



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**PRECIPITAÇÃO DE ACTOMIOSINA DE
VERTEBRADOS POR CONGELAMENTO DE
FRAÇÃO SOLÚVEL**

Aluno: Decivaldo dos Santos Dias

Orientador: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

UBERLÂNDIA – MG

FEVEREIRO - 2006



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**PRECIPITAÇÃO DE ACTOMIOSINA DE
VERTEBRADOS POR CONGELAMENTO DE
FRAÇÃO SOLÚVEL**

Aluno: Decivaldo dos Santos Dias

Orientador: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica)

UBERLÂNDIA – MG

FEVEREIRO – 2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

D541p Dias, Decivaldo dos Santos, 1975-
 Precipitação de actomiosina de vertebrados por congelamento de fra-
 ção solúvel / Decivaldo dos Santos Dias. - Uberlândia, 2006.
 49f. : il.
 Orientador: Milton Vieira Coelho.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Progra-
 ma de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Inclui bibliografia.
 1. Proteínas - Teses. I. Coelho, Milton Vieira. II. Universidade Fede-
 ral de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquími-
 ca. III. Título.

CDU: 577.112



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**PRECIPITAÇÃO DE ACTOMIOSINA DE
VERTEBRADOS POR CONGELAMENTO DE
FRAÇÃO SOLÚVEL**

Decivaldo dos Santos Dias

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Milton Vieira Coelho

Examinadores:

Dra. Amélia Hamaguchi

Dra. Maria de Fátima R. da Silva

Data de Defesa: 28 / 02 / 2006

Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

Uberlândia, ____/____/____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Rita dos Santos Dias e Delcídio Vieira Dias pela amizade, companheirismo e estímulo.

Ao meu filho Luís Eduardo Alves Dias pelo sorriso inocente, e Sônia Maria Alves da Silva pela compreensão.

Aos meus irmãos: Delson, Dinalda, Dinalva, Djalma, Divaldo e Dernevaldo meu eterno agradecimento por todo apoio, compre que me foi oferecido.

AGRADECIMENTOS

Ao professor e mestre, Milton Vieira Coelho, a mais sincera gratidão pelo apoio e paciência.

Aos companheiros de laboratório: Ademilton (Papi), Rogério (Rogê); Gabriel (Docinho), Vinícius (Vivi), Hugo Christiano e Dona Maura, pela ajuda e apoio durante a execução de grande parte deste trabalho. A todos os meus sinceros agradecimentos.

Aos funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

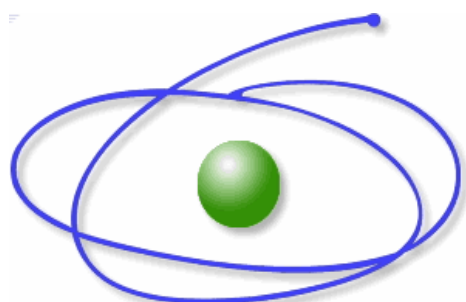
À secretária do Instituto de Genética e Bioquímica, Marlene, pela cooperação e esforço para a obtenção de materiais importantes para a execução deste trabalho.

Ao professor Dr. Foued Salmen Espíndola que sempre se dispôs a ajudar quando solicitado, pelos anticorpos fornecidos e por toda ajuda ao longo do mestrado.

Ao professor Dr. Cameron que sempre se dispôs a ajudar quando solicitado.

Aos professores do Instituto de Genética e Bioquímica por fornecerem conhecimentos em forma de disciplinas

ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO COM O APOIO DAS SEGUINTE
INSTITUIÇÕES:



C A P E S

FAPEMIG

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.1
INTRODUÇÃO GERAL	2
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
<hr/>	
CAPÍTULO I	15
<hr/>	
PURIFICAÇÃO DE MIOSINA II DE TESTÍCULO DE RATO	
Abstract	16
Resumo	17
Introdução	18
Material e Métodos	19
Purificação de miosina II de testículo de rato	19
Ensaio de sedimentação com actina	20
Atividade ATPase	20
Outros métodos	21
Resultados e Discussão	21
Agradecimentos	27
Referências Bibliográficas	28
<hr/>	
CAPÍTULO II	31
<hr/>	
PRECIPITAÇÃO DE ACTOMIOSINA DE CÉREBRO DE VERTEBRADOS POR CONGELAMENTO DE FRAÇÃO SOLÚVEL	
Abstract	32
Resumo	33
Introdução	34
Material e Métodos	35
Precipitação de miosina de cérebro	35
Atividade ATPase	36
Outros métodos	36
Resultados e Discussão	37
Agradecimentos	45
Referências Bibliográficas	46

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1:** SDS-PAGE da preparação de p205 de testículo de rato22
- Figura 2:** Purificação de p205 em coluna de Sephacryl S-400.....23
- Figura 3:** O p205 é reconhecido por um anticorpo específico para miosina II25
- Figura 4:** O p205 co-sedimenta com actina em uma maneira dependente de ATP25
- Figura 5:** Atividade K/EDTA-ATPásica da fração P4 de testículo e músculo esquelético26

CAPÍTULO II

- Figura 1:** SDS-PAGE da precipitação de actomiosina de cérebro por congelamento.....38
- Figura 2:** Atividade ATPase da fração P3 de cérebro de suino39
- Figura 3:** Immunoblotting das frações P3 de cérebro de suino, bovino e pintainho.....40

Figura 4: SDS-PAGE da preparação de actomiosina de cérebro de suino ..41

Figura 5: Immunoblotting para as frações S1 e S5 de cérebro de suino.....41

Figura 6: Fracionamento em coluna sephacryl S-50042

Figura 7: Atividade Mg ou Co^{2+} -ATPase da fração P3 de cérebro de suino.43

Figura 8: Efeito de Tween 20 na atividade Mg^{2+} -ATPase da fração P3 de
cérebro de suino.....43

LISTA DE ABREVIATURAS

P43 – polipeptídeo de 43 kDa

P205 – polipeptídeo de 205 kDa

ATP – Adenosina 5' trifosfato

ATPase – Adenosina trifosfatase

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

EGTA – Ácido N, N, N', N' -tetraacético etileno glicol-bis (β -aminoetil éter)

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

CAPS – ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanesulfônico

NBT – nitro azul tetrazólio

BCIP – 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

RESUMO GERAL

Miosinas são proteínas motoras que translocam sobre filamentos de actina e atualmente constituem uma superfamília com 20 classes. Algumas são conhecidas apenas a estrutura primária através de seqüência gênica, outras já estão bem caracterizadas bioquimicamente, como as miosinas I, II e V. São amplamente distribuídas em todas as células eucarióticas. Apresentam como características bioquímicas: alta atividade ATPase na presença de EDTA e alta concentração de potássio (atividade K/EDTA-ATPase) e uma baixa atividade Mg^{2+} -ATPase, que é estimulada por F-actina. Preparação de actomiosina é obtida a partir da precipitação de fração solúvel de cérebro tanto em baixa quanto em alta força iônica e esse processo de precipitação constitui um passo importante para purificar e caracterizar miosina II e V a partir de fração solúvel de cérebro. Miosina II é precipitada quando a fração solúvel de cérebro é dializada contra tampão de baixa força iônica, enquanto que, miosina V é precipitada seletivamente em relação à miosina II, quando a fração solúvel de cérebro é tratada com alta força iônica, sendo postulado que essa precipitação de miosina (II e V) seja resultado de sua interação com actina e vesículas. Recentemente temos obtido a precipitação de actomiosina a partir do congelamento de fração solúvel de cérebro ou testículo de rato. Neste trabalho mostramos a purificação de miosina II de testículo de rato e a obtenção de actomiosina de cérebro de suíno, bovino e pintainho através do congelamento de fração solúvel de cérebro e testículo.

Palavras chaves: miosina, actomiosina, testículos, cérebro, vertebrados.

INTRODUÇÃO GERAL

A capacidade de se movimentar voluntariamente é uma das características básicas dos seres vivos [1]. Para tanto, é necessário um conjunto de reações bioquímicas integradas. As células eucarióticas possuem no seu citoplasma um complexo conjunto de proteínas filamentosas, denominado de citoesqueleto, constituído em sua maioria de microtúbulos e filamentos de actina [2;3]. Este permite as células transportarem vesículas, sofrerem mudanças conformacionais e migrarem [4;5]. Processos esses altamente regulados pelas células, através de um conjunto de reações bioquímicas. Proteínas com atividade enzimática são as responsáveis pela realização dessas reações, dentre as quais estão as ATPases, enzimas que têm a propriedade de hidrolisar a molécula de adenosina trifosfato (ATP) e acoplar a energia liberada da hidrólise da ATP à realização de algum tipo de trabalho celular.

Miosina, dineína e cinesina que se deslocam ao longo do citoesqueleto, são conjuntamente denominadas de motores moleculares. São também os principais motores moleculares solúveis [6;7;8]. A característica comum desses motores moleculares é a capacidade de hidrolisar a ATP e converter parte da energia de hidrólise em trabalho mecânico, constituindo assim um componente gerador de força para a célula [9]. Apresentam um papel essencial em muitos processos celulares como contração muscular, fagocitose, emissão de pseudópodos, transporte de vesículas e organelas, migração de cromossomos durante o processo de divisão celular e citocinese [4;5;10].

Dineína e cinesina são as duas principais famílias de motores moleculares baseados em microtúbulos [11]. Cerca de 15 classes de dineínas são conhecidas, destas apenas duas são dineínas citoplasmáticas e as demais são dineínas axonemais, as quais têm função crítica no movimento de cílios e flagelos [11]. Todas as formas de dineína contêm uma longa cadeia polipeptídica com massa molecular >500 kDa (cadeia pesada de dineína) que é responsável pelas atividades ATPase e motora [11;12]. As dineínas também contêm várias

subunidades: cadeia intermediária, cadeia leve intermediária e cadeias leves [11;12], algumas que são comuns para dineína citoplasmática e axonemal, e outras que são específicas de subclasses de dineínas [11]. Dineínas citoplasmática, flagelar e ciliar possuem uma região relativamente conservada, o domínio cabeça, envolvida na produção de força ao longo dos microtúbulos [11]. As dineínas axonemais e citoplasmáticas são capazes de conduzir o deslizamento de microtúbulos *in vitro* [13]. São morfologicamente similares, sendo a forma citoplasmática relacionada, mas não idêntica à dineína axonemal [14].

Os microtúbulos são química e morfologicamente polarizados com extremidades mais (+) e menos (-) [2;15;16]. Nas células eucarióticas, a extremidade mais (+) está voltada para periferia celular, enquanto que a extremidade menos (-) está voltada para o núcleo celular [2;15;16]. Dineína citoplasmática, a princípio, foi referida como geradora de força em direção a extremidade menos (-) dos microtúbulos [3;14;17]. Contudo uma outra forma de dineína citoplasmática tem sido relacionada como geradora de força em direção à extremidade mais (+) dos microtúbulos, constituindo assim, as dineínas, motores moleculares bidirecionais [2;11;18].

Todas as cinesinas atuam como motores moleculares. Convertem a energia liberada da hidrólise da ATP em movimento ao longo de microtúbulos [8;19]. A primeira cinesina foi descoberta em axoplasma de lula por Vale et al [20]. A cinesina isolada de diferentes tecidos é um tetrâmero, que consiste de duas cadeias pesadas 120 kDa (cadeia alfa) e duas leves com cerca de 64 kDa (cadeias beta) [21]. O domínio catalítico globular é altamente conservado entre cinesinas e contém os sítios de ligação aos microtúbulos e ATP [22]. As cinesinas são ainda classificadas quanto à posição do domínio motor. Enquanto a cinesina de cérebro possui o domínio motor na extremidade N-terminal (tipo N), alguns membros dessa superfamília apresentam o domínio motor na extremidade C-terminal (tipo C) e outros apresentam esse domínio no meio da molécula (tipo M). Alguns membros da superfamília das cinesinas realizam movimento para a extremidade (+) dos microtúbulos, como as cinesinas tipo N;

enquanto outros realizam o transporte para a extremidade (-) dos microtúbulos [15;16;21;22]. As cinesinas estão envolvidas em vários processos celulares como transporte de organelas em neurônios, divisão celular e transporte de vesículas [15;16;21].

As miosinas constituem proteínas motoras que translocam sobre filamentos de actina. Despertam grande interesse principalmente em virtude do intenso estudo da miosina II de músculo esquelético, principal responsável pela contração muscular e a primeira miosina descoberta [1]. Constituem uma superfamília com 20 classes, classificação feita a partir da análise comparativa do domínio cabeça, sendo a classificação também similar em termos de organização do domínio cauda [23]. Algumas conhecidas apenas pela estrutura primária baseada na seqüência gênica, outras já estão bem caracterizadas bioquimicamente, como as miosinas I, II e V [24]. São amplamente distribuídas em todas as células eucarióticas [25]. As miosinas possuem um domínio motor altamente conservado entre as diferentes classes, enquanto que apresentam um domínio cauda característico de cada membro [23;26]. Apresentam como características bioquímicas: alta atividade ATPase na presença de EDTA e alta concentração de potássio, ou na presença de cálcio, baixa atividade Mg^{2+} -ATPase *in vitro* e estimulação da atividade Mg^{2+} -ATPase sob condições fisiológicas [27;28;29].

Com exceção das miosinas I, II e V pouco se conhece das propriedades bioquímicas dessas enzimas [24]. Miosina II muscular ou miosina convencional é o mais bem conhecido membro da superfamília das miosinas, isolada inicialmente de músculo esquelético, é uma proteína hexamérica composta por um par de cadeias pesadas com cerca de 200 kDa com um domínio cauda em α -hélice capaz de se alto associar para formar filamentos bipolares e dois pares de cadeias leves de aproximadamente 20 kDa [25]. Na década de 70, uma proteína de baixo peso molecular com característica de miosinas e com atividade Mg^{2+} -ATPase dependente de actina foi isolada de *Acanthamoeba catellani* [30], composta por uma única cadeia pesada e que não forma dímero [31], foi então denominada miosina I. Ainda na década de 70,

outra proteína de massa molecular de 200 kDa, com características de miosina como baixa atividade Mg^{2+} -ATPase e atividade K/EDTA-ATPase, também composta por duas cadeias pesadas, foi isolada de *Acanthamoeba catellani*, miosina II [32]. Sabe-se que miosina II é amplamente distribuída em todas as células eucarióticas e está implicada em muitos eventos celulares como migração cromossômica, crescimento celular e citocinese [4;32;33].

Todas as miosinas da classe I são compostas por uma única cadeia pesada [34;35]. Miosina I tem sido identificada em muitos eucariotos superiores [25;34;35;36]. A miosina I presente em vertebrados consiste de uma única cadeia pesada com uma massa molecular em torno de 110 a 130 kDa [31;35;36]. Miosina I possui três domínios funcionais: a região amino-terminal (domínio cabeça) que contém os sítios ligantes de ATP e actina, um domínio pescoço que contém seis sítios ligantes de calmodulina e um domínio carboxi-terminal (domínio cauda) que está implicada na interação com a carga a ser transportada [37]. Em tecido epitelial, miosina I tem sido associada ao transporte de vesículas [31;35;38].

Miosina V é uma proteína composta por duas cadeias pesadas com cerca de 212 kDa, estimativa feita a partir de sua sequência de aminoácidos [39], sendo que foi inicialmente referida como p190, devido a sua mobilidade relativa em SDS-PAGE [28;40]. Miosina V apresenta um domínio cabeça globular, na porção N-terminal da molécula, o qual possui o sítio ligante de actina e ATP, um domínio pescoço que apresenta seis motivos IQ nos quais se ligam cadeias leves ou calmodulina, e um domínio cauda C-terminal apresentando regiões globulares em sua estrutura, que além de ser responsável pela dimerização da molécula parece interagir com a carga a ser transportada [23;29]. Em vertebrados, miosina V está subdividida em três subclasses: miosina Va presente em cérebro, Vb presente em tecido epitelial e cérebro, e Vc presente em tecidos glandulares e epiteliais como pâncreas, próstata e fígado [41;42;43;44]. Estudos mostram que miosina V é uma molécula processiva (caminha, similar a um bípede) que realiza movimento sobre um único filamento de actina em direção a superfície celular [45;46;47]. Miosina V apresenta

importância fisiológica em virtude de estar implicada em algumas doenças, como na síndrome de Griscelli, em que se faz necessário o transporte de estruturas membranosas [41;43;44;48], sendo que em mamíferos tem-se evidenciado a presença de Miosina V no transporte de melanossomos, organelas e vesículas [41;43;44].

Miosina VI foi primeiro identificada em *Drosophila melanogaster* [49] e posteriormente identificada também em mamíferos [50]. Os filamentos de actina, assim como os microtúbulos, são polarizados no sentido de sua polimerização, com uma extremidade mais (+) voltada para a periferia celular, e uma extremidade menos (-) voltada para o centro celular [51;52;53]. Miosina VI é a única miosina atualmente conhecida que se move em direção à extremidade (-) do filamento de actina [51;52;53]. Em SDS-PAGE miosina VI apresenta uma Mr em torno de 120 kDa [54]. A estrutura da miosina VI tem sido sugerida baseando-se na seqüência de aminoácidos e está dividida em três domínios funcionais: cabeça, pescoço e cauda. O domínio cabeça possui os sítios ligantes de ATP e actina, o domínio pescoço possui um único motivo IQ ligante de cadeias leves ou calmodulina [23;24;51]. O domínio cauda possui uma região globular na porção terminal, sugerindo a princípio estar envolvido na dimerização da molécula [23;51]. Contudo estudos recentes sugerem que a molécula de miosina VI não forme dímero [24]. A identificação de miosina VI em vários tecidos trouxe a perspectiva de sua importância fisiológica. Foi primeiro identificado que uma mutação no gene da miosina VI causava disfunção auditiva [55;56], encontrando-se posteriormente miosina VI no neuroepitélio da cóclea do ouvido interno, sugerindo que ela tenha papel crítico na função mecânica dos estereocílios [56]. Em células de mamíferos, miosina VI tem aparente função no transporte de endossomos manutenção da morfologia e secreção do complexo de Golgi [57].

Durante as últimas décadas, um grande número de miosinas tem sido identificado, a partir da seqüência gênica. O estudo dessas miosinas expressas indica que elas não possuem a habilidade de formar filamentos espessos, mas têm papel crítico em muitas funções contráteis ou de motilidade [23;54]. A

purificação dessas proteínas é uma etapa importante para o conhecimento de suas propriedades bioquímicas. Nosso laboratório tem como linha de pesquisa a purificação e caracterização de ATPases de diferentes tecidos. Temos usado o congelamento de fração solúvel para a precipitação de actomiosina, conforme descrito por Soares Melo [58].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. A.G. Szent-Gyorgyi, The early history of the biochemistry of muscle contraction. *J. Gen. Physiol.*, 123 (2004) 631-641.
- [2]. M.A. Welte, Bidirectional transport along microtubules. *Curr. Biol.*, 14 (2004) 525-537.
- [3]. T. Wittmann, A. Desai, Microtubule cytoskeleton: a new twist at the end. *Curr. Biol.*, 15 (2005) 126-129.
- [4]. C. Simerly, G. Nowak, P. Lanerolle, G. Schatten, Differential expression and functions of cortical myosin IIA and IIB isotipos during meiotic maturation, fertilization, and mitosis in mouse oocytes and embryos. *Mol. Biol. Cell*, 9 (1998) 2509-2525.
- [5]. R. Mallik, S. Gross, Molecular motors: strategies to get along. *Curr. Biol.*, 15 (2004) 971-982.
- [6]. V. Mermall, P. L. Post, M.S. Mooseker, Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic and signal transduction. *Science*, 279 (1998) 527-533.
- [7]. N. Hirokawa, Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*, 279 (1998) 519-526.
- [8]. R.D. Vale, Millennial musings on molecular motors. *Trends Cell Biol.*, 9 (1999) M38-M42.

- [9]. T. Hasson, M.S. Mooseker, Vertebrate unconventional myosins. *J Biol. Chem.*, 271 (1996) 16431-16434.
- [10]. A. Endows, M.A. Titus, Genetic approaches to molecular molecular motors. *Ann. Rev. Inc.*, 8 (1992) 29-65.
- [11]. R.B. Vallee, J.C. Williams, D. Varma, L.E Barnhart, Dynein: an ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J. Neur.*, 58 (2004) 189-200.
- [12]. K.K. Pfister, E.M.C. Fisher, I.R. Gibbons, T.S. Hays, E.L.F. Holzbaur, J.R. McIntosh, M.E. Poter, T.A. Schroer, K.T. Vaughan, G.B. Witman, S.M. King, R.B. Vallee, Cytoplasmic dynein nomenclature. *J Cell Biol.*, 171 (2005) 411-413.
- [13]. B.M. Paschal, H.S. Shpetner, R.B. Vallee, MAP1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J. Cell Biol.*, 105 (1987) 1273-1282.
- [14]. E.L. Holzbaur, R.B. Vallee, Dyneins: molecular structure and cellular function. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 10 (1994) 339-372.
- [15]. A. Kashina, V. Rodionov, Intracellular organelle transport: few motors, many signals. *Trends Cell Biol.*, 15 (2005) 396-398.
- [16]. A. Yildiz, P. Selvin, Kinesin: walking, crawling or sliding along?. *Trends Cell Biol.*, 15 (2005) 112-120.
- [17]. R. Mallik¹, B.C. Carter, S.A. Lex, S.J. King, S.P. Gross, Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load. *Nature*, 427 (2004) 649-652.

- [18]. S. Ma, R.L. Chisholm, Cytoplasmic dynein-associated structures move bidirectionally in vivo. *J Cell Science*, 115 (2002) 1453-1460.
- [19]. L.S.B. Goldstein, The kinesin superfamily: tails of functional redundancy. *Trend. Cell. Biol.*, 1 (1991) 93-98.
- [20] R.D. Vale, T.S. Reese, M.P. Sheetz, Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell*, 42 (1985) 39-50.
- [21]. N. Hirokawa, Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*, 279 (1998) 519-526.
- [22]. E.P. Sablin, Kinesins and microtubules: their structures and motor mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12 (2000) 35-41.
- [23]. M. Krendel, M.S. Mooseker, Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiol.*, 20 (2005) 239-251.
- [24]. I. Lister, S. Schmitz, M. Walker, J. Trinick, F. Buss, C. Veigel, J. Kendrick-Jones, A monomeric myosin VI with a large working stroke, *EMBO J.*, 23 (2004) 1729-1738.
- [25]. J. R. Sellers, Myosins: a diverse superfamily. *Bioch. Biophys. Acta*, 1496 (2000) 3-22.
- [26]. M.A. Titus, Unconventional myosins: new frontiers in actin-based motors. *Trends Cell Biol.*, 7 (1997) 119-123.
- [27]. R.E. Ostlund, Jr, J.T. Leung, D.M. Kipnis, Myosins of secretory tissues. *J. Cell Biol.*, 77 (1978) 827-836.

- [28]. F.S. Espíndola, E.M. Espreafico, M.V. Coelho, A.R. Martins, F.R.C. Costa, M.S. Mooseker, R.E. Larson, Biochemical and Immunological Characterization of p190-Calmodulin Complex from Vertebrate Brain: A Novel Calmodulin-binding Myosin. *J. Cell Biol.*, 118 (1992) 359-368.
- [29]. R.E. Cheney, M.K. O'shea, J.E. Heuser, M.V. Coelho, J.S. Wolenski, E.M. Espreafico, J. Forscher, R.E. Larson, M.S. Mooseker, Brain Myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell*, 75 (1993) 13-23.
- [30]. T.D. Pollard, E.D. Korn, *Acanthamoeba* myosin. I. Isolation from *Acanthamoeba castellanii* of an enzyme similar to muscle myosin. *J Biol. Chem.*, 248 (1973) 4682-4690.
- [31]. L.M. Coluccio, Myosin I. *Am. J. Physiol.*, 273 (1997) C347-359.
- [32]. H. Maruta, E. Korn, *Acanthamoeba* myosin II. *J Biol. Chem.*, 252 (1977) 6501-6509.
- [33]. L. Gonzalez-Malerva, M. Cruz-Rivera, O. Reynoso-Ducoing, C. Retamal, A. Flisser, J.R. Ambrosio, Muscular myosin isoforms of *Taenia solium* (Cestoda). *Cell Biol. Intern.*, 28 (2004) 885-894.
- [34]. L.M. Coluccio, Differential calmodulin binding to three myosin-1 isoforms from liver. *J Cell Sci.*, 107 (1994) 2279-2284.
- [35]. M.F. Balish, E. F. Moeller III, L. M. Coluccio, Overlapping distribution of the 130 and 110 kDa myosin I isoforms on rat liver membranes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 370 (1999) 285-293.

- [36]. K.A. Conzelman, M.S. Mooseker, The 110-kd protein-calmodulin complex of the intestinal microvillus is an actin-activated Mgatpase. *J. Cell Biol.*, 105 (1987) 313-324.
- [37]. X.S. Wu, K. Rao, H. Zhang, F. Wang, J.R. Sellers, L.E. Matesic, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, J.A. III. Hammer, Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat. Cell Biol.*, 4 (2002) 271-277.
- [38]. M.S. Mooseker, K.A. Conzelman, T.R. Coleman, J.E. Heuser, M.P. Sheetz, Characterization of Intestinal Microvillar Membrane Disks: Detergent-resistant Membrane Sheets Enriched in Associated Brush Border Myosin I (110K-Calmodulin). *J. Cell Biol.*, 109 (1989) 1159-1161.
- [39]. E.M. Espreafico, R.E. Cheney, M. Matteoli, A.A.C. Nascimento, P.V. De Camilli, R.E. Larson, M.S. Mooseker. Primary structure and cellular localization of chicken Brain Myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J. Cell Biol.*, 119 (1992) 1541-1557.
- [40]. R.E. Larson, F.S. Espindola, E.M. Espreafico, Calmodulin-binding proteins and calcium/calmodulin regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. *J. Neuro.*, 54 (1990) 1289-1294.
- [41]. A.A.C. Nascimento, R.G. Amaral, J.C.S. Bizario, R.E. Larson, E.M. Espreafico, Subcellular Localization of Myosin-V in the B16 Melanoma Cells, a Wild-type Cell Line for the dilute Gene. *Mol. Biol. Cell*, 8 (1997) 1971-1988.
- [42]. O.C. Rodriguez, R.E. Cheney, Human myosin-Vc is a novel class V myosin expressed in epithelial cells. *J Cell Sci.*, 115 (2002) 991-1004.

- [43]. L.A. Lapierre, R. Kumar, C.M. Hales, J. Navarre, S.G. Bhartur, J.O. Burnette, D.W. Provance JR., J. A. Mercer, M. Bahler, J. R. Goldenring, Myosin Vb Is Associated with Plasma Membrane Recycling Systems. *Mol. Biol. Cell*, 12 (2001) 1843–1857.
- [44]. P.C. Bridgman, Myosin-dependent transport in neurons. *J. Neur.*, 58 (2004) 164-174.
- [45]. C. Veigel, F. Wang, M.L. Bartoo, J.R. Sellers, J.E. Molloy, the gated gait of the processive molecular motor, myosin V. *Nat. Cell Biol.*, 4 (2002) 59-65.
- [46]. A. Vilfan, Elastic Lever-Arm Model for Myosin V. *Biophys. J.*, 88 (2005) 3792-3805.
- [47]. A.E.M. Clemen, M. Vilfan, J. Jaud, J. Zhang, M. Barmann, M. Rief, Force-dependent stepping kinetics of myosin V. *Biophys. J.*, 88 (2005) 4402-4410.
- [48]. G. Menasche, C.H. Ho, O. Sanal, J. Feldmann, I. Tezcan, F. Ersoy, A. Houdusse, A. Fischer, G.S. Basile, Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (GS3) or a MYO5A F-exon deletion (GS1). *J. Clin. Invest.*, 112 (2003) 450-456.
- [49]. K.A. Kellerman, K.G. Miller, An unconventional myosin heavy chain gene from *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.*, 119 (1992) 823-834.
- [50]. T. Hasson, M.S. Mooseker, Porcine myosin-VI: characterization of a new mammalian unconventional myosin. *J. Cell Biol.*, 127 (1994) 425-440.
- [51]. A.L. Wells, A.W. Lin, L. Chen, D. Safer, S.M. Cain, T. Hasson, B.O. Carragher, R.A. Milligan, H. Lee Sweeney, Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature*, 401 (1999) 505-508.

- [52]. E.M. De La Cruz, E.M. Ostap, H.L. Sweeney, Kinetic mechanism and regulation of myosin VI. *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 32373-32381.
- [53]. T. Hasson, Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *J. Cell Sci.*, 116 (2003) 3453-3461.
- [54]. M. Yoshimura, K. Homma, J. Saito, A. Inoue, R. Ikebe, M. Ikebe, Dual regulation of mammalian myosin VI motor function. *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 39600-39607.
- [55]. K.B. Avraham, T. Hasson, T. Sobe, B. Balsara, J.R. Testa, A.B. Skvorak, C.C. Morton, N.G. Copeland, N.A. Jenkins. Characterization of unconventional MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice. *Hum. Mol. Genet.*, 6 (1997) 1225-1231
- [56]. T. Hasson, P.G. Gillespie, J.A. Garcia, R.B. Macdonald, Y. Zhao,; A.G. Yee, M.S. Mooseker, D.P. Corey, Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *J. Cell Biol.*, 137 (1997) 1287-1307.
- [57]. C.L. Warner, A. Stewart, J.P. Luzio, K.P. Steel, R.T. Libby, J. Kendrick-Jones, F. Buss, Loss of myosin VI reduces secretion and the size of the Golgi in fibroblasts from Snell's waltzer mice. *EMBO J.*, 22 (2003) 569-579.
- [58]. H.C. Soares Melo, Caracterização de atividade ATPásica de miosina V de cérebro de rato obtida por congelamento. 2003. 67 f. Dissertação (mestrado em Genética e Bioquímica). Instituto de Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.

CAPÍTULO I

PURIFICAÇÃO DE MIOSINA II DE TESTÍCULO DE RATO

Abstract

Actomyosin from rat testis was obtained by freezing the soluble fraction and myosin II was isolated from this actomyosin. Testis was homogenized in a buffer extract, centrifuged, and the 40,000g x 40' supernatant frozen at -20°C for 48 hours. The supernatant was thawed at 4°C, centrifuged at 45,000g x 45' and the precipitate washed twice with imidazole buffer (pH 7.0 and 9.0, respectively). The resulting precipitate was enriched in 3 polypeptides: p205, p43 and one that migrated together with the front of the gel. These polypeptides were solubilized in pH 10.8 buffer at 27°C. When isolated in a Sephacryl S-400 column, p205 co-sedimented with F-actin in the absence, but not in the presence, of ATP and was marked with anti-myosin II. Although the testis preparation expressed low K/EDTA-ATPase activity, a similar preparation obtained from skeletal muscle exhibited high K/EDTA-ATPase activity. In this study, myosin II was isolated from an actomyosin preparation obtained by freezing the soluble fraction of testis.

Keywords: myosin II, purification, testis, rat.

Resumo

Actomiosina de testículo de rato foi obtida através do congelamento de fração solúvel e miosina II foi isolada a partir dessa actomiosina. Testículos foram homogeneizados em tampão de extração, centrifugado e o sobrenadante 40.000g x 40' foi congelado a -20°C por 48 horas. O sobrenadante foi descongelado a 4°C, centrifugado a 45.000g x 45' e o precipitado foi lavado duas vezes com tampão imidazol (pH 7,0 e 9,0, respectivamente). O precipitado resultante é enriquecido em três polipeptídeos: p205, p43 e um que migra junto com a frente do gel. Esses polipeptídeos foram solubilizados em tampão pH 10,8 a 27°C. O p205, isolado em Sephacryl S-400, co-sedimenta com F-actina na ausência, mas não na presença, de ATP e foi marcado com anti-miosina II. Embora a preparação de testículo, praticamente, não expressou atividade K/EDTA-ATPásica, uma preparação similar obtida a partir de músculo esquelético apresentou alta atividade K/EDTA-ATPásica. Nesse trabalho, miosina II foi isolada a partir de uma preparação de actomiosina obtida pelo congelamento de fração solúvel de testículo.

Palavras chaves: miosina II, purificação, testículo, rato.

Introdução

Miosina é uma família de proteínas motoras envolvida em movimento ao longo de filamentos de actina e que apresenta papel fundamental na motilidade celular [1]. Atualmente, 20 classes de miosinas já foram identificadas [2]. A miosina clássica de músculo pertence à classe II e é referida como miosina convencional, enquanto as demais são referidas como miosinas não convencionais [2;3]. A miosina II é constituída por duas cadeias polipeptídicas em torno de 200 kDa (cadeias pesadas) caracterizadas por apresentar um domínio motor na extremidade N-terminal, onde encontram-se o sítio de ligação a ATP e o sítio de interação aos microfilamentos, um domínio C-terminal responsável pela dimerização das cadeias pesadas e, entre esses dois domínios, um domínio constituído por dois motivos IQ, onde se ligam as cadeias leves [1]. Semelhante a miosina II, algumas miosinas não convencionais, como a miosina V, são constituídas por duas cadeias pesadas [4], enquanto outras como as da classe I são constituídas por apenas uma cadeia pesada [5].

Miosina II, juntamente com a actina, são as proteínas responsáveis pela contração muscular, contudo isoformas de miosina II são encontradas em células não musculares e participa de vários processos como migração cromossômica durante a mitose e transporte de vesículas [6]. Em tecidos não musculares de vertebrados foram identificadas três isoformas de miosina II: miosina II-A, II-B e II-C [7;8;9;10]. Homogeneizado de testículo possui um polipeptídeo de 200 kDa, que é reconhecido por um anticorpo específico para a isoforma de miosina II-B em Western blot [10]. Anticorpos específicos para as isoformas de miosina II-A ou II-C não apresentaram reação cruzada com qualquer polipeptídeo nesse homogeneizado, embora exista mRNA para a isoforma de miosina II-C nesse tecido [10].

A purificação de miosinas a partir de diferentes tecidos é importante para suas caracterizações estrutural e funcional. Actomiosina é precipitada a partir de

fração solúvel de cérebro tanto em baixa como em alta força iônica e esse processo de precipitação constitui um passo importante para purificar e caracterizar miosina II e V a partir de fração solúvel de cérebro [11;12;13;14]. A miosina II é precipitada, preferencialmente, quando fração solúvel de cérebro é dializada contra tampão de baixa força iônica [11], enquanto a miosina V é precipitada seletivamente, quando fração solúvel de cérebro é tratada com alta concentração de sal [4;13]. Essa precipitação de miosina (II e V) é postulada por resultar de sua interação com actina e vesículas [15]. Nesse trabalho, isolamos miosina II de testículo a partir de actomiosina obtida pelo congelamento de fração solúvel de testículo de rato.

Material e Métodos

Purificação de miosina II de Testículo de Rato: Ratos Wistar adultos foram anestesiados com éter etílico e imediatamente sacrificados por deslocamento cervical. Os testículos foram removidos, lavados em solução gelada de KCl 150 mM, cortados com tesoura metálica e homogeneizados (1g de testículo/mL) em tampão de extração (Imidazol-HCl 50 mM pH 7,0, EGTA 10 mM, EDTA 10 mM, sacarose 250 mM, benzamidina 1,0 mM e DTT 1,0 mM) usando homogeneizador de vidro tipo potter. Todo o procedimento de homogeneização foi feito em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 40.000g x 40' e o sobrenadante (S1) foi recuperado e congelado a -20°C por pelo menos 48 horas, para a precipitação de actomiosina. Após esse período, a fração S1 foi descongelada a 4°C e centrifugada a 45.000g x 40'. A fração precipitada (P2) é enriquecida em actomiosina e foi utilizado como fonte para purificar miosina II de testículo de rato. A fração P2 foi ressuspensa em tampão de lavagem (Imidazol-HCl 20 mM pH 7,0, EDTA 1,0 mM, EGTA 1,0 mM, benzamidina 0,1 mM e DTT 0,1 mM) e centrifugado a 45.000g x 40'. A fração P3 foi homogeneizada em tampão de lavagem pH 9,0 e imediatamente centrifugada a 45.000g x 40'. Até esta fase, foram utilizadas soluções geladas, as homogeneizações foram feitas em banho de gelo e as centrifugações foram

realizadas a 4°C. A fração P4 foi homogeneizada em solução de solubilização (Imidazol-HCl 20 mM pH 10,8, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, benzamidina 0,1 mM e DTT 0,1 mM) a 27°C usando homogeneizador de vidro tipo potter e centrifugada a 45.000g x 40. O sobrenadante (fração S5) foi aplicada em coluna (1,5 x 50 cm, 89 mL) de Sephacryl S-400, previamente equilibrada com solução de solubilização. A coluna foi eluída com essa solução e foram coletadas frações de 2 mL. O fluxo da coluna foi de 0,3 mL/minuto e todo o processo foi conduzido a 27°C.

Ensaio de sedimentação com actina: O ensaio de co-sedimentação foi realizado em baixa velocidade de centrifugação, como descrito por Pollard e Cooper [16]. No ensaio, foram usadas 250 µg do polipeptídeo de alto peso molecular isolado na coluna de Sephacryl S-400 (frações 11 a 13) e 250 µM de actina filamentar purificada de músculo de coelho. O ensaio foi realizado na presença ou ausência de ATP 2 mM. O polipeptídeo foi incubado por 15 minutos, em banho de gelo, com filamentos de actina e, então, centrifugada a 15.000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o precipitado foi homogeneizado em 0,5 mL de tampão imidazol 20 mM pH 7,0, EDTA 1,0 mM, EGTA 1,0 mM, benzamidina 0,1 mM e DTT 0,1 mM.

Atividade ATPase: A atividade ATPásica foi determinada pela medida do fosfato inorgânico liberado do ATP usando o método de Heinonen e Lathi [17]. A reação foi realizada a 37°C e o volume final foi de 200 µL. A atividade Mg-ATPásica foi ensaiada em tampão imidazol 25 mM pH 7,5, EDTA 1,0 mM, DTT 1,0 mM, KCl 60 mM, MgCl₂ 4,0 mM e ATP 1,0 mM. A atividade K/EDTA-ATPásica foi ensaiada em tampão imidazol 25 mM pH 7,5, EDTA 1,0 mM, DTT 1,0 mM e ATP 1,0 mM, com 60 ou 600 mM de KCl. As reações foram iniciadas com a adição de ATP e interrompidas com a adição da solução de dosagem de Pi.

Outros métodos: O perfil eletroforético dos polipeptídeos foi obtido através de SDS-PAGE [18] usando mini géis e gradiente de 5 a 22 % [19]. O Western blot foi realizado conforme descrito por Towbin et al [20]. Anticorpo policlonal contra cadeia pesada de miosina-II de cérebro de rato foi gerado em coelho e o anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina foi obtido da SIGMA. O immunoblotting foi revelado com NBT/BCIP. Proteínas foram dosadas pelo método de Bradford [21].

Resultados e Discussão

O congelamento do sobrenadante 40.000g x 40 minutos (S1) de testículo de rato causa a precipitação de vários polipeptídeos (Fig. 1). Os polipeptídeos de aproximadamente 205 (p205) e 43 (p43) kDa presentes na fração S1 aparecem predominantemente na fração precipitada, enquanto os demais polipeptídeos estão divididos entre o precipitado e o sobrenadante. Esses polipeptídeos, com exceção de um de baixo peso molecular (migra junto com a frente do gel), praticamente desaparecem da fração precipitada após o procedimento de lavagem desta fração (Fig. 1). Observa-se, também, que o p205, praticamente, não é solubilizado durante esse procedimento de lavagem, mas p43 é parcialmente solubilizado, principalmente, na lavagem com pH 9,0 (Fig. 1). O polipeptídeo de 205 kDa é solubilizado, quando o pH é aumentado para 10,8 e a temperatura é elevada e mantida a 27°C. Nessas condições, o p43 e o polipeptídeo que migra junto com a frente do gel também são solubilizados (Fig. 1). O aumento da temperatura é importante para a solubilização de p205 e, mesmo em pH 7,0, esse polipeptídeo é parcialmente solubilizado, quando a temperatura é elevada para 27°C (dados não mostrados). Portanto, é fundamental que durante todo o processo de lavagem dos precipitados, a temperatura seja mantida abaixo de 4°C, para evitar a solubilização precoce de p205.

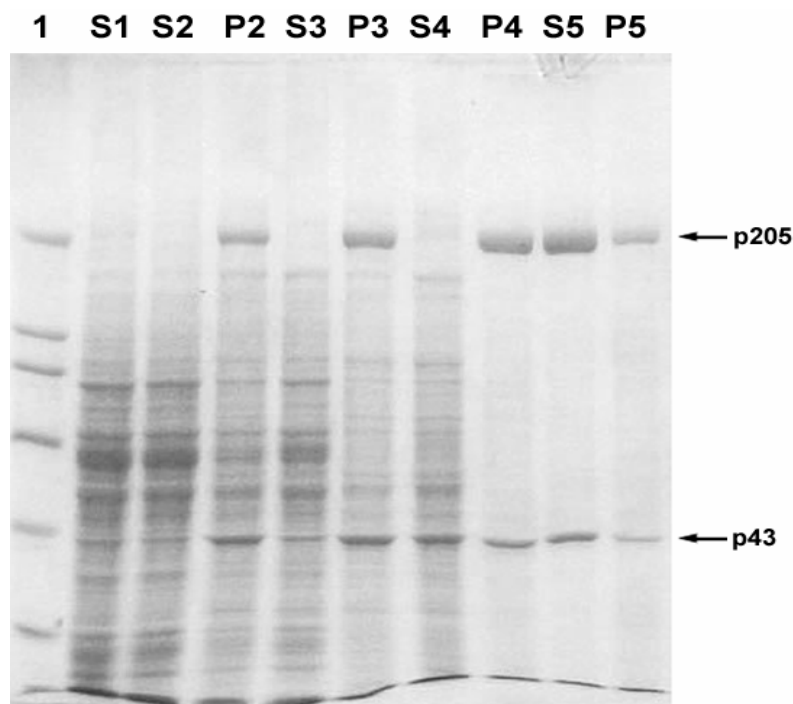


Figura 1 – SDS-PAGE da preparação de p205 de testículo de rato. As frações S1, S2, S4 e P3 (7,0 µg); P2, S3, P4 e S5 (8,0 µg) e P5 (4,0 µg) foram analisadas em gel gradiente 5 a 22 % e o gel foi corado com Commassie Blue R-250. **Linha 1**-marcadores de massa molecular: cadeia pesada de miosina (205 kDa), β-galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). O p205 e p43 estão indicados à direita.

Os principais polipeptídeos da fração P4, p205 e p43, apresentam Mr em SDS-PAGE similares, respectivamente, à cadeia pesada de miosina (II ou V) e actina. No intuito de melhor caracterizar p205, a fração S5 foi aplicada em coluna de Sephacryl S-400 e o polipeptídeo de aproximadamente 205 kDa foi isolado (Fig. 2). Embora não esteja claro na figura 2, o polipeptídeo de baixo peso molecular não foi eluído junto com p205. A análise do gel indica sua co-eluição com actina e, portanto, sugere que esse polipeptídeo não está relacionado com p205. Os polipeptídeos das frações S1 e S5 e o polipeptídeo p205 isolado em coluna de Sephacryl S-400 foram separadas em SDS-PAGE, transferidos (Western blot) para papel de nitrocelulose e sondados com um

anticorpo gerado contra cadeia pesada de miosina II de cérebro. Observa-se pela figura 3 que o polipeptídeo de 205 é reconhecido por esse anticorpo. Observa-se, também, que esse anticorpo não reconhece outros polipeptídeos, pois embora a fração S1 possua diferentes tipos de polipeptídeos apenas o de 205 kDa é reconhecido por ele (Fig. 3). Incubamos p205, também, com anticorpo específico para miosina V, mas não foi detectada nenhuma marcação (dados não mostrados). Essa falta de marcação, provavelmente, se deve a ausência ou baixa concentração de miosina V em testículo [12], pois a fração P4 obtida a partir de cérebro de rato pelo mesmo procedimento descrito nesse trabalho, possui um polipeptídeo de aproximadamente 200 kDa que reage com anti-miosina V (dados não mostrados).



Figura 2 – Purificação de p205 em coluna de Sephacryl S-400. A fração S5 foi aplicada em coluna de Sephacryl S-400 e foram coletadas frações de 2 mL da coluna. A fração S5 (5 µg) e as frações 09 a 20 (10 µL) foram analisadas em gel gradiente 5 a 22 % e o gel foi corado com Comassie Blue R-250. **Linha 1-** marcadores de massa molecular: cadeia pesada de miosina (205 kDa), β-galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). O p205 e p43 estão indicados à direita.

Uma característica das miosinas é sua co-sedimentação com F-actina na ausência de ATP [16]. A figura 4 mostra que p205 co-sedimenta com F-actina, quando esse polipeptídeo é incubado com F-actina na ausência de ATP, mas não quando a incubação é realizada na presença de ATP. Na ausência de F-actina, não ocorre sedimentação de p205, quer na presença ou ausência de ATP (Fig. 4). Uma outra característica das miosinas é sua atividade ATPásica na ausência de cátions divalentes e presença de alta concentração de potássio, atividade K/EDTA-ATPásica. A fração P4 de testículo de rato apresenta baixa atividade K/EDTA-ATPásica (Fig. 5). Embora a atividade ATPásica das miosinas seja considerada sensível ao congelamento, a baixa atividade K/EDTA-ATPásica observada nesse trabalho parece ser uma característica de miosina de testículo, pois uma fração P4 de músculo esquelético, obtida pelo método de congelamento descrito nesse trabalho, apresenta alta atividade K/EDTA-ATPásica (Fig. 5). Um dado que corrobora a baixa atividade K/EDTA-ATPásica de miosina de testículo é a ausência dessa atividade na fração S1 (sobrenadante 40.000g x 40 minutos) obtida a partir de testículos frescos (dados não mostrados). Nesse ensaio nem os testículos e nem a fração S1 foram congelados. Sabe-se também que membros da família das miosinas de diferentes tecidos apresentam baixa ou mesmo ausência de atividade K/EDTA-ATPásica [21]. Portanto, a ausência de atividade K/EDTA-ATPásica na fração P4 de testículo não implica que o p205 não seja membro da família das miosinas, pois a marcação com anticorpo específico para miosina II e o ensaio de co-sedimentação com actina sugerem fortemente que o p205 pertença a família das miosinas.

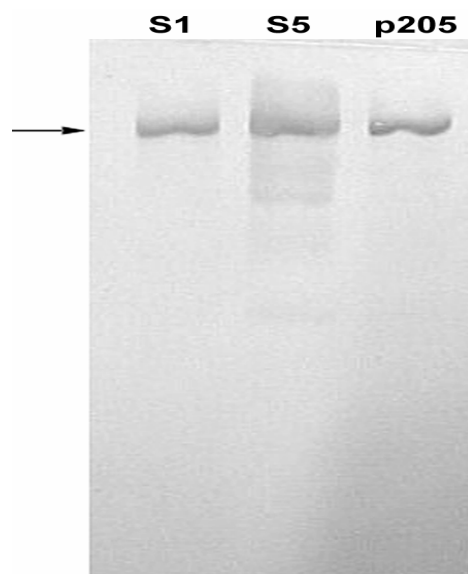


Figura 3 – O p205 é reconhecido por um anticorpo específico para miosina II. O Western blotting das frações S1, S5 e de p205 (frações 11 a 13 da coluna de Sephacryl) foi incubado com um anticorpo policlonal específico para miosina II. A seta a esquerda destaca a mobilidade da cadeia pesada de miosina II.

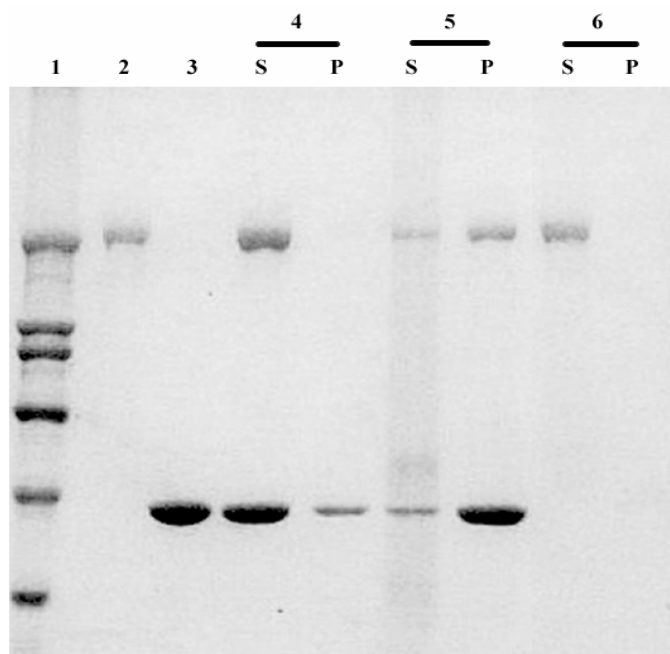


Figura 4 – O p205 co-sedimenta com actina em uma maneira dependente de ATP. O ensaio de co-sedimentação com F-actina foi realizado a baixa velocidade de centrifugação e as frações foram analisadas em SDS-PAGE. **S** e **P** indicam, respectivamente, o sobrenadante e o precipitado de cada ensaio. **Linha 2:** p205 purificado em coluna de Sephacryl S-400 (frações 11 a 13); **linha 3:** F-actina de músculo purificada; **linha 4:** F-actina mais p205 na presença de ATP; **linha 5:** F-actina mais p205 na ausência de ATP; **linha 6:** p205 na ausência de ATP. **Linha 1** indica os marcadores de massa molecular.

Assim, podemos referir o p205 como miosina II de testículo e, como apenas a isoforma B de miosina II foi detectada nesse tecido [10], provavelmente, o polipeptídeo isolado nesse trabalho seja da isoforma B de miosina II. A preparação de actomiosina obtida pelo congelamento de fração solúvel de testículo é semelhante à preparação de actomiosina de cérebro obtida em baixa força iônica, onde predomina miosina II em relação à miosina V [11;12]. No caso de testículo, isto parece ser devido à ausência ou a baixa concentração de miosina V nesse tecido [12].

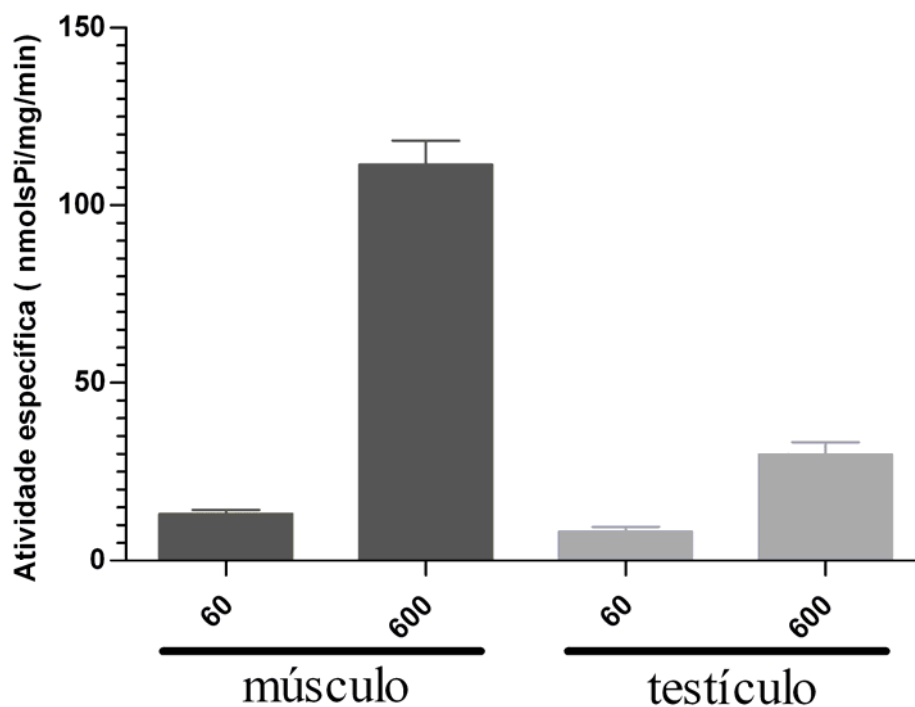


Figura. 5 – Atividade K/EDTA-ATPásica da fração P4 de testículo e músculo esquelético. As frações P4 (37 µg) de músculo esquelético de rato e P4 (34 µg) de testículo de rato foram incubadas por 10 minutos a 37°C em meio de reação contendo Imidazol-HCl 25 mM pH 7,5; EDTA 1 mM, DTT 1 mM e KCl 60 ou 600 mM conforme indicado. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM e interrompida com a adição de solução de dosagem. Os resultados representam a média de três experimentos.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Foued S. Espíndola (Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil), a Dra. Enilza M. Espreafico e Dr. Roy E. Larson (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), que gentilmente forneceram os anticorpos policlonais anti-miosina II e V. Nós também agradecemos a Dra. Verônica S. Pinto (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) por fornecer F-actina. Este estudo recebeu apoio da FAPEMIG e CNPq. D. S. D. recebeu bolsa de estudo fornecida pelo CNPq.

Referências Bibliográficas

- [1]. J.R. Sellers, Myosins: a diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta*, 1496 (2000) 3-22.
- [2]. M. Krendel, M.S. Mooseker, Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiol.*, 20 (2005) 239-251.
- [3]. J.S. Berg, B.C. Powell, R.E. Cheney, A millennial myosins census. *Mol. Biol. Cell*, 12 (2001) 780-794.
- [4]. R.E. Cheney, M.K. O'shea, J.E. Heuser, M.V. Coelho, J.S. Wolenski, E.M. Espreafico, J. Forscher, R.E. Larson, M.S. Mooseker, Brain Myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell*, 75 (1993) 13-23.
- [5]. L.M. Coluccio, Myosin I. *Am. J. Physiol.*, 273 (1997) 347-359.
- [6]. E.M. De La Cruz, E.M. Ostap, Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 (2004) 61-67.
- [7]. R.V. Shohet, M.A. Conti, S Kawamoto, Y.A. Preston, D.A. Brill, R.S. Adelstein, Cloning of the cDNA encoding the myosin heavy chain of a vertebrate cellular myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 86(1989) 7726-30.
- [8]. K. Itoh, R.S. Adelstein, Neuronal Cell Expression of Inserted Isoforms of Vertebrate Nonmuscle Myosin Heavy Chain II-B. *J. Biol. Chem.* Jun., 270 (1995) 14533 – 14540.
- [9]. C.L. Phillips, K. Yamakawa, R.S. Adelstein, Cloning of the cDNA encoding human nonmuscle myosin heavy chain-B and analysis of human tissues

with isoform-specific antibodies. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 16 (1995) 379-89.

- [10]. E. Golomb, Xuefei Ma, S.S. Jana, Y.A. Prestson, S. Kawamoto, N.G. Shoham, E. Goldin, M.A. Conti, J.R. Sellers, R.S. Adelstein, Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 2800-2808.
- [11]. R.E. Larson, F.S. Espindola, E.M. Espreafico, Calmodulin-regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. *J. Neurochem.*, 54 (1990) 1288-1294.
- [12]. F.S. Espíndola, E.M. Espreafico, M.V. Coelho, A.R. Martins, F.R.C. Costa, M.S. Mooseker, R.E. Larson, Biochemical and Immunological Characterization of p190-Calmodulin Complex from Vertebrate Brain: A Novel Calmodulin-binding Myosin. *J. Cell Biol.*, 118 (1992) 359-368.
- [13]. M.V. Coelho, R.E. Larson, Ca²⁺-dependent phosphorylation of the tail domain of myosin-V, a calmodulin-binding myosin in vertebrate brain. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 26 (1993) 465-472.
- [14]. J.A. Ferro, R.E. Larson, Calcium/calmodulin regulation of ATPase activity and endogenous phosphorylation of mammalian brain actomyosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 145 (1987) 1217-1224.
- [15]. R.E. Cheney, Purification and assay of myosin V. *Methods Enzymol.*, 298 (1998) 03-18.
- [16]. T.D. Pollard, J.A. Cooper, Methods to characterize actin filament networks. *Methods enzymol.*, 85 (1982) 211-233.

- [17]. J.K. Heinonen, R.J. Lathi, A New and Convenient Colorimetric Determination of Inorganic Orthophosphate and Its Application to the Assay of Inorganic Pyrophosphatase. *Anal. Biochem.*, 113 (1981) 313-317.
- [18]. U.K Laemmli, M. Favre, Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.*, 80 (1973) 575-599.
- [19]. F.W. Studier, Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slabgels. *J. Mol. Biol.*, 79 (1973) 237-48.
- [20]. H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 (1979) 4350-4354.
- [21]. M.M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72 (1976) 248-254.
- [22]. R.E. Ostlund, J.T. Leung, D.M. Kipnis, Myosins of secretory tissues. *J. Cell Biol.*, 77 (1978) 827-836.

CAPÍTULO II

PRECIPITAÇÃO DE ACTOMIOSINA DE CÉREBRO DE VERTEBRADOS POR CONGELAMENTO DE FRAÇÃO SOLÚVEL

Abstract

Actomyosin from swine, bovine and chicks brain was obtained by freezing the soluble fraction and myosin II and V was precipitate together, and myosin II from swine brain was partially isolated from this actomyosin. Brain was homogenized in a buffer extract, centrifuged, and the 40,000g x 40' supernatant frozen at -20°C for 48 hours. The supernatant was thawed at 4°C, centrifuged at 45.000g x 45' and the precipitate washed twice with imidazole buffer (pH 7.0 and 10.0, respectively). The resulting precipitate was enriched in 3 polypeptides: p205, p53, p43 and own high Mg^{2+} -ATPase activity. These polypeptides were solubilized in pH 10.2 buffer at 27°C, with addition of ATP, Mg and NaCl. The p205 from swine brain was partially isolated in a Sephacryl S-500 column. This polypeptide of 205 kDa was marked with antibody anti-myosin II and V. Although the brain preparation expressed low K/EDTA-ATPase activity, we observed Co^{2+} -ATPase activity and a stimulation of the Mg^{2+} -ATPase activity by Tween 20. In this study, showed a precipitation together of myosin II and V, and partially isolated this myosin from swine brain from actomyosin preparation obtained by freezing the soluble fraction of brain.

Keywords: myosin, ATPase, brain, vertebrate.

Resumo

Actomiosina de cérebro de suíno, bovino e pintainho foi obtida através do congelamento de fração solúvel e miosina II e V foram precipitadas conjuntamente, sendo que miosina de cérebro de suíno foi parcialmente isolada a partir dessa actomiosina. Os cérebros foram homogeneizados em tampão de extração, centrifugado e o sobrenadante 40.000g x 40' foi congelado a -20°C por 48 horas. O sobrenadante foi descongelado a 4°C, centrifugado a 45.000g x 45' e o precipitado foi lavado duas vezes com tampão imidazol (pH 7,0 e 10, respectivamente). O precipitado resultante é enriquecido em três polipeptídeos: p205, p53, p43 e possui alta atividade Mg^{2+} -ATPase. Esses polipeptídeos foram solubilizados em tampão pH 10,2 a 27°C, com adição de ATP, Mg e NaCl. O p205 de cérebro de suíno foi parcialmente isolado em Sephacryl S-500. Esse polipeptídeo de 205 kDa foi marcado com anticorpos anti-miosina II e V. Embora a preparação de cérebro, praticamente, não expressou atividade K/EDTA-ATPásica, apresentou atividade Co^{2+} -ATPase e uma estimulação da atividade Mg^{2+} -ATPase por Tween 20. Nesse trabalho mostramos a precipitação conjunta de miosina II e V e o isolamento parcial dessas miosinas de cérebro de suíno a partir de uma preparação de actomiosina obtida pelo congelamento de fração solúvel de cérebro.

Palavras chaves: miosina, ATPase, brain, vertebrado.

Introdução

Miosinas são proteínas motoras que translocam sobre filamentos de actina, hidrolisam ATP e têm papel crítico em muitas funções contráteis e de motilidade celular [1]. São, atualmente, agrupadas em 20 classes, baseado na sequência do domínio cabeça [2]. Possuem um domínio motor na extremidade N-terminal altamente conservado e um domínio cauda característico de cada classe na extremidade C-terminal [2]. São ubiquamente distribuídas em todos os organismos eucariotos [2;3]. Muitas das miosinas são conhecidas apenas pelas sequências gênicas [1], e a função celular dessa família é extremamente variável, o que requer especialização estrutural e enzimática [4].

A molécula de miosina II ou miosina convencional foi o primeiro membro da superfamília das miosinas a ser descoberto e tem sido intensamente estudada devido a sua função fundamental na contração muscular [5]. É composta por um par de cadeias pesadas com cerca de 200 kDa e dois pares de cadeias leves [6]. Embora seja a principal proteína motora envolvida na contração muscular, outros membros dessa classe foram isolados em células não musculares [6;7]. Em células eucarióticas, miosina II tem sido relacionada em diversos processos celulares como citocinese, divisão e crescimento celular [8].

Miosina V tem sido bem caracterizada em vários organismos como levedura, camundongo, galinha e lula [9;10]. Foi originalmente identificada em cérebro como uma proteína ligante de calmodulina e com atividade Mg^{2+} -ATPase dependente de actina [11;12;13]. É expressa em diferentes tipos celulares e está envolvida no transporte organelas e vesículas [10;14]. Composta por duas cabeças conectadas por um longo domínio de super-hélice de α -hélice e um domínio cauda globular [15]. A região cabeça é composta por um domínio motor globular e um longo domínio pescoço ligante de cadeias leves ou calmodulina [3;15;16].

Preparação de actomiosina é obtida a partir da precipitação de fração solúvel de cérebro tanto em baixa quanto em alta força iônica e esse processo

de precipitação constitui um passo importante para purificar e caracterizar miosinas II e V a partir de fração solúvel de cérebro [12;13;15;17]. A precipitação de miosina II ocorre, preferencialmente, quando a fração solúvel de cérebro é dializada contra tampão de baixa força iônica [12;13], enquanto que, miosina V é precipitada seletivamente quando a fração solúvel de cérebro é tratada com alta força iônica [15;17]. Postula-se que essa precipitação de miosina (II e V) é resultado de sua interação com actina e vesículas [3]. Recentemente temos obtido a precipitação de actomiosina a partir do congelamento de fração solúvel de cérebro de rato [18] ou testículo [19]. Nesse trabalho, mostramos a precipitação de actomiosina por congelamento da fração solúvel de cérebro de suíno, bovino e pintainho.

Material e métodos

Precipitação de miosina de Cérebro. Cérebros de suínos, obtidos em frigorífico, foram lavados em solução de KCl 150 mM e limpos para a retirada de membranas e vasos sanguíneos. Os cérebros foram homogeneizados (na concentração de 2 g/mL) em tampão Imidazol-HCl 50 mM pH 7,0, contendo: EGTA 10 mM, EDTA 10 mM, sacarose 250 mM, benzamidina 1,0 mM e DTT 1,0 mM. Foram homogeneizados usando homogeneizador elétrico de duas rotações ESGE, por um período de 10 minutos. O homogeneizado foi centrifugado a 40.000g x 40' e o sobrenadante (S1) foi recuperado e congelado a - 20°C por pelo menos 48 horas. Após esse período, a fração S1 foi descongelada a 4°C e centrifugada a 45.000g x 40'. A fração precipitada (P2) foi ressuspensa em tampão Imidazol-HCl 20 mM pH 7,0, contendo: EDTA 1,0 mM, EGTA 1,0 mM, benzamidina 0,1 mM, DTT 0,1 mM e glicerol 0,1 % (v/v) e novamente centrifugada a 45.000g x 40'. A fração P3 foi homogeneizada em tampão (CAPS/Imidazol 20 mM, pH 10; EDTA e EGTA 0,1 mM, DTT 1 mM, benzamidina 0,1 mM e glicerol 0,5 % (v/v)) e imediatamente centrifugada a 45.000g x 40'. Até esta fase, foram utilizadas soluções geladas, as homogeneizações foram feitas

em banho de gelo e as centrifugações foram realizadas a 4°C. A fração P4 foi ressuspensa em tampão CAPS/Imidazol 20 mM, pH 10,2; contendo: EDTA e EGTA 0,1 mM, DTT 1 mM, benzamidina 0,1 mM, glicerol 0,5 % (v/v) e foi adicionado na hora NaCl 150 mM, ATP 3 mM, MgCl₂ 2 mM, homogeneizada a 27°C em homogeneizador de vidro tipo potter e centrifugada a 45.000g x 40. O sobrenadante foi recuperado e aplicada em coluna (1,5 x 100 cm, 200 mL) de Sephacryl S-500, previamente, equilibrada com tampão imidazol 20 mM, pH 8,5; EDTA 0,1 mM e DTT 0,1 mM. Foram coletadas frações de 3 mL. O fluxo da coluna foi de 0,3 mL/min. e todo o processo foi conduzido a 27°C. A precipitação de miosina de cérebro de bovino obtido em frigorífico e pintainho obtido em granja foi obtida usando o mesmo procedimento.

Atividade ATPase: A atividade ATPásica foi determinada pela medida do fosfato inorgânico liberado do ATP usando o método de Heinonen e Lathi [20]. A reação foi realizada a 37°C e o volume final foi de 200 µL. A atividade Mg-ATPásica foi ensaiada em tampão imidazol 25 mM pH 7,5, EDTA 1,0 mM, DTT 1,0 mM, KCl 60 mM, MgCl₂ 4,0 mM e ATP 1,0 mM. A atividade K/EDTA-ATPásica foi ensaiada em tampão imidazol 25 mM pH 7,5, EDTA 1,0 mM, DTT 1,0 mM e ATP 1,0 mM, com 60 ou 600 mM de KCl. As reações foram iniciadas com a adição de ATP e interrompidas com a adição da solução de dosagem de Pi.

Outros métodos: O perfil eletroforético dos polipeptídeos foi obtido através de SDS-PAGE [21] usando mini géis e gradiente de 5 a 22 %, e foi usado sistema de placas [22]. O Western blot foi realizado conforme descrito por Towbin et al [23]. Foi usado anticorpo policlonal contra cadeia pesada de miosina-II de cérebro de rato, anticorpo policlonal contra cadeia pesada de miosina V de cérebro de rato gerados em coelho e o anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina foi obtido da SIGMA. O immunoblotting foi revelado com NBT/BCIP. Proteínas foram dosadas pelo método de Bradford [24].

Resultados e discussão

O congelamento de fração solúvel (S1) de cérebro de suino, bovino e pintainho promove a precipitação de vários polipeptídeos, que após lavagem, resulta em uma fração precipitada (P3), que se apresenta enriquecida em três polipeptídeos com Mr em torno de 205, 53 e 43 kDa (Fig. 1). Esse perfil polipeptídico é similar ao obtido por Soares Melo [18] para o congelamento de fração solúvel de cérebro de rato. Pelo mesmo procedimento, usando testículo de rato, tem-se observado a precipitação de três polipeptídeos com Mr em torno de 205 e 43 kDa e um de baixo peso molecular [19; ver capítulo um]. A fração precipitada obtida por Soares Melo [18] possui alta atividade Mg^{2+} -ATPase e atividade Ca^{2+} -ATPase. Característica essa observada para as frações P3 de cérebro de suino (Fig. 2), sendo que a atividade Ca^{2+} -ATPase é cerca de 20 % menor que a Mg^{2+} -ATPase, o que também foi observado por Soares Melo [18] para a fração precipitada de cérebro de rato. As frações P3 de bovino e pintainho também apresentaram atividades Mg^{2+} -ATPase ou Ca^{2+} -ATPase similares (dados não mostrados). As miosinas purificadas têm como uma de suas características atividade ATPase na presença de alta concentração de potássio e ausência de cátions divalentes, atividade K/EDTA-ATPase [7;12;25;26;27]. A fração P3 de cérebro de suino apresentou uma baixa atividade K/EDTA-ATPase (Fig. 2), quando comparada com a atividade K/EDTA-ATPase de miosina II muscular [25;28]. Também foi observada uma atividade K/EDTA-ATPase similar para as frações P3 de bovino e pintainho (dados não mostrados). Baixa atividade K/EDTA-ATPase também foi observada por Soares Melo [18] para a fração precipitada de cérebro de rato. Sabe-se que em vários outros tecidos não musculares que possuem membros da família das miosinas a atividade K/EDTA-ATPase é baixa ou mesmo ausente [28]. Essa baixa atividade K/EDTA-ATPase pode ser uma característica da fração P3 de cérebro, uma vez que precipitado de actomiosina de músculo esquelético obtido sob as mesmas condições apresenta alta atividade K/EDTA-ATPase [19; ver capítulo 1].

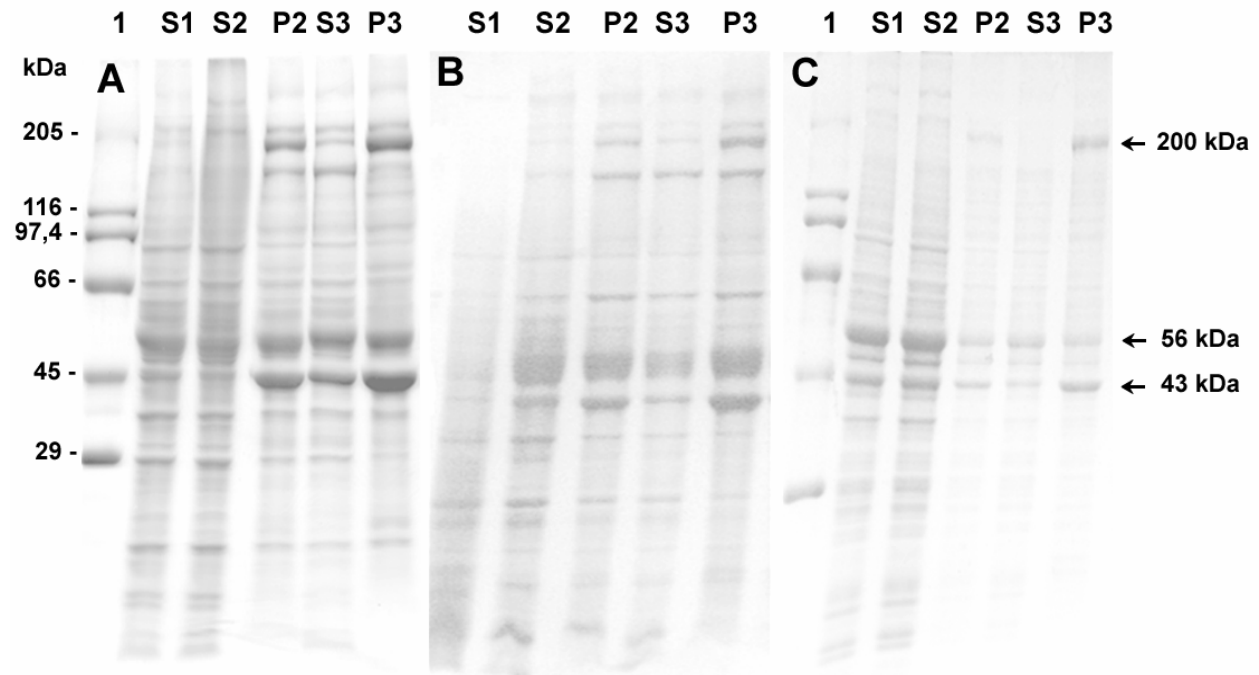


Figura 1. SDS-PAGE da precipitação de actomiosina de cérebro por congelamento.

As frações foram aplicadas em gel gradiente 5-22 % e o gel foi corado com Commassie Blue R-250. **A:** frações de cérebro de suíno: foram aplicados cerca de 10 µg das frações. **B:** frações de cérebro de bovino, foram aplicados cerca de 8 µg das frações. **C:** frações de cérebro de pintainho: foram aplicadas S1 (10 µg), S2 (10 µg), P2 (7 µg), S3 (7 µg) e P3 (8 µg). No alto são indicadas as frações. 1: padrão de massa molecular. Os números à esquerda correspondem ao padrão de massa molecular. À direita estão indicados os principais polipeptídeos observados na fração P3.

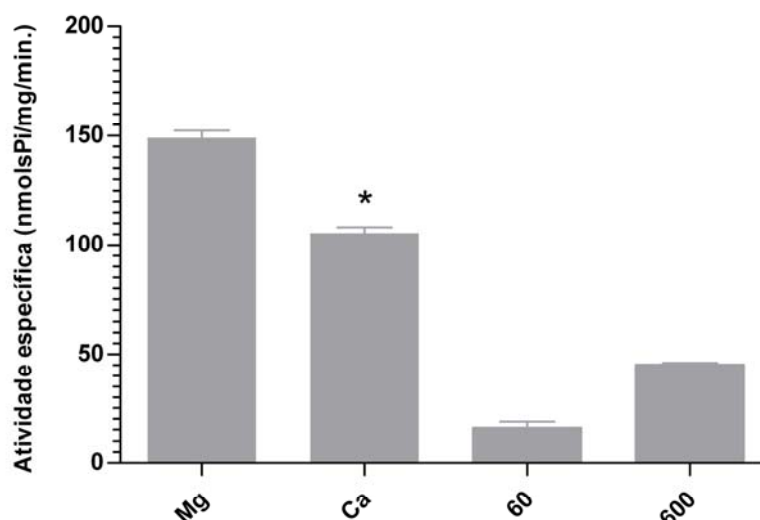


Figura 2. Atividade ATPase da fração P3 de cérebro de porco.

A fração P3 (25 µg) foi incubada por 10 min a 37°C em meio de reação Imidazol-HCl 25 mM pH 7,5; EDTA 1 mM, DTT 1mM, KCl 60 mM, contendo MgCl₂ 4 mM ou CaCl₂ 4 mM, contendo KCl 60 ou 600 mM. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM e interrompida com adição de solução de dosagem. Constitui a média de dois ensaios para experimentos distintos. * Difere significativamente de Mg pelo teste t (P<0,05).

O polipeptídeo de 205 kDa presente na fração precipitada de cérebro de rato, obtido por Soares Melo [18] é reconhecido por anticorpo anti-miosina V [18]. Enquanto que em testículo de rato, o polipeptídeo de 205 kDa é reconhecido por anticorpo anti-miosina II [19; ver capítulo 1]. Nas frações precipitadas de cérebro de suíno, bovino e pintainho, observamos que o polipeptídeo de 205 kDa é reconhecido tanto por anticorpo anti-miosina II como V (Fig. 3). O reconhecimento pelo anticorpo anti-miosina II ou V mostra uma precipitação conjunta dessas miosinas. No intuito de melhor caracterizar os três polipeptídeos, realizamos a solubilização dos mesmos como mostrado na figura 4. Observa-se que, embora o processo de lavagem acarrete uma solubilização parcial do polipeptídeo de 205 kDa, muito dos polipeptídeos de 53 e 43 kDa são removidos, obtendo-se uma fração solúvel final (S5) mais límpida e enriquecida nos polipeptídeos de 205 e 43 kDa (Fig. 4). Usando os mesmos anticorpos

contra miosina II e V, observamos que o polipeptídeo de 205 kDa solubilizado na fração S5 é reconhecido pelos anticorpos anti-miosina II ou V (Fig. 5), os anticorpos mostraram-se específicos, uma vez que, embora a fração S1 contenha vários outros polipeptídeos, apenas o polipeptídeo de 205 kDa foi reconhecido.

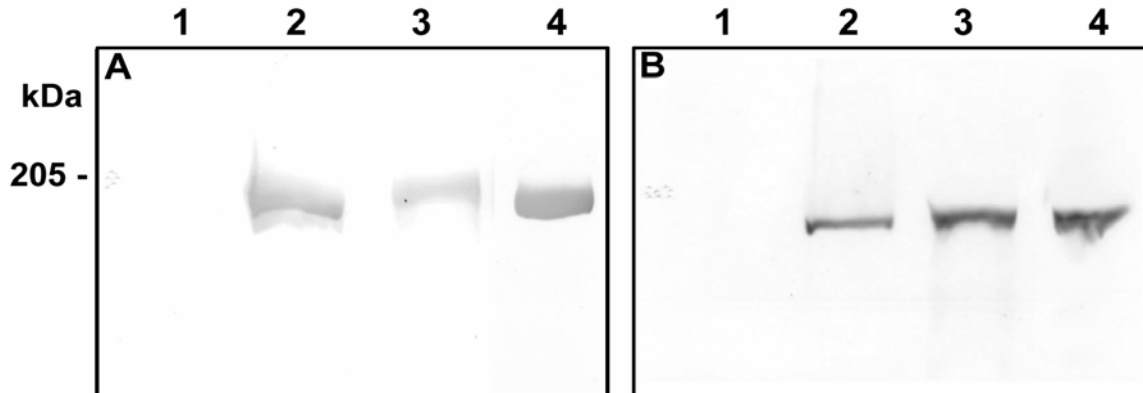


Figura 3. Immunoblotting das frações P3 de cérebro de suíno, bovino e pintainho.

As frações P3 (15 µg) foram aplicadas em gel 7 %, eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo específico para miosina II ou V. **A:** incubação com anticorpo policlonal contra cadeia pesada de miosina II. **B:** incubação com anticorpo contra cadeia pesada de miosina V. 1: padrão de massa molecular. 2, 3 e 4 correspondem a fração P3 de cérebro de suíno, bovino e pintainho, respectivamente. O número à esquerda corresponde ao padrão de massa molecular: cadeia pesada de miosina.

A aplicação da fração solúvel S5 em coluna de sephacryl S-500, mostrou uma separação parcial entre os polipeptídeos de 205 e 43 kDa (Fig. 6). O que sugere que os polipeptídeos não estejam totalmente solúveis, mas apenas em suspensão. A atividade Mg^{2+} -ATPase para as frações contendo o polipeptídeo de 205 kDa (frações 07 e 08) é praticamente desprezível (dados não mostrados), talvez pela ausência de F-actina nessas frações, uma vez que F-actina é fundamental para que miosinas apresentem alta atividade Mg^{2+} -ATPase [7;13;15].

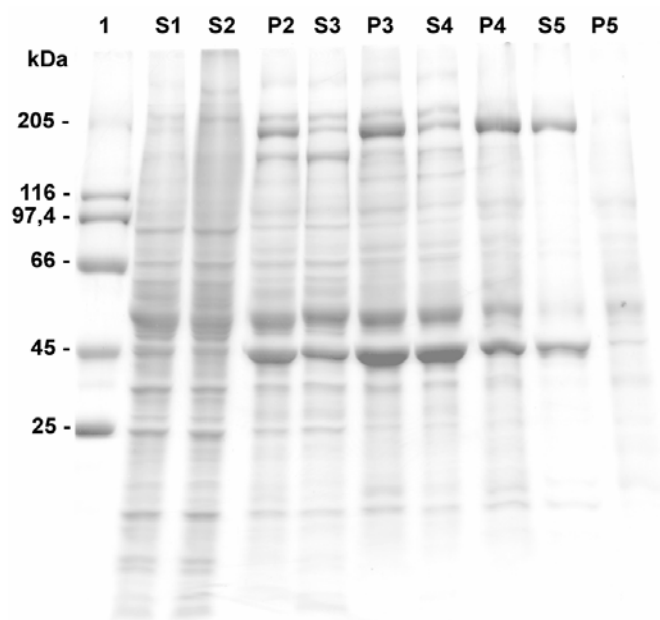


Figura 4. SDS-PAGE da preparação de actomiosina de cérebro de suino.

Foram aplicados cerca de 8,0 µg proteínas de cada fração em gel gradiente 5-22 % e o gel foi corado com Commassie Blue R-250. No alto estão indicadas as frações. 1: padrão de massa molecular. Os números à esquerda correspondem ao padrão de massa molecular.

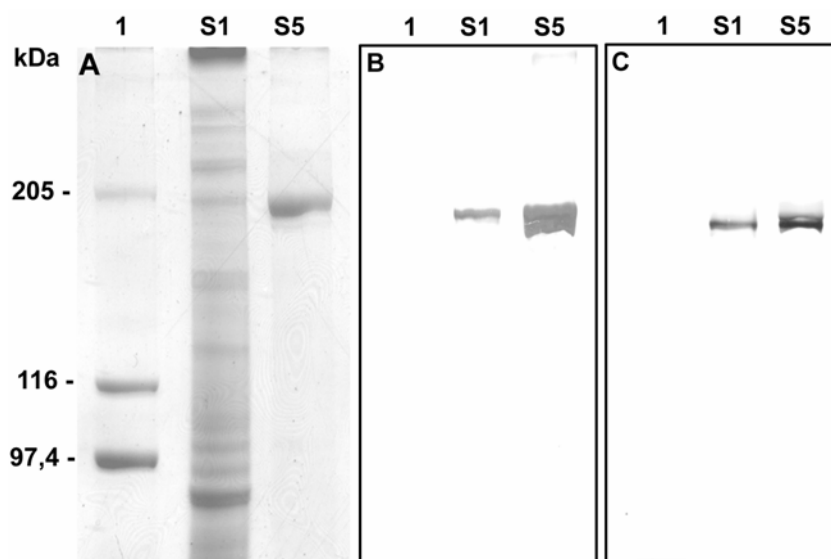


Figura 5. Immunoblotting para as frações S1 e S5 de cérebro de suino.

As frações S1 (14 µg) e S5 (08 µg) foram aplicadas em gel 7 %, eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo específico para miosina II ou V. **A:** gel corado com Comassie Blue R-250, foram aplicadas as frações S1 (11 µg) e S5 (06 µg). **B:** incubação com anticorpo policlonal contra cadeia pesada de miosina V. **C:** incubação com anticorpo policlonal contra cadeia pesada de miosina II. No alto são indicadas as frações. 1: padrão de massa molecular. Os números à esquerda correspondem ao padrão de massa molecular

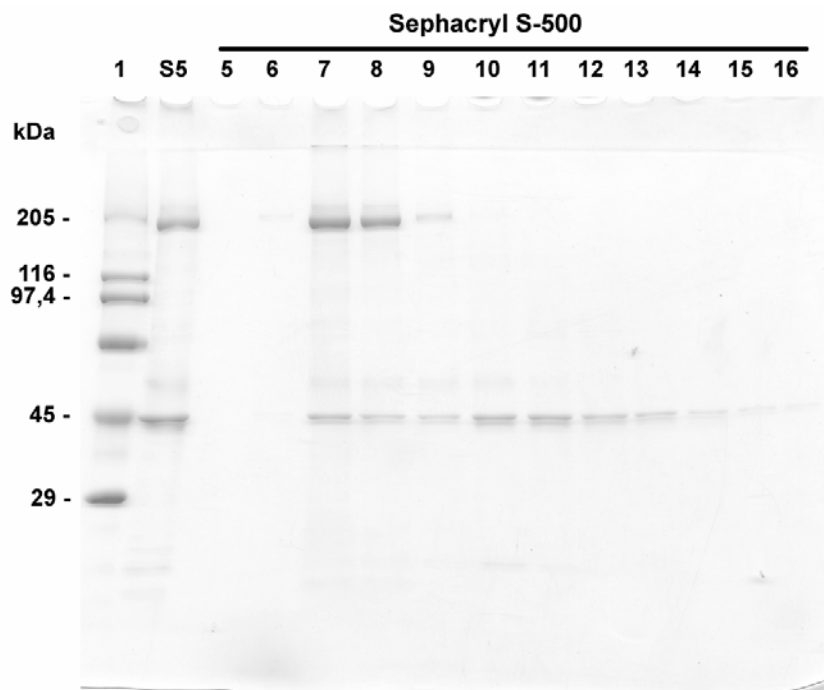


Figura 6. Fracionamento em coluna sephacryl S-500.

A fração S5 foi aplicada em coluna Sephacryl S-500 e foram coletadas frações de 3 mL de cérebro de suíno. A fração S5 (5 µg) e as frações 5 a 16 (10 µL) foram aplicadas em gel gradiente 5-22 % e o gel foi corado com Comassie Blue R-250. No alto são indicadas as frações. 1: padrão de massa molecular. Os números à esquerda correspondem ao padrão de massa molecular.

Analizamos a atividade ATPase da fração P3 de cérebro de suíno frente a diferentes cátions divalentes e observamos atividade na presença de íon cobaltoso (Fig. 7). Essa atividade Co^{2+} -ATPase é apenas 20% menor que a Mg^{2+} -ATPase, sugerindo a presença de outras ATPases nessa fração precipitada, uma vez não há relatos na literatura a respeito de atividade Co^{2+} -ATPase para miosinas. Testamos detergentes não iônicos para a retirada de possíveis estruturas membranosas da preparação de actomiosina de cérebro de suíno e observamos que Tween 20 estimula a atividade Mg^{2+} -ATPase da fração P3 (Fig. 8), o que pode ser resultado da dissociação de possíveis ATPases de membrana presentes nessa fração, uma vez que se postula que a precipitação de miosinas ocorra devido a interação dessas moléculas com vesículas e actina [3].

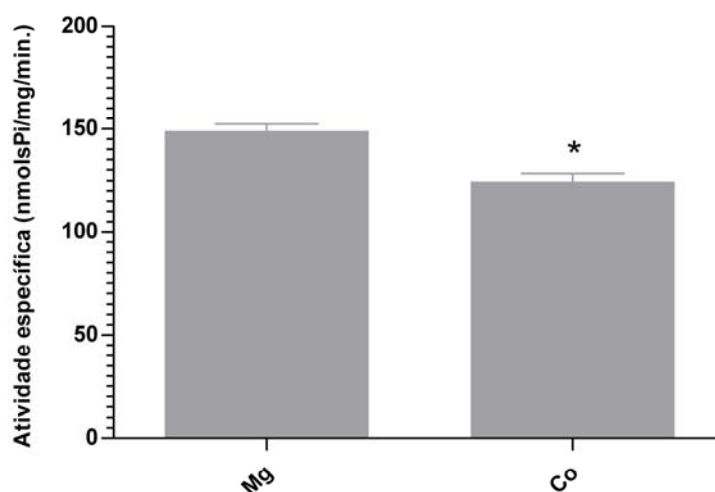


Figura 7. Atividade Mg ou Co²⁺-ATPase da fração P3 de cérebro de suino.

A fração P3 (25 µg) foi incubada por 10 min a 37 °C em meio de reação Imidazol-HCl 25 mM pH 7,5; EDTA 1 mM, DTT 1mM, KCl 60, contendo MgCl₂ 4 mM ou CoCl₂ 4 mM. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM e interrompida com adição de solução de dosagem. Constitui a média de três ensaios para experimentos distintos. * Difere significativamente de Mg pelo teste t (P<0,05).

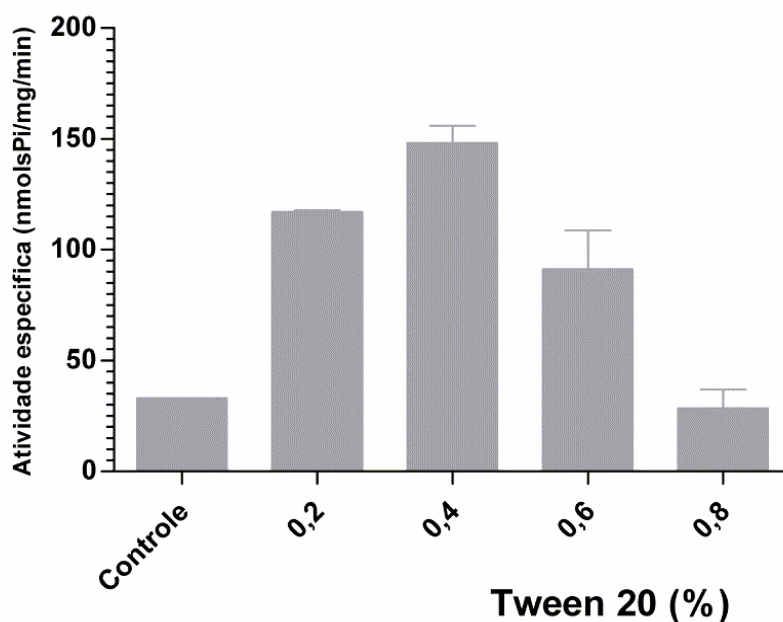


Figura 8. Efeito de Tween 20 na atividade Mg²⁺-ATPase da fração P3 de cérebro de suino.

A fração P3 (25 µg) foi incubada por 10 min a 37 °C em meio de reação contendo Imidazol-HCl 25 mM pH 7,5; EDTA 1 mM, DTT 1mM, KCl 60 MgCl₂ 4 mM e tween-20 em porcentagem crescente (v/v) conforme indicado na figura. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM e interrompida com adição de solução de dosagem. Constitui a média de dois ensaios para experimentos distintos.

Algumas ATPases têm a atividade Mg^{2+} -ATPase estimulada por detergentes não iônicos, como dineína flagelar que tem a atividade Mg^{2+} -ATPase estimulada por Triton X-100 [29], como também ATPase de membrana plasmática [30] e mesmo uma ATPase de envoltório nuclear que tem a atividade Mg^{2+} -ATPase estimulada por Tween 80 [31]. Essa estimulação da atividade Mg^{2+} -ATPase por Tween 20 corrobora com a atividade Co^{2+} -ATPase para o fato de que possa estar ocorrendo a precipitação de outras ATPases, que possam, eventualmente, estar contribuindo com a atividade Mg^{2+} -ATPase detectada na fração precipitada P3. Assim podemos inferir que o processo de congelamento de fração solúvel de cérebro para a precipitação de actomiosina leva a precipitação de outras ATPases, que não somente miosinas. Podemos observar que esse processo de precipitação de actomiosina por congelamento de fração solúvel é válido não somente para rato, mas também para diferentes vertebrados e que pode ocorrer a precipitação de diferentes miosinas como observado aqui a precipitação conjunta de miosina II e V.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Foued S. Espindola (Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil), a Dra. Enilza M. Espreafico e Dr. Roy E. Larson (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), que gentilmente forneceram os anticorpos policlonais anti-miosina II e V. Ao frigorífico Real que gentilmente forneceu os cérebros de suíno e bovino e a granja Planalto que forneceu os pintainhos. Este estudo recebeu apoio da FAPEMIG e CNPq. D. S. D. recebeu bolsa de estudo fornecida pelo CNPq.

Referências Bibliográficas

- [1]. K. Homma, J. Saito, R. Ikebe, M. Ikebe, Ca^{2+} -dependent regulation of the motor activity of myosin V. *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 34766-34771.
- [2]. M. Krendel, M.S. Mooseker, Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiol.*, 20 (2005) 239-251.
- [3]. R.E. Cheney, Purification and assay of myosin V. *Methods Enzymol.* 298 (1998) 03-18.
- [4]. M.A. Titus, Unconventional myosins: new frontiers in actin-based motors. *Trends Cell Biol.*, 7 (1997) 119-123.
- [5]. A.G. Szent-Gyorgyi, The early history of the biochemistry of muscle contraction. *J. Gen. Physiol.*, 123 (2004) 631-641.
- [6]. J. R. Sellers, Myosins: a diverse superfamily. *Bioch. Biophys. Acta*, 1496 (2000) 3-22.
- [7]. H. Maruta, E. Korn, Acanthamoeba myosin II. *J Biol. Chem.*, 252 (1977) 6501-6509.
- [8]. C. Simerly, G. Nowak, P. Lanerolle, G. Schatten, Differential expression and functions of cortical myosin IIA and IIB isotipos during meiotic maturation, fertilization, and mitosis in mouse oocytes and embryos. *Mol. Biol. Cell*, 9 (1998) 2509-2525.
- [9]. S.L. Reck-Peterson, M.J. Tyska, P.J. Novick, M.S. Mooseker, The yeast class V myosins, myo2p and myo4p, are nonprocessive actin based motors

- [10]. L.A. Lapierre, R. Kumar, C.M. Hales, J. Navarre, S.G. Bhartur, J.O. Burnette, D.W. Provance JR., J.A. Mercer, M. Bahler, J.R. Goldenring, Myosin Vb Is Associated with Plasma Membrane Recycling Systems. *Mol. Biol. Cell*, 12 (2001) 1843–1857.
- [11]. J.A. Ferro, R.E. Larson, Calcium/calmodulin regulation of ATPase activity and endogenous phosphorylation of mammalian brain actmyosin. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 145 (1987) 1217-1224.
- [12]. R.E. Larson, F.S. Espindola, E.M. Espreafico, Calmodulin-binding proteins and calcium/calmodulin regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. *J. Neuro.*, 54 (1990) 1289-1294.
- [13]. F.S. Espíndola, E.M. Espreafico, M.V. Coelho, A.R. Martins, F.R.C. Costa, M.S. Mooseker, R.E. Larson, Biochemical and Immunological Characterization of p190-Calmodulin Complex from Vertebrate Brain: A Novel Calmodulin-binding Myosin. *J. Cell Biol.*, 118 (1992) 359-368.
- [14]. F. Wang, K. Thirumurugan, W.F. Stafford, J.A. Hammer III, P.J. Knight, J.R. Sellers, Regulated Conformation of Myosin V. *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 2333–2336.
- [15]. R.E. Cheney, M.K. O'shea, J.E. Heuser, M.V. Coelho, J.S. Wolenski, E.M. Espreafico, J. Forscher, R.E. Larson, M.S. Mooseker, Brain Myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity.. *Cell*. 75 (1993) 13-23.
- [16]. E.M. Espreafico, R.E. Cheney, M. Matteoli, A.A.C. Nascimento, P.V. De Camilli, R.E. Larson, M.S. Mooseker. Primary structure and cellular localization of chicken Brain Myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J. Cell Biol.*, 119 (1992) 1541-1557.

- [17]. M.V. Coelho, R.E. Larson, Ca^{2+} -dependent phosphorylation of the tail domain of myosin-V, a calmodulin-binding myosin in vertebrate brain. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26 (1993) 465-472.
- [18]. H.C. Soares Melo, Caracterização de atividade ATPásica de miosina V de cérebro de rato obtida por congelamento. 2003. 67 f. Dissertação (mestrado em Genética e Bioquímica). Instituto de Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.
- [19]. D.S. Dias, H.C. Soares Melo, M.V. Coelho, Purification of myosin II from rat testis. 2005 (trabalho enviado para publicação)
- [20] J.K. Heinonen, R.J. Lathi, A New and Convenient Colorimetric Determination of Inorganic Orthophosphate and Its Application to the Assay of Inorganic Pyrophosphatase. *Anal. Biochem.*, 113 (1981) 313-317.
- [21]. U.K Laemmli, M. Favre, Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.*, 80 (1973) 575-599.
- [22]. F.W. Studier, Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slabgels. *J. Mol. Biol.*, 79 (1973) 237-48.
- [23]. H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 (1979) 4350-4354.
- [24]. M.M. Bradford, A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72 (1976) 248-254.

- [25]. W.F.H.M. Mommaerts, K. Seraidarian, A study of the adenosine triphosphatase activity of myosin and actomyosin. *J. Gen. Physiol.*, 30 (1947) 401-422.
- [26]. T.D. Pollard, E.D. Korn, Acanthamoeba myosin. I. Isolation from Acanthamoeba castellanii of an enzyme similar to muscle myosin. *J Biol. Chem.*, 248 (1973) 4682-4690.
- [27]. A.A.C. Nascimento, R.E. Cheney, S.B.F. Tauhata, R.E. Larson, M.S. Mooseker, Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 17561-17569.
- [28]. R.E. Ostlund, Jr, J.T. Leung, D.M. Kipnis, Myosins of secretory tissues. *J. Cell Biol.*, 77 (1978) 827-836.
- [29]. I.R. Gibbons, E. Fronk, a latent adenosine triphosphatase form of dynein 1 from sea urchin sperm flagella. *J. Biol. Chem.*, 254 (1979) 187-196.
- [30]. B. Norling, The effect of anionic detergents on the ATPase activity of isolated F1 from the thermophilic bacterium PS3. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, 14 (1986) 899-905.
- [31]. C.D. Smith, W.W. Wells, Solubilization and reconstitution of a nuclear envelop-associated ATPase. *J. Biol. Chem.*, 259 (1984) 1190-1194.