOH consumption by cytochrome *c*. On the other hand, CL-derived aldehydes and peroxides should be the preferential targets for cytochrome *c* attack (28), because the LOOH content was lower than that of MDA in liposomes with low amounts of unsaturated CL (Fig. 4, *A–C*). In this case, the LOOH detected should be formed via the reduction of LOO^{\cdot} by a reducing agent. The assignment of CL as the principal target for cytochrome *c* attack was reinforced by the significant decrease of Soret band bleaching (from 36% to 12% at 10 min) when *tu*PCPECL (Fig. 2*B*) was replaced by *pu*PCPECL80 (Fig. 2*D*) that, despite the presence of unsaturated PC and PE, contained non-reactive saturated CL. In comparison with Fig. 4*A*, the drastic decrease of the production of lipid-oxidized derivatives in *pu*PCPECL80 assayed with cytochrome *c* (not shown) is also in agreement with the specificity of CL derivatives as cytochrome *c* substrates.

In liposomes containing high amounts of unsaturated CL, in the presence of cytochrome *c*, $O_2 (^1\Delta_g)$ produced by energy transfer from triplet carbonyls could also contribute to LOOH production (Scheme 1). In the presence of photoexcited MB^+ , the content of LOOH produced by oxidant species is expected to always be underestimated. Because it was preferentially partitioned in the lipid bilayer (45), MB^+ , in the triplet state, could access and react with hydroperoxides (34). In fact, MB^+ bleaching degree was particularly higher in the presence of *tu*PCPECL and *pu*PCPECL80. This proposal was corroborated by the drastic increase in MB^+ bleaching in the presence of the negatively

charged CL liposomes that exhibit high affinity for the positively charged MB^+ . The above described results suggest that the typical mechanism of $O_2 (^1\Delta_g)$ reaction with polydienes occurred in the model systems used in this study (34). In this condition, besides the presence of lipid traps for $O_2 (^1\Delta_g)$, the relatively rapid dye degradation contributes to the protection of cytochrome *c*. The dye degradation also terminates the process of lipid peroxidation.

Therefore, in the presence of membranes with high content of unsaturated lipids, chemically and photodynamically generated $O_2 (^1\Delta_g)$ was significantly trapped by the lipid content that prevented the attack on cytochrome *c* Met-80 and the consequent Soret band blue shift. This proposal was corroborated by the cytochrome *c* Soret band blue shift observed when $O_2 (^1\Delta_g)$ was generated in the presence of *ts*PCPECL, *pu*PCPECL20, and *ts*CL liposomes. However, a part of the cytochrome *c* population had the heme group chemically attacked by the lipid- and/or dye-derived free radicals leading to the observed partial Soret band bleaching.

As mentioned before, the formation of MDA in the presence of cytochrome *c* was expected to come preferentially from the reaction of heme iron with CL derivatives. The inner mitochondrial membrane exhibits unsaturated CL, but ~45% of the CL content is present at the inner leaflet (26, 47, 48). Thus, in biological conditions, the structural organization of the inner mitochondrial membrane could protect cytochrome *c* against $O_2 (^1\Delta_g)$ attack. On the other hand, by impairing the contact of cytochrome *c* with around 40% of the CL content, the membrane organization disfavors the production of free radicals and excited species produced by the attack of cytochrome *c* on the CL content. Furthermore, in a similar way as shown in Fig. 2*C*, the detachment of cytochrome *c* from the inner mitochondrial membrane following the opening of the permeability transition pore could also prevent extensive oxidative damage of the protein.

Based on the data presented in this study it is possible to postulate a sequence of events in mitochondria that culminate in apoptosis. As previously described (46), inside the cell, MB^+ exhibits high affinity for the mitochondrial inner membranes that become loaded with the dye. The irradiation of the medium leads to the oxidative damage of the mitochondrial lipid content and the opening of the mitochondrial permeability transition pore (41). Mitochondrial permeability transition pore opening leads to loss of the mitochondrial transmembrane potential and the consequent increase of pH of the intermembrane space. As previously characterized (27) and confirmed by experiments with mitoplasts,⁶ the pH increase is expected to reduce the affinity of cytochrome *c* for the inner mitochondrial membrane. Thus, these events culminate in the detachment of cytochrome *c* from the inner mitochondrial membrane to participate, in the cytosol, of the upstream or downstream processes of caspase activation (26).

⁶ T. Rodrigues, L. P. de França, C. Kawai, P. A. de Faria, K. C. U. Mugnol, F. M. Braga, I. L. S. Tersariol, S. S. Smaili, and I. L. Nantes, unpublished results.

CONCLUSION

The results presented here allow the following conclusions: (i) Photodynamically generated $O_2(^1\Delta_g)$ can attack cytochrome *c* Met-80 both in buffered water and in the presence of PCPECL and CL liposomes. (ii) PCPECL liposomes with high content of unsaturated lipids act as $O_2(^1\Delta_g)$ -trapping and prevent the conversion of the heme group to the high spin form (cytc405). (iii) The percentage of unsaturated lipid necessary to protect cytochrome *c* depends on the composition of the membrane. (iv) In the above condition, if cytochrome *c* remains attached to the oxidized membrane, the heme iron can react with CL-derived products generating free radicals that attack the heme group and promote Soret band bleaching. The free radical-promoted cytochrome *c* bleaching can also be prevented by unsaturated lipids. (v) When extensive lipid oxidation occurs, the attack of cytochrome *c* on lipid-derived aldehydes produces triplet carbonyls that generate $O_2(^1\Delta_g)$ via energy transfer. These events lead to an exponential growth of the lipid peroxide content as well as the saturation of MDA content. (vi) The inner mitochondrial membrane organization and composition besides the expected detachment of cytochrome *c* from the membrane as a consequence of the mitochondrial permeability transition pore opening could prevent the oxidative damage of the protein and preserve its capacity to trigger apoptosis.

REFERENCES

1. Foote, C. S. (1991) *Photochem. Photobiol.* **54**, 659
2. Martinez, G. R., Ravanat, J. L., Cadet, J., Miyamoto, S., Medeiros, M. H. G., and Di Mascio, P. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3056–3057
3. Monroe, B. M. (1985) in *Singlet O_2* (Frimer, A. A., ed) pp. 177–224, vol. 1, CRC Press, Boca Raton, FL
4. Pierlot, C., Aubry, J. M., Briviba, K., Sies, H., and Di Mascio, P. (2000) *Methods Enzymol.* **319**, 3–20
5. Martinez, G. R., Loureiro, A. P. M., Marques, S. A., Miyamoto, S., Yamaguchi, L. F., Onuki, J., Almeida, E. A., Garcia, C. C. M., Barbosa, L. F., Medeiros, M. H. G., and Di Mascio, P. (2003) *Mutat. Res.* **544**, 115–127
6. Agnez, L. F., Costa de Oliveira, R. L., Di Mascio, P., and Menck, C. F. M. (1996) *Carcinogenesis* **17**, 1183–1185
7. Martinez, G. R., Ravanat, J. L., Cadet, J., Miyamoto, S., Medeiros, M. H., and Di Mascio, P. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3056–3057
8. Ravanat, J. L., Di Mascio, P., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., and Cadet, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 40601–40604
9. Ravanat, J. L., Saint-Pierre, C., Di Mascio, P., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., and Cadet, J. (2001) *Helv. Chim. Acta* **84**, 3702–3709
10. Agnez-Lima, L. F., Napolitano, R. L., Fuchs, R. P. P., Di Mascio, P., Muotri, A. R., and Menck, C. F. M. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, 2899–2903
11. Agnez-Lima, L. F., Di Mascio, P., Demple, B., and Menck, C. F. M. (2001) *Biol. Chem.* **382**, 1071–1075
12. Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., Ravanat, J. L., Cadet, J., and Di Mascio, P. (2002) *Biol. Chem.* **383**, 607–617
13. Cavalcante, A. K. D., Martinez, G. R., Di Mascio, P., Menck, C. F. M., and Agnez-Lima, L. F. (2002) *DNA Repair* **1**, 1051–1056
14. Ravanat, J. L., Sauvaigo, S., Caillat, S., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P., Favier, A., and Cadet, J. (2004) *Biol. Chem.* **385**, 17–20
15. Ravanat, J. L., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P., and Cadet, J. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.* **423**, 23–30
16. Tuiete, E. M., and Kelly, J. M. (1993) *J. Photochem. Photobiol.* **21**, 103–124
17. Henderson, B. W., and Dougherty, T. J. (1992) *Photochem. Photobiol.* **55**, 145–157
18. Foote, C. S. (1968) *Science* **162**, 963
19. Michaeli, A., and Feitelson, J. (1995) *Photochem. Photobiol.* **61**, 255–260
20. Michaeli, A., and Feitelson, J. (1997) *Photochem. Photobiol.* **51**, 299–303
21. Miskoski, S., and Garcia, N. A. (1993) *Photochem. Photobiol.* **57**, 447–452
22. Yang, J., Liu, X. S., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng T., Jones, D. P., and Wang, X. (1997) *Science* **275**, 1129–1132
23. Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (1997) *Science* **275**, 7770–7775
24. Estevam, M. L., Nascimento, O. R., Baptista, M. S., Di Mascio, P., Prado, F. M., Faljoni-Alario, A., Zucchi, M. R., and Nantes, I. L. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 39214–39222
25. Tanielian, C., Mechin, R., Seghrouchni, R., and Schweitzer, C. (2000) *Photochem. Photobiol.* **71**, 12–19
26. Desagher, S., and Martinou, J. C. (2000) *Trends Cell Biol.* **10**, 369–377
27. Kawai, C., Prado, F. M., Nunes, G. L., Di Mascio, P., Carmona-Ribeiro, A. M., and Nantes, I. L. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 34709–34717
28. Nantes, I. L., Faljoni-Alario, A., Nascimento, O. R., Bandy, B., Gatti, R., and Bechara, E. J. H. (2000) *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 786–796
29. Ruozi, B., Tosi, G., Forni, F., Fresta, M., and Vandelli, M. A. (2005) *Eur. J. Pharm. Sci.* **25**, 81–89
30. Yalamanchili, M. R., Veeramasuneni, S., and Miller, J. D. (1996) *J. Colloid Interface Sci.* **184**, 594–600
31. Jass, J., Torbjorn, T., Puu, A., and Gertrud, E. (2003) *Methods Enzymol.* **367**, 199–213
32. Li, F., Srinivasan, A., Wang, Y., Armstrong, R. C., Tomaselli, K. J., and Fritz, L. C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30299–30305
33. Kellogg, E. W., 3rd, and Fridovich, I. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 8812–8817
34. Tanielian, C., Mechin, R., and Shakirullah, M. (1992) *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **64**, 191–199
35. Nantes, I. L., Bechara, E. J. H., Vercesi, A. E., and Cilento, G. (1995) *Photochem. Photobiol.* **62**, 522–527
36. Nantes, I. L., Bechara, E. J. H., and Cilento, G. (1996) *Photochem. Photobiol.* **63**, 697–701
37. Nantes, I. L., Faljoni-Alario, A., and Vercesi (1998) *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 546–553
38. Almeida, A. M., Bechara, E. J. H., Vercesi, A. E., and Nantes, I. L. (1999) *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 744–751
39. Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., and Lazebnik, Y. A. (1995) *Nature* **376**, 37–43
40. Barr, D. P., and Mason, R. P. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 12709–12716
41. Cosso, R. G., Turim, J., Nantes, I. L., Almeida, A. M., Di Mascio, P., and Vercesi, A. E. (2002) *J. Bioenerg. Biomembr.* **34**, 157–163
42. Tanielian, C., and Mechin, R. (1994) *Photochem. Photobiol.* **59**, 263–268
43. Desai, I. D., and Tappel, A. L. (1963) *J. Lipid Res.* **4**, 204–207
44. Iwahashi, H., Nishizaki, K., and Takagi, I. (2002) *Biochem. J.* **361**, 57–66
45. Severino, D., Junqueira, H. C., Gugliotti, M., Gabrielli, D. S., and Baptista, M. S. (2003) *Photochem. Photobiol.* **77**, 459–468
46. Gabrielli, D., Belisle, E., Severino, D., Kowaltowski, A. J., and Baptista, M. S. (2004) *Photochem. Photobiol.* **79**, 227–232
47. Matsuyama, S., Llopis, J., Deveraux, Q. L., Tsien, R. Y., and Reed, J. C. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 318–325
48. Petit, J. M., Huet, O., Gallet, P. F., Maftah, A., Ratinaud, M. H., and Julien, R. (1994) *Eur. J. Biochem.* **220**, 871–879