

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDO DAS ATIVIDADES ATPÁSICAS DE MIOSINAS DA CLASSE II E V
EM RELAÇÃO A FATORES REGULATÓRIOS E AO VENENO DE *Apis*
mellifera

PAULA MENDES DE FREITAS

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção
do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

UBERLÂNDIA -MG
JULHO 1994

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDO DAS ATIVIDADES ATPÁSICAS DE MIOSINAS DA CLASSE II E V
EM RELAÇÃO A FATORES REGULATÓRIOS E AO VENENO DE *Apis*
mellifera

PAULA MENDES DE FREITAS

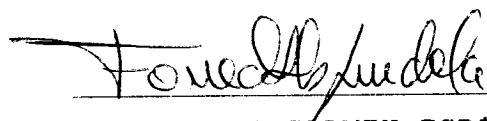
FOUED SALMEN ESPINDOLA

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção
do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

UBERLÂNDIA -MG
JULHO 1994

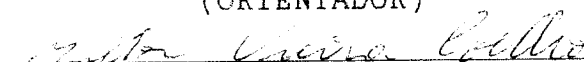
ESTUDO DAS ATIVIDADES ATPÁSICAS DE MIOSINAS DA CLASSE II E V
EM RELAÇÃO A FATORES REGULATÓRIOS E AO VENENO DE *Apis*
mellifera

APROVADA PELA COMISSÃO EXAMINADORA EM 08/07/94.



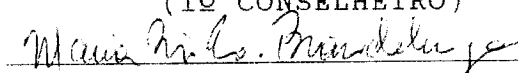
FOUED SALMEN ESPINDOLA

(ORIENTADOR)



MILTON VIEIRA COELHO

(1º CONSELHEIRO)



MARIA INÊS HOMSI BRANDEBURGO

(2º CONSELHEIRO)

UBERLÂNDIA -MG

JULHO 1994

INDICE

I-INTRODUÇÃO.....	01
II-OBJETIVO GERAL.....	04
III-REVISÃO DA LITERATURA.....	05
IV-MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
V-RESULTADOS.....	22
VI-DISCUSSÃO.....	42
VII-CONCLUSÃO.....	44
VIII-REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	45

I-INTRODUÇÃO

As miosinas são proteínas mecanoquímicas presentes em células eucarióticas incluindo não somente tecidos musculares, mas também tecidos não musculares como plaquetas, fígado, macrófagos, leucócitos, fibroblastos, tireóide, timo e cérebro. Estas proteínas participam em atividades bem diversas como contração muscular, movimento celular, citocinese e mobilidade de organela (TANAKA et al., 1986; WARRICK & SPUDICK, 1987)

Inicialmente as miosinas eram divididas em duas classes: classe I e classe II. As miosinas II são miosinas convencionais de duas cabeças e capazes de formar filamentos com sua calda super helicoidal. A primeira miosina não convencional foi encontrada em *Acanthamoeba castellanii* e denominada miosina I. Ela foi assim denominada devido ao fato de possuir uma única cabeça e não ser capaz de formar filamentos por falta da cauda super helicoidal, presente nas miosinas convencionais da classe II. Por extrapolação todas as miosinas que não possuíam uma cauda superhelicoidal capaz de formar filamentos eram consideradas membros da classe I de miosinas (KORN & HAMMER, 1988; WARRICK & SPUDICK, 1987; CHENEY & MOOSEKER, 1992).

Todas as miosinas conhecidas mostram um domínio motor (cabeça) estruturalmente conservado. Uma comparação detalhada da seqüência desses domínios nas miosinas conhecidas e a análise filogenética dessas seqüências levou à conclusão surpreendente de que essas proteínas motoras podem ser agrupadas em várias classes distintas. Para esta classificação foi proposto uma ordem cronológica das descobertas de novas classes de miosinas (ESPRAFICO et al., 1992 & MOOSEKER, 1993).

As miosinas expressam atividades Ca-ATPase, K-EDTA ATPase e de Mg-ATPase. Mas, em condições fisiológicas de força iônica e

presença de magnésio, ocorre somente a atividade Mg-ATPase. Quando a miosina interage com filamentos de actina ocorre ativação de sua atividade Mg-ATPase. A interação de miosina e actina em células não-musculares produz uma força de deslizamento semelhante à do músculo, embora a quantidade e a organização da miosina nessas células seja bem inferior à das células musculares (JOHNSON, 1985; KORN & HAMMER, 1988).

Os fatores regulatórios que afetam a atividade ATPásica das miosinas diferem em relação ao tipo de tecido e ao mecanismo de regulação. Um aspecto básico nessa regulação é a dependência de interação de íons calcio com proteínas receptoras de calcio que sofrem mudanças conformacionais quando estão complexadas com calcio.

A contração do músculo esquelético é regulada por calcio. A interação de actina e miosina é inibida pelo complexo de troponina e pela tropomiosina quando o nível de calcio está baixo. A excitação nervosa dispara a liberação de calcio a partir do retículo sarcoplasmático. A ligação de calcio à troponina C, um membro de uma família de proteínas sensoras de calcio, altera a interação da tropomiosina com a actina para permitir que a miosina se ligue à actina e gere a força contrátil. O músculo liso de vertebrados contrai-se quando as cadeias leves são fosforiladas por uma cinase que é ativada por calcio/calmodulina. O mesmo mecanismo regulatório ocorre em células não musculares. A contração muscular em moluscos é ativada diretamente pela ligação de calcio às cadeias leves da miosina (STRYER, 1992).

Com relação à regulação de miosinas não convencionais pouco é conhecido, entretanto sabe-se que as cadeias leves desempenham um importante papel. A miosina V investigada neste trabalho e recentemente caracterizada (ESPINDOLA et al., 1992; ESPREAFICO et

al., 1992 & CHENEY et al., 1993), possui calmodulina como cadeia leve. Em presença de cálcio e calmodulina exógena a atividade ATPásica de miosina V é estimulada. Entretanto em ensaios de motilidade "in vitro" a presença de cálcio inibe a atividade mecanoquímica de miosina V, bem como a presença de antagonistas específicos de calmodulina (CHENEY et al., 1993).

Os antagonistas de calmodulina como clorpromazina e trifluoperazina, atuam por interação hidrofóbica com a calmodulina impedindo a sua ligação com a miosina V.

Neste trabalho aplicou-se metodologias específicas para obtenção de frações enriquecidas e purificadas de miosinas da classe II de tecido muscular e cérebro e miosina da classe V de cérebro. Nestas preparações foram analisados o perfil de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida com agente desnaturante e determinado as atividades K-EDTA ATPase e Mg-ATPase em presença de cálcio/calmodulina, antagonista de calmodulina e veneno bruto de *Apis mellifera*.

II-OBJETIVO GERAL

Preparo de frações enriquecidas e purificadas em miosinas e determinação de suas atividades ATPásicas.

Objetivos Específicos

Preparo de frações enriquecidas em miosina II de músculo esquelético, músculo cardíaco e cérebro.

Preparo de fração enriquecida e purificada em miosina V de cérebro .

Determinação da concentração de proteína em cada fração.

Análise da composição de proteína de cada fração por técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.

Determinação das atividades ATPásicas em relação ao seguintes fatores:

Adição de Mg^{2+} e Ca^{2+} .

Adição de EDTA e alta concentração de K^{+} .

Adição de calmodulina.

Adição do veneno de *Apis mellifera*

III-REVISÃO

As miosinas são operacionalmente definidas pela presença do domínio cabeça amino-terminal que é responsável pela conversão da energia da hidrólise do ATP em trabalho mecânico através da interação com filamentos de actina. Os domínios cabeça e cauda das miosinas são conectados por um domínio pescoço, consistindo de um número variável (1-6) de repetições em série de uma seqüência de aproximadamente 24 aminoácidos conhecida como "IQ motif", cada uma das quais pode ser um sítio ligante de cadeia leve. Parece que as interações cadeias leves/domínio pescoço regulam as funções da cabeça e da cauda sendo interessante notar que muitas das miosinas não convencionais podem conter, como cadeias leves, múltiplas moléculas de calmodulina (MOOSEKER, 1993).

A calmodulina é um dos principais receptores de calcio intracelular e está presente em diferentes tipos de células e tecidos. O mecanismo de ação da calmodulina freqüentemente envolve uma ligação reversível dependente de calcio a proteínas alvo e a conseqüente modulação da atividade desta proteína. Por exemplo, a fosforilação das cadeias leves de miosina de músculo liso e células não musculares, catalizada pela proteína cinase da cadeia leve de miosina (MLCK), é regulada pela interação do complexo calcio/calmodulina com MLCK (Para revisão ver ESPINDOLA, 1991).

1- Miosina V

A miosina V foi recentemente identificada baseado em estudos de seqüenciamento do gene de levedura MY02 (JOHNSTON et al., 1991), o gene "dilute" para cor da pelagem de camundongo (MERCER et al., 1991). e uma proteína ligante de calmodulina de cérebro de vertebrados (LARSON et al., 1988; ESPINDOLA et al., 1992;

ESPREAFIGO et al., 1992). Todos os membros desta classe estão caracterizados pela presença de duas cabeças ligadas a um domínio pescoço incomum contendo seis repetições em série de calmodulina/cadeia leve ligando um motivo referido como "IQ-motif" (CHENEY & MOOSEKER, 1992; ESPREAFIGO et al., 1992). Em adição, estas proteínas contem uma cauda enrolada em espiral seguida por um domínio globular da cauda de função desconhecida. Os "IQ-motifs" são frequentemente associados com a propriedade não usual de ligação a calmodulina na ausência de cálcio. Em alguns casos o cálcio atua levando ao desligamento da calmodulina destes sítios, o que é exatamente o oposto ao comportamento esperado para a ligação convencional da calmodulina dependente de cálcio a um sítio (CHENEY et al., 1993).

Um aspecto fundamental para a caracterização de miosina V foi a descoberta de sua atividade ATPásica. A fração enriquecida em miosina V tem uma atividade Mg-ATPásica estimulada por $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, mas não possui uma atividade K-EDTA ATPásica, característico da classe de miosinas II.

A purificação de miosina V em uma forma relativamente livre de miosina II e actina de cérebro foi obtida por cromatografias em coluna de sephacril S-500. A miosina V purificada não apresentou uma atividade Mg-ATPásica mesmo na presença de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Entretanto, em presença de actina de cérebro ou actina purificada de músculo esquelético a miosina V apresentou uma atividade Mg-ATPásica, que era ativada por $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (ESPINDOLA et al, 1992).

CHENEY e colaboradores (1993) obtiveram uma miosina V de cérebro purificada em coluna de Sephacryl S-500 e Q-Sepharose com atividade ATPásica dependente da presença de actina e estimulada por cálcio e calmodulina, confirmando assim os dados de ESPINDOLA et al (1992). Eles também realizaram ensaios de motilidade in

7
vitro e mostraram que miosina V é mecanoquimicamente ativa. Em ensaios sob condições ótimas de baixa concentração de íons cálcio, os filamentos de actina sobre lamínulas recobertas de miosina V movem-se a velocidade de 300 nm/segundo. Eles demonstraram também que miosina V não forma filamentos e pode se ligar a membranas contendo fosfolipídeos acídicos.

A miosina V é, portanto, uma proteína motora cujas propriedades a distinguem tanto de miosina I quanto de miosina II.

2- Veneno de *Apis mellifera*

A melitina é um dos principais componentes do veneno de abelha. Foi primeiro identificado como um fator hemolítico direto por NEUMANN e HABERMANN (1954) apud BANKS e SHIPOLINI (1986) e suas propriedades de ser ativo em membranas são perfeitamente observadas na lise de células vermelhas do sangue (HABERMANN, 1972 apud BANKS e SHIPOLINI, 1986). Melitina tetramérica não causa lise e é nesta forma que é armazenada no saco de veneno. Entretanto, quando diluída, o tetramero dissocia em monomero o qual é altamente ativo em superfície e porções para dentro da membrana. Dependendo do número de moléculas de melitina dissolvidas na membrana da célula, o pacote de fosfolípideos é severamente rompido pela melitina. Este fenômeno leva à lise da célula. Ainda que melitina e fosfolipase A2 (outra enzima presente no veneno de abelha e que efetivamente converte fosfolipídeos em moléculas semelhantes a detergentes que lisam membranas) são ambas tóxicas quando presentes separadamente, elas são muito mais potentes quando presentes juntas, a lise celular ocorre com baixos níveis de melitina e fosfolipase (HIDER, KHADER & TATHAM, 1983; HABERMANN & KOWALLEK, 1970; DAWSON et al, 1978; VOGT et al, 1970 apud

DOTIMAS & HIDER, 1987).

A melitina e a calmodulina são capazes de interagir formando um complexo. Esta interação bloqueia a ativação normal da fosfodiesterase de cérebro pela calmodulina (BANKS & SHIPOLINI, 1986).

3- Miosina II

A miosina II de músculo esquelético é uma molécula proteica longa (160 nm), assimétrica, com um peso molecular ao redor de 470.000 daltons. Sua estrutura consiste de duas cadeias polipeptídicas grandes e idênticas, cada uma com peso molecular ao redor de 200.000 daltons, denominadas de cadeias pesadas e quatro subunidades menores, denominadas de cadeias leves, com peso molecular na faixa de 20.000 daltons. As cadeias pesadas estão enroladas entre si formando duas regiões globulares adjacentes e uma extensa cauda em forma de bastão. As regiões globulares são denominadas de cabeças e nelas estão o sítio de ligação com a actina, o sítio de atividade ATPásica e as cadeias leves. Estas cadeias leves variam em número e tamanho nos diferentes tipos de músculo (FERRO, 1983).

A actina e a miosina são as duas principais proteínas envolvidas na contração muscular. Devido à ampla distribuição destas proteínas nos vários tipos de células eucarióticas, desde vertebrados até ameba, acredita-se que estas proteínas, capazes de interagir e converter energia química em mecânica, propiciam a base de um mecanismo geral para a produção de movimento, do qual a contração muscular seria um exemplo especializado (FERRO, 1983).

A regulação da interação actina-miosina II e a estimulação de sua atividade ATPásica apresenta três fatores principais: ligação

do cálcio ao complexo troponina-tropomiosina, fosforilação da miosina por uma quinase específica dependente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ e ligação direta do cálcio à miosina (ADELSTEIN e EISENBERG, 1980 e CITI e KENDRICK-JONES, 1987).

A contratilidade resultante da interação dos filamentos de actina e miosina é, em geral, controlada pela concentração de íons cálcio. O músculo em repouso tem uma concentração intracelular de cálcio $< 10^{-7}\text{M}$. Um aumento na concentração intracelular desse Ca^{2+} para 10^{-5}M inicia a contração. A maneira pela qual o Ca^{2+} atua na regulação da interação actina-miosina varia nos diferentes tipos de músculo (FERRO, 1983). O processo regulatório da interação actina-miosina-ATP para os músculos esqueléticos e cardíacos é baseado na actina, enquanto que para o músculo liso, músculo de moluscos e células não-musculares é baseado na miosina (ADELSTEIN e EISENBERG, 1980 e CITI e KENDRICK-JONES, 1987)

Estudos "in vitro", com miosina e actina purificadas, tem revelado que a atividade ATPásica da miosina muscular é fortemente dependente do cátion ligado ao ATP. Na presença de íons Mg^{2+} a atividade da miosina é baixa e é fortemente ativada pela interação com actina polimerizada (EISENBERG e MOOS, 1968; EISENBERG e MOOS, 1970; GORDON et al., 1976; GORDON et al., 1977; REISLER, 1980; SLEEP et al., 1980 apud FERRO, 1983). Quando todos os cátions divalentes são removidos (principalmente o Mg^{2+}) pela adição de EDTA, a atividade da miosina é alta em soluções contendo K^+ , sendo que esta atividade é inibida pela adição de actina polimerizada (COOKE e FRANKS, 1980; GORDON et al. 1976; LARSON et al., 1983; RIZZINO et al., 1970 apud FERRO, 1983).

4- Miosina II cardíaca

No miocárdio as isoformas da miosina II apresentam atividades enzimáticas distintas, a distribuição relativa dessas formas está diretamente relacionada com as propriedades contráteis do miocárdio (BOUVAGNET et al, 1987).

A expressão dos genes para MHC é distinta no átrio e no ventrículo de animais. No átrio, a alfa-MHC é sempre a forma predominante. A estrutura primária das duas isoenzimas, alfa e beta no sistema de condução é muito similar com as duas isoenzimas alfa e beta-MHC do miocárdio comum, inclusive quanto à atividade ATPásica (KOMURO et al, 1987).

No estágio adulto, o átrio apresenta predominantemente a forma V1 e o ventrículo normal do homem, predomina a forma V3 e em animais de pequeno porte, a forma V1 (NADAL-GINARD e NAHDAVI, 1989).

Essa redistribuição do conteúdo relativo das isoformas da MHC tem um significado fisiológico na contração cardíaca, a diminuição da atividade ATPásica implica em menor gasto energético e consumo de oxigênio, e a diminuição da velocidade de contração muscular aumenta a eficiência da contração por um trabalho equivalente. Além disso, a atividade ATPásica da molécula de miosina II é também dependente das MLCs (MERCADIER et al, 1983 e HIRZEL et al, 1985)

5- Miosina II de cérebro

Miosina II de cérebro contem 200 KDa de cadeias pesadas e quatro espécies de cadeias leves (21 e 19KDa de cadeias leves e uma dupla de 17 KDa de cadeias leves). As moléculas individuais de

miosina são constituídas de duas cabeças globulares e uma cauda filamentosa. Como já podia ser esperado, pelas semelhanças estruturais entre moléculas de miosina de cérebro e de músculo, muitas das propriedades fundamentais da miosina de cérebro são muito similares às de miosinas musculares, especialmente àquelas de miosina de músculo liso. São estas: Semelhante peso molecular (cerca de 440.000 daltons), alta assimetria na forma molecular, alta atividade ATPásica na presença de K^+ e EDTA, atividade ATPásica estimulada por íons cálcio e magnésio, formação de filamentos bipolares regulares por diálise breve em tampão de baixa força iônica, e interação com F-actina. As propriedades que distinguem a miosina de cérebro de outras miosinas é a sua composição característica em aminoácidos, peptídeos distintos obtidos pela clivagem enzimática ou química da miosina, nenhuma reação cruzada de seu anticorpo com miosina de músculo, agregação em tampão de alta força iônica, formação de agregados paracristalinos distintos por diálise extensiva em tampão de baixa força iônica, e inabilidade de formar um copolímero com miosina de músculo esquelético. Estas propriedades identificam miosina de cérebro como similar mas distinta da miosina muscular (MATSUMURA, 1985 e 1988).

A atividade Mg-ATPase da miosina convencional de cérebro foi estimulada cerca de 3-4 vezes por interação com actina de músculo esquelético e pela fosforilação de uma das cadeias leves da miosina. Este nível de estimulação da atividade Mg-ATPásica foi significativamente inferior ao verificado para a miosina de músculo esquelético em sua interação com actina (ASH, 1975; BURRIDGE e BRAY, 1975; SEE e METUZALS, 1976; MALIK et al, 1983; FERRO e LARSON, 1987).

A atividade K^+ -EDTA ATPásica da miosina purificada de cérebro

mostrou-se extremamente instável quando a preparação era guardada em gelo na ausência de glicerol, perdendo de 50 a 75% de sua atividade nos primeiros 5 dias de estocagem. O mesmo comportamento foi observado com relação à atividade Mg^{2+} -ATPásica. Dosagem de proteína não revelou diminuição de proteína em solução, indicando que a perda de atividade não foi ocasionada pela precipitação de proteína solúvel. Adição de glicerol, na concentração final de 50%, à solução de miosina, logo após sua obtenção e estocagem a $-20^{\circ}C$ conferiu uma boa estabilidade à atividade da miosina, restando 87% da atividade original no oitavo dia de estocagem. A miosina de músculo esquelético não apresenta instabilidade podendo ser conservada em gelo durante um longo período sem demonstrar perda de atividade (FERRO, 1983).

IV-MATERIAIS E MÉTODOS

1- Preparação de proteínas

1-1- Preparação de fração enriquecida em miosina V

Miosina V foi extraída do cérebro de coelhos e de ratos pelo procedimento abaixo:

Os animais foram sacrificados por decapitação e os cérebros removidos rapidamente para salina gelada e em seguida homogeneizados em tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,0; ATP 5 mM; EDTA 10,0 mM; PMSF 0,3 mM e 2-mercaptoetanol 1,0 mM a 4°C. O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 g por 40 minutos (0-2°C). No sobrenadante obtido foi adicionado NaCl 0,6 M e após 20 minutos de incubação a 4°C fez-se outra centrifugação a 15.000 g por 40 minutos.

O sedimento (P2) foi suspenso em tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,2 contendo triton X-100 a 1%, PMSF 0,3 mM, EDTA 5 mM e EGTA 5 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM e após incubação de 20 minutos, à temperatura ambiente, foi centrifugado a 15.000 g por 20 minutos (0-2°C). O sobrenadante obtido foi descartado e o sedimento (P3) lavado em Tris-HCl 25 mM pH 7,2, EDTA 1 mM, PMSF 0,3 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM e centrifugado a 15.000 g por 20 minutos. O sobrenadante obtido foi descartado e o sedimento (P4) foi solubilizado em tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,2, EDTA 1 mM, PMSF 0,3 mM e DTT 1 mM. Foi retirada amostra para dosagem de proteína e atividade ATPásica. A fim de solubilizar miosina V acrescentou-se ATP 10 mM e MgCl₂ 5 mM, EGTA 2 mM, DTT 4 mM, NaCl 0,6 M e calmodulina 25µg/ml. Após 60 minutos de incubação no gelo centrifugou-se a 15.000 g por 10 minutos. O sobrenadante (S5) obtido foi a fração enriquecida em miosina V.

1-2- Purificação de miosina V pelo método de CHENEY (1993) com algumas modificações.

O sobrenadante (S₅) foi obtido como descrito acima e aplicado em coluna de Sephacryl S-500 pré equilibrada com Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 600 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 2 mM, ATP 5 mM e DTT 5 mM. A eluição foi feita com o mesmo tampão a 10 ml/hora. As frações eluídas foram analisadas em SDS-PAGE para visualizar as frações que contem miosina V e reunidas para diálise contra tampão HEPES 25mM pH 7,4, 2- mercaptoetanol 5 mM, EGTA 1 mM, NaCl 250 mM (3 trocas). A amostra dializada foi aplicada em coluna de Q-sepharose pré-equilibrada com o mesmo tampão de diálise. A coluna foi lavada com o mesmo tampão e eluída usando este tampão com diferentes concentrações de NaCl: Inicialmente 0,35 M, em seguida 0,45 M e finalmente com 1,6 M de NaCl. As frações eluídas foram analisadas em SDS-PAGE. Com objetivo de remover traços de ATP o eluído foi dializado contra Imidazol-HCl 20 mM pH 7,2, MgCl₂ 2,5 mM, KCl 75 mM, DTT 1-10 mM, EGTA 0,1 mM (2 trocas). Nesta amostra foram realizados ensaio de atividade ATPásica e dosagem de proteína.

1-3- Preparação de fração enriquecida em miosina II de cérebro.

O sobrenadante (S₂), obtido como descrito na preparação de miosina V, foi diluído seis vezes em tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,2; PMSF 0,3 mM; 2-mercaptoetanol 1,0 mM e mantido no gelo por 20 minutos. Centrifugou-se a 15.000 g por 40 minutos. O sedimento (P₃) foi lavado em tampão tris-HCl 25 mM pH 7,2 e suspenso em tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,2; EDTA 1 mM; PMSF 0,3 mM; DTT 2 mM. Nesta fração P₃ foi determinada a concentração de proteína e a atividade Mg-ATPásica. Em P₃ foi adicionado EDTA 4 mM, EGTA 5 mM e Triton x-100 deixando-se à temperatura ambiente por 20 minutos. Centrifugou-se a 15.000 g por 20 minutos. O precipitado obtido

(P₄) foi suspenso no mesmo tampão contendo Tris-HCl, EDTA, PMSF e DTT para remover o detergente Triton x-100 e demais debris celulares. Em seguida centrifugou-se novamente obtendo-se outro precipitado (P₅). Este foi suspenso em Tris-HCl 25 mM pH 8,0 com EDTA 1,0 mM, DTT 1,0 mM, PMSF 1,0 mM e KCl 0,15 M para ensaio de atividade ATPásica e dosagem de proteína.

1-4- Preparação de fração enriquecida em miosina II cardíaca.

A preparação de miosina II cardíaca foi obtida por uma modificação do método de RUPP et al (1991) que se resume em homogeneizar o músculo cardíaco em tampão tris-HCl 25 mM pH 8,0 com pirofosfato de sódio (Na₂P₂O₇) 40 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, EDTA 5 mM e PMSF 0,3 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 g por 20 minutos e o sobrenadante (S1) foi diluído 10 vezes com água deionizada gelada. Em seguida centrifugou-se o S1 diluído a 10.000 g por 15 minutos. O sedimento (P2) passou por um ciclo de solubilização em tris-HCl 2 mM pH 8,0 com KCl 1 M, PMSF 0,3 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM e precipitação da miosina II por diluição desta solução com água deionizada para concentração de KCl 0,1 M. O sedimento final (P4) foi utilizado para ensaio de atividade Mg-ATPásica, K-EDTA ATPásica e determinação da concentração de proteína.

1-5- Preparação de fração enriquecida em miosina II de músculo esquelético (Método utilizado no laboratório de bioquímica da UFRJ) .

Os animais foram sacrificados por decapitação e colocados em água e gelo por 30 minutos. O músculo dorsal foi coletado sobre gelo, limpo e moído. Para cada 100 g de músculo adicionou-se 300 ml de solução KCl 2 M, KH₂PO₄ 136,09 g, KOH 1 N pH 6,5, agitando

lentamente por 10 minutos. Acrescentou-se 1200 ml de água, agitando vigorosamente por 15 minutos. Filtrou-se em gaze. Acrescentou-se ao filtrado, vagarosamente, 1800 ml de água em agitação vigorosa. Centrifugou-se a 30.000 g por 30 minutos. O precipitado foi suspenso em KCl 0,6 M. Adicionou-se lentamente, água em volume igual ao volume final do passo anterior. Centrifugou-se a 30.000 g por 30 minutos. Novamente o sobrenadante foi filtrado em gaze, descartando-se o precipitado. Acrescentou-se, lentamente, água no volume de 1400 ml. Repetiu-se os passos desde a primeira centrifugação. Fez-se outra centrifugação a 30.000 g. O precipitado foi solubilizado em KCl 0,6 M, glicerol 50%, HCl 0,6M, HEPES 0,05 M, completando com água para 50 ml. Este precipitado final foi a fração enriquecida em miosina II de músculo esquelético. Para utilização esta fração foi diluída em água (1:12) e centrifugada a 2000 rpm por 20 minutos a 0°C, sendo o precipitado solubilizado em KCl 0,6 M, HEPES 50 mM pH 7,0.

1-6- Preparação de actina purificada

A actina purificada utilizada neste trabalho foi doada pelo laboratório de bioquímica da UFRJ.

1-7- Preparação de calmodulina de cérebro bovino

A calmodulina utilizada neste trabalho foi preparada conforme protocolo do laboratório de bioquímica da UFU.

2- Dosagem de proteínas pelo método de BRADFORD (1976).

Para a dosagem foram utilizados 30µl da fração final enriquecida em miosina, 70 µl de H₂O e 3 ml do reagente de Bradford (100 mg de Coomassie blue G em 50 ml de etanol 95%, misturados com 100 ml de ácido fosfórico 85%, completando até um

litro com água e posterior filtração.)). A absorbância foi medida por espectrofotometria a 595 nm após 3 minutos e antes de 1 hora, contra o branco que contém o mesmo tampão da amostra. Para conversão da absorbância em concentração de proteína foi feita paralelamente uma curva padrão de soro albumina bovina com o mesmo reagente. Foi determinada então, através desta, a concentração de proteína em mg/30µl que foi utilizada para cálculo da atividade específica do ensaio de atividade ATPásica.

3- Ensaio de atividade ATPásica

As atividades ATPásicas foram determinadas pela medida do fosfato inorgânico liberado do ATP através de dosagem colorimétrica pelo método de HEINONEN & LAHTTI (1981). Para o ensaio da atividade Mg-ATPásica 200 µl de meio de reação contém : Imidazol-HCl 25 mM pH 7,0, KCl 60 mM, EGTA 1,0 mM, DTT 0,2 mM , MgCl₂ 5 mM e quando apropriado, CaCl₂ 2 mM, calmodulina 5 µg/20µl, actina 61,3 µg/10 µl e/ou clorpromazina 50 µmolar. Para o ensaio da atividade K-EDTA ATPásica 200 µl de meio de reação contém: Imidazol-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 0,5 mM, DTT 0,2 mM e conforme apropriado acrescentou-se nos tubos de ensaio KCl 0,06 M e KCl 0,6 M. O padrão foi feito através de 80 nmoles de fosfato (Pi 0,4 mM). Foi utilizado um branco da reação , sem amostra e com incubação na presença de ATP. Cada amostra teve seu próprio branco, com amostra e sem incubação na presença de ATP. Após adição da enzima a reação foi iniciada pela adição de ATP 5mM e incubação a 37°C por 10 ou 30 minutos. Terminada a incubação acrescentou-se à 0,2 ml de amostra 2 ml de solução AAM (2 volumes de acetona PA, 1 volume de ácido sulfúrico 5 N, 1 volume de molibdato de amônio 10 mM) para formação do complexo colorido, vórtex 15 segundos, 0,2ml de ácido cítrico 1 M para "quenching" de molibdato livre, vórtex 15

segundos. A absorvância das amostras foi medida por espectrofotometria a 360 nm. As leituras obtidas foram utilizadas para cálculo da atividade específica através da seguinte fórmula:

$$AE = \frac{\text{Abs. amostra}}{\text{Abs. padrão}} \times \frac{1}{[\text{ }]} \times \frac{1}{\text{nmoles}} \times \frac{1}{\text{tempo inc. [prot.]}}$$

A atividade específica foi expressa em nmoles de Pi/minuto/mg de proteína.

4- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE). Métodos de LAEMMLI e FAVRE, 1973 e STUDIER, 1973.

Para o preparo das amostras para SDS-PAGE em cada 100 µl foi adicionado 50 µl de STOP (Tris-HCl 0,187 M pH 6,8, SDS 6%, EDTA 6 mM, bromofenol 0,001% e glicerol 27,6%), 10 µl de 2-mercaptoetanol e ferveu-se por 2 minutos em banho-maria.

A eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS foi realizada em placa de vidro como descrito por STUDIER (1973). As dimensões do mini-gel foram 11 x 10 x 0,06 cm.

Os géis de separação e de empilhamento foram preparados conforme as tabelas:

GEL DE SEPARAÇÃO PARA MINI GEL

Solução estoque	número de geis		
	1 gel	2 geis	3 geis
2M Tris-HCl pH8,8	1,17ml	2,35ml	3,52ml
Água deionizada	62,5µl	125µl	187,5µl
200mM EDTA	62,5µl	125µl	187,5µl
Acil. Bis.	X	X	X
Água deionizada	Y	Y	Y
TEMED	7,5µl	15µl	22,5µl
Pers. Amonio 10%	37,5µl	75µl	112,5µl

GEL DE EMPILHAMENTO PARA MINI GEL

Solução de estoque	número de Geis	
	1 e 2 Geis	3 e 4 Geis
2M Tris HCl pH6,8	250µl	500µl
Água deionizada	40µl	80µl
EDTA 200mM	40µl	80µl
Acril. Bis>	650µl	1,3ml
Água deionizada	2,96ml	5,9ml
TEMED	5µl	10µl
Pers. Amonio 10%	35µl	70µl

	1 Gel	2 Geis	3Geis
%	X / Y	X / Y	X / Y
5%	1,05/3,82	2,10/7,65	3,15/11,47
6%	1,25/3,62	2,50/7,25	3,75/10,87
7%	1,45/3,42	2,90/6,85	4,35/10,27
8%	1,67/3,20	3,35/6,40	5,02/9,60
9%	1,87/3,00	3,75/6,00	5,62/9,00
10%	2,07/2,80	4,15/5,60	6,22/8,40
12%	2,50/2,37	5,00/4,75	7,50/7,12
14%	2,92/1,95	5,85/3,90	8,77/5,85
15%	3,12/1,75	6,25/3,50	9,37/5,25
16%	3,32/1,55	6,65/3,10	9,97/4,65
18%	3,75/1,12	7,50/2,25	11,25/3,37

A eletroforese foi iniciada com 20 mamperes e mantida até a entrada da frente de bromofenol no gel de separação. Em seguida aumentava-se a corrente para 30 mamperes. Após a corrida o gel foi fixado e corado em solução de metanol 50 %, ácido acético 10 % e Coomassie brilliant blue R-250 0,1 % por 10 minutos. O gel foi descorado em etanol comercial 30 % e ácido acético 10 %. Para a secagem o gel foi colocado entre duas folhas de papel celofane embebidas em água ou ácido acético.

O padrão SDS-6H (SIGMA) continha as seguintes proteínas utilizadas como referência de massa molecular relativa ($M_r \times 10^{-3}$): miosina (205), B-galactosidase (116), fosforilase-B (97,4), albumina bovina (66), ovalbumina (45), anidrase carbônica (29). A calmodulina (21) foi purificada de cérebro bovino e adicionada neste padrão comercial.

V-RESULTADOS

1-Preparação e perfil eletroforético de Miosina V

Pelo método de preparo de miosina V desenvolvido por CHENEY et al (1993) o tampão utilizado contém: Tris-HCl 25 mM pH 8,5 no primeiro passo, abaixando para pH 7,2 nas próximas etapas; EDTA 10 mM usado para quelar íons tais como Mg^{2+} e Ca^{2+} requeridos por proteases; PMSF 0,3 mM como inibidor de proteases que se ligam a grupos com serina; 2-mercaptoetanol 1 mM usado para evitar oxidação de grupos SH e formação de pontes dissulfeto. Todos estes cuidados visam a manutenção das proteínas numa conformação o mais natural possível. O trabalho de extração de miosina V foi realizado o tempo todo em gelo pois baixas temperaturas, juntamente com o uso de PMSF e EDTA, diminuem a ação das proteases. ATP 10 mM foi adicionado a esta solução pois o complexo Mg-ATP auxilia na solubilização de miosina V. Portanto parte da miosina V assim como outras proteínas ficaram no sobrenadante (S_1) enquanto outras juntamente com debris celulares precipitaram (P_1). Este sobrenadante é incubado com NaCl 0,6 M pois a presença deste sal precipita miosina V (P_2). Outras proteínas, como miosina II, continuaram no sobrenadante (S_2). Neste precipitado (P_2) foi adicionado, junto com o tampão, triton 1%. As proteínas do citoesqueleto são insolúveis na presença deste detergente. A maior parte de actina, calmodulina e miosina se precipitam. No próximo passo o precipitado (P_3) é lavado para retirada do triton. precipitado P_4 é uma fração já enriquecida em MV, contendo actina e calmodulina, utilizada para atividade ATPásica. Para se obter uma fração solúvel de miosina V (S_5) adicionou-se em P_4 ATP, Mg^{2+} e alta força iônica (NaCl).

Para esta análise as proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida com SDS e coradas com Coomassie Blue (figura 1).

2-Atividade ATPásica da amostra enriquecida em miosina V (P₄)

O ensaio de atividade Mg-ATPásica foi realizado, como descrito em materiais e métodos, na fração P₄ mostrada na figura 1. A preparação de miosina V de cérebro de coelho apesar de conter em sua composição actina e calmodulina tem sua atividade ATPásica estimulada pela adição de calmodulina e actina exógenas (figura 2).

A figura 3 mostra que a atividade Mg-ATPásica de P₄, contendo actina e calmodulina endógena, foi baixa (aproximadamente 50 nmoles Pi/min./mg) na ausência de calcio e calmodulina exógenos. Quando adicionou-se calcio houve uma estimulação de aproximadamente 50% e acrescentando-se CaM a estimulação atinge 100%. Também foi testado o efeito de clorpromazina, como antagonista de calmodulina, que levou a uma inibição total da estimulação por calmodulina.

3- Perfil eletroforético do veneno de *Apis mellifera* e seu efeito sobre a atividade ATPásica de miosina V

Na eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS o veneno de *Apis mellifera* possui uma banda de peso molecular (20 KD) semelhante ao peso molecular (21 KD) da calmodulina bovina e uma banda grossa de baixo peso molecular que inicialmente pensamos ser melitina mas corresponde a um arraste de peptídeos do veneno que não foram separados por este método de eletroforese (figura 4).

O veneno de *Apis mellifera* causou uma inibição total da estimulação pela calmodulina na atividade Mg-ATPásica da miosina V como demonstrado na figura 3. Este veneno inibiu também a atividade

Mg-ATPásica na ausência de cálcio e calmodulina , na presença de cálcio e de cálcio/calmodulina exógenos (figura 5).

4-Preparo de miosina II de cérebro, músculo esquelético de coxa e coração

A miosina II de músculo esquelético de coxa foi preparada seguindo o protocolo de miosina II cardíaca descrito na metodologia. A figura 6 mostra as cadeias pesadas das miosinas de músculo e coração e também a presença de actina.

5-Atividade ATPásica de miosina II de cérebro, músculo e coração

Os resultados de atividade ATPásica mostrados na figura 7 indicam que o sobrenadante (S_1) de cérebro possui atividade Mg-ATPásica mas não possui atividade K-EDTA ATPásica. O sobrenadante de músculo além de possuir atividade Mg-ATPásica estimulada por Ca^{2+} apresenta também atividade K-EDTA ATPásica. No sobrenadante de coração a atividade Mg-ATPásica não apresentou uma estimulação pelo cálcio, assim como no cérebro, porém demonstrou uma atividade K-EDTA ATPásica menos intensa que a de músculo. Já os precipitados (P_2) de músculo e coração apresentaram uma atividade Mg-ATPásica maior que S_1 e uma alta atividade K-EDTA ATPásica.

6- Perfil eletroforético e atividade Mg-ATPásica de miosina II de músculo esquelético

A figura 8 demonstra que a actina(1) utilizada neste trabalho é pura e que o método da preparação de miosina II de músculo esquelético (dorsal) proporciona uma amostra mais pura (3), livre de actina. O método de preparação de miosina II de músculo esquelético (de coxa) apenas picotando o tecido com tesoura, sem homogeneizar o tecido em tampão (2), é menos eficiente que (3),

porém ainda melhor que a preparação (m) da figura 6 que foi executada homogeneizando-se o tecido.

A atividade Mg-ATPásica da preparação de miosina II de músculo esquelético de coxa (figura 9) sofre estimulação por cálcio e também por actina, sendo muito maior na presença de cálcio e actina juntamente. A adição de 5,8% de veneno de *Apis mellifera* (v1) não provocou inibição da atividade, enquanto que 11,5% de veneno, em relação à concentração de proteína da amostra de miosina, provocou uma inibição da estimulação pela calmodulina.

A atividade Mg-ATPásica de miosina II de músculo esquelético dorsal (figura 10) foi determinada avaliando o efeito do veneno sobre cada nível da atividade. Apesar das variações encontradas não observou-se um efeito marcante do veneno sobre a atividade da miosina purificada.

7-Comparação da atividade Mg-ATPásica da preparação de miosina II de coração de coelho e de rato

A comparação da atividade Mg-ATPásica destas proteínas mostra que a miosina II cardíaca de coelho sofre uma alta inibição de sua atividade por 16% de veneno em relação à concentração de proteína. Já a miosina II de coração de rato não sofre inibição significativa na presença de 5% de veneno em relação à concentração de proteína.

A miosina II de coração de coelho foi preparada como descrito na metodologia de miosina II cardíaca apenas acrescentando-se a solubilização com KCl 1 M e posterior diluição, enquanto que a miosina II de coração de rato foi preparada utilizando-se o mesmo protocolo de miosina V de cérebro.

8-Perfil eletroforético de frações enriquecidas em miosina II de cérebro e coração e miosina V de cérebro

A fração enriquecida em miosina V de cérebro (S_5) indicada como BM-V na figura 12 apresenta uma cadeia pesada na mesma posição de migração que as cadeias pesadas de miosina II de cérebro (BM-II) e coração (HM-II). Entretanto elas podem ser distinguidas pela sua diferente composição de cadeias leves.

9-Purificação de miosina V

As amostras eluídas da coluna de Sephacryl S-500 possuem miosina v além de actina, calmodulina e outras bandas não identificadas como mostra o perfil eletroforético da figura 13 A. As frações contendo miosina V (19 a 24 da figura 13 A) foram reunidas e, após diálise, foram aplicadas em coluna de Q-Sepharose (figura 13 B). A eluição foi feita utilizando-se tampão (ver metodologia) com diferentes concentrações de NaCl: 12 ml foram eluídos com NaCl 0,35 M, em seguida 16 ml com NaCl 0,45 M e finalmente 12 ml com NaCl 1,6 M.

10-Atividade ATPásica de miosina V purificada

O ensaio de atividade Mg-ATPásica foi realizado no pool de frações (17 a 19 da figura 13) eluído da coluna de Q-Sepharose e dializado como mostra a figura 14. Na ausência de actina a atividade foi baixa em todos os níveis. Quando acrescentou-se actina a atividade foi grandemente elevada sendo estimulada por calmodulina, calcio e calcio/calmodulina. A adição de trifluoperazina inibiu a estimulação por calcio/calmodulina enquanto que a adição do veneno de *Apis mellifera* inibiu a estimulação tanto por calcio/calmodulina quanto por calcio somente.

HOMOGENEIZADO DE CÉREBRO

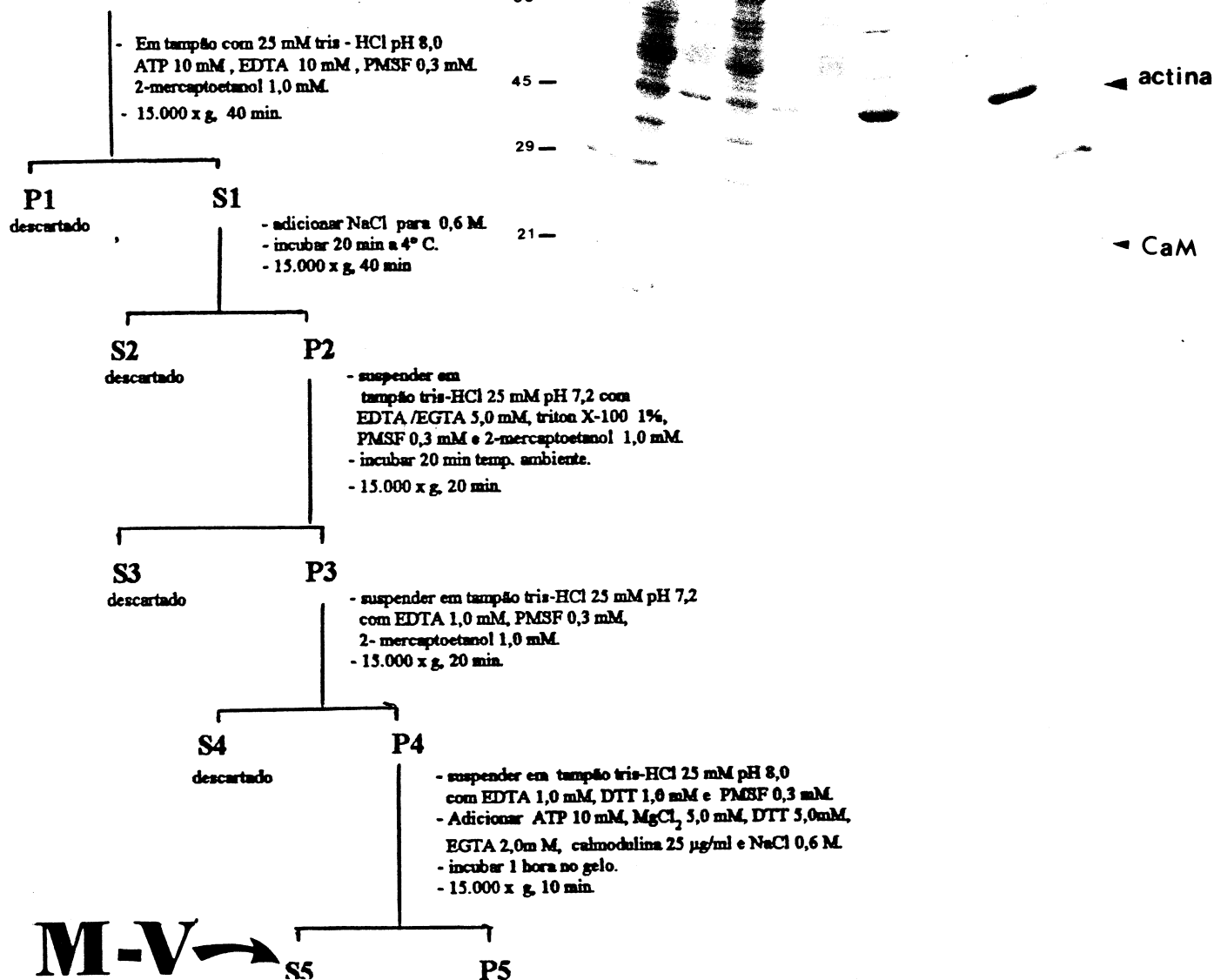


Figura 1: Diagrama e perfil eletroforético da preparação de miosina V.

As amostras estão indicadas na parte superior da figura. S e P referem-se às frações solúveis e sedimentadas. No lado esquerdo da figura estão indicados os marcadores de peso molecular. No lado direito estão indicados miosina V (M-V), actina e calmodulina

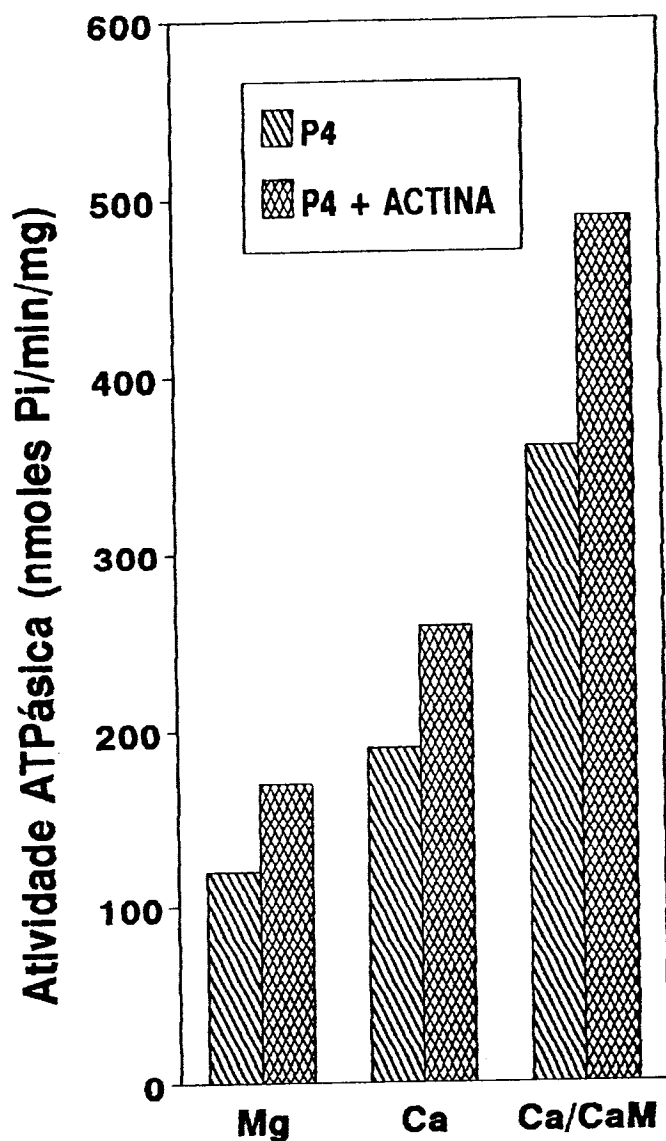


Figura 2: Atividade Mg-ATPásica de fração enriquecida em miosina V (P₄).

O ensaio de atividade Mg-ATPásica foi realizado na fração P₄, mostrada na figura 1, como descrito em materiais e métodos, na presença e ausência de actina. As concentrações de proteína da actina e de P₄ foram respectivamente 53µg e 0,036254 mg/reação.

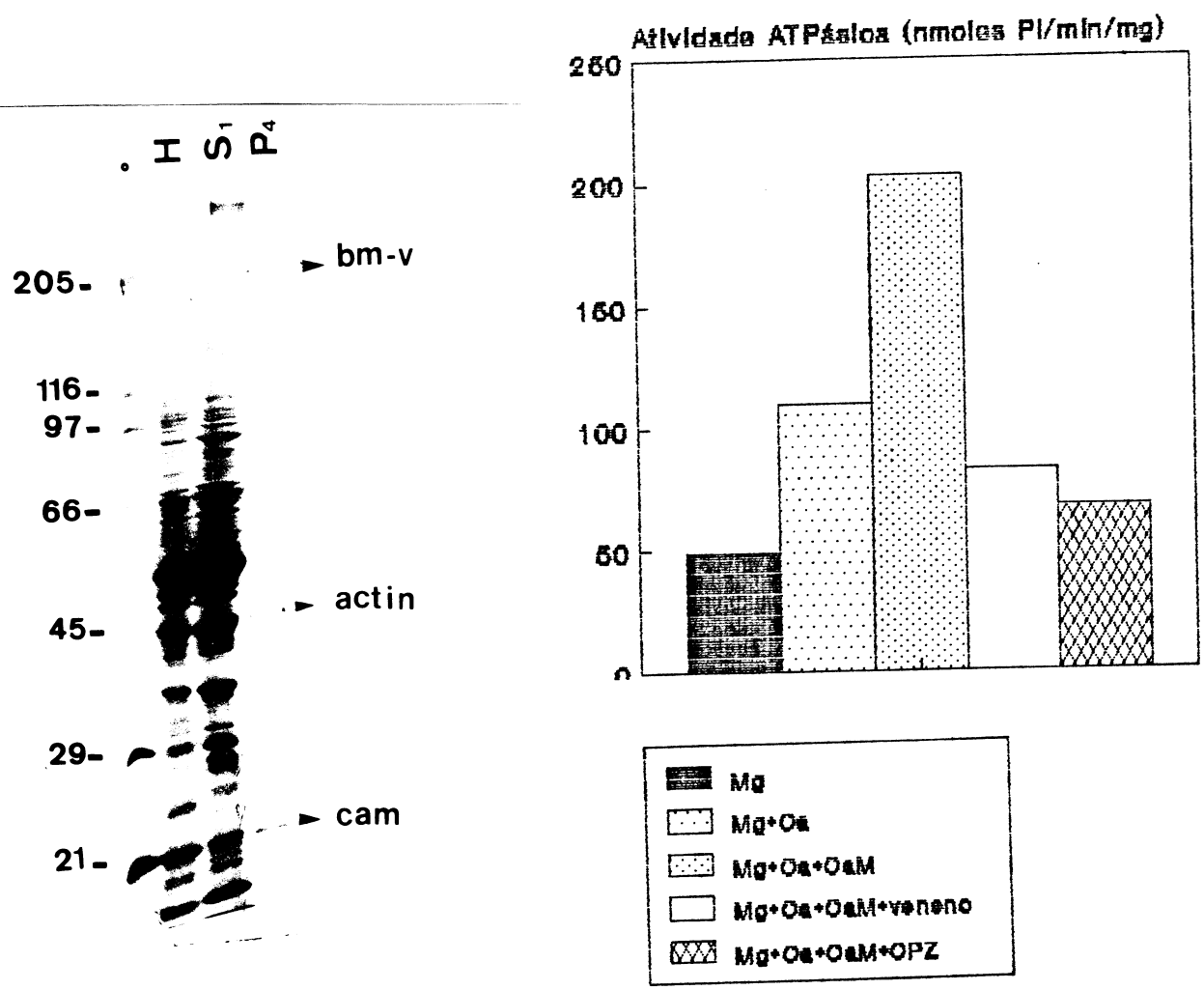


Figura 3: Perfil eletroforético e atividade Mg-ATPásica da amostra enriquecida em miosina V (P_4) na presença de clorpromazina e do veneno de *Apis mellifera*.

Painel da esquerda: H: homogeneizado, S_1 : primeiro sobrenadante, P_4 : amostra enriquecida em miosina V, bm-V: miosina V de cérebro (brain myosin V), CaM: calmodulina. No lado esquerdo estão indicados os marcadores de peso molecular.

Painel da direita: A concentração de proteína do veneno bruto foi 0,92 mg/ml. A concentração de proteína do veneno utilizada foi 12,6% em relação à concentração de proteína da amostra P_4 (0,019

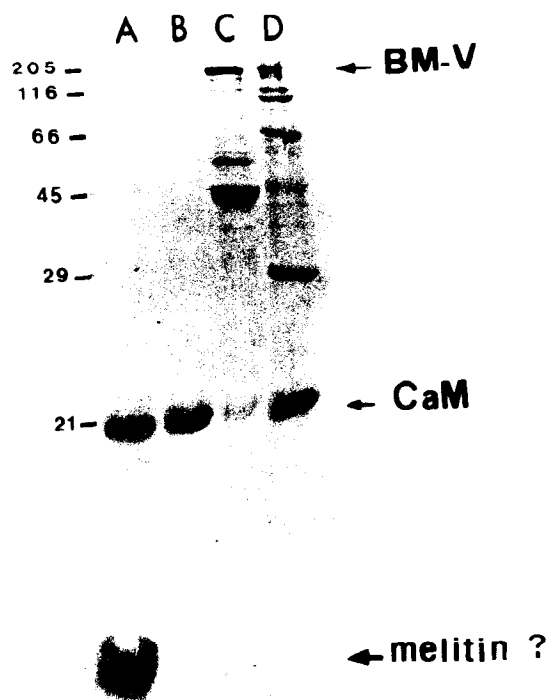


Figura 4: Perfil eletroforético do veneno de *Apis mellifera*, calmodulina e preparação de miosina V.

As amostras estão indicadas na parte superior da figura: A refere-se ao veneno de *Apis mellifera* (2,32 μg), B à calmodulina (10 μg), C à amostra enriquecida em miosina V (1,6 μg) e D ao padrão de peso molecular. No lado esquerdo estão indicados os marcadores de peso molecular. No lado direito estão indicados os principais polipeptídeos.

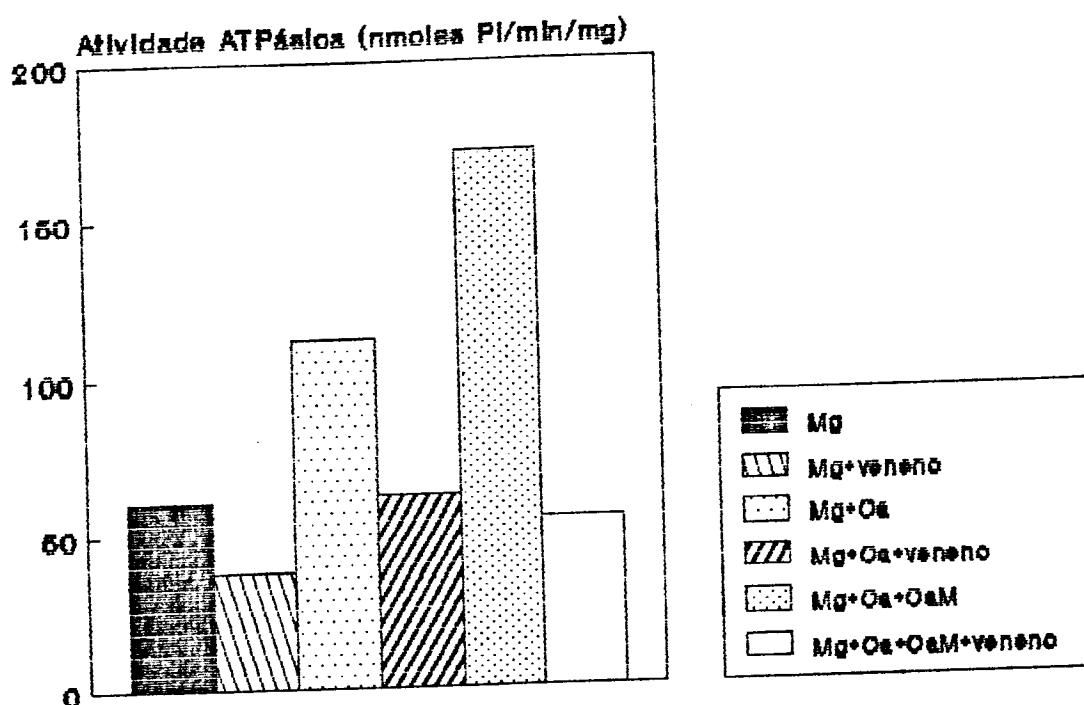


Figura 5: Efeito do veneno de *Apis mellifera* sobre a atividade Mg-ATPásica da preparação enriquecida em miosina V (P_4) de cérebro de coelho.

A concentração de proteína do veneno bruto foi 0,81 mg/ml, sendo a concentração utilizada 29% em relação à concentração de proteína da amostra P_4 . A concentração de proteína da preparação de miosina V foi 0,028 mg/reação.

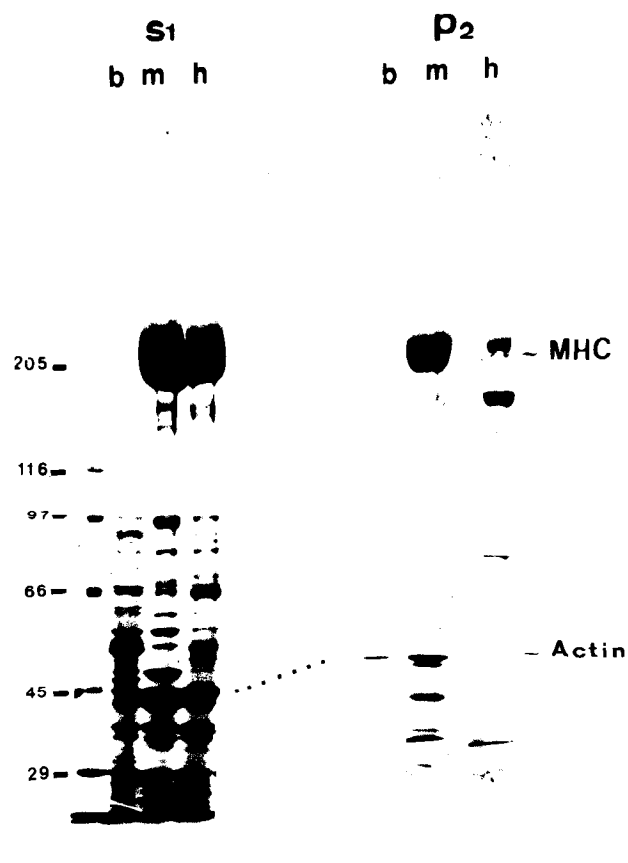


Figura 6: Perfil eletroforético das preparações de miosina II de cérebro, músculo esquelético e coração.

As amostras estão indicadas na parte superior da figura: S₁ refere-se ao primeiro sobrenadante, P₂ ao segundo precipitado, b a miosina II de cérebro, m a miosina II de músculo e h a miosina II de coração. No lado direito da figura está indicado MHC (Myosin Heavy Chain) que refere-se a cadeia pesada da miosina. No lado esquerdo estão indicados os marcadores de peso molecular.

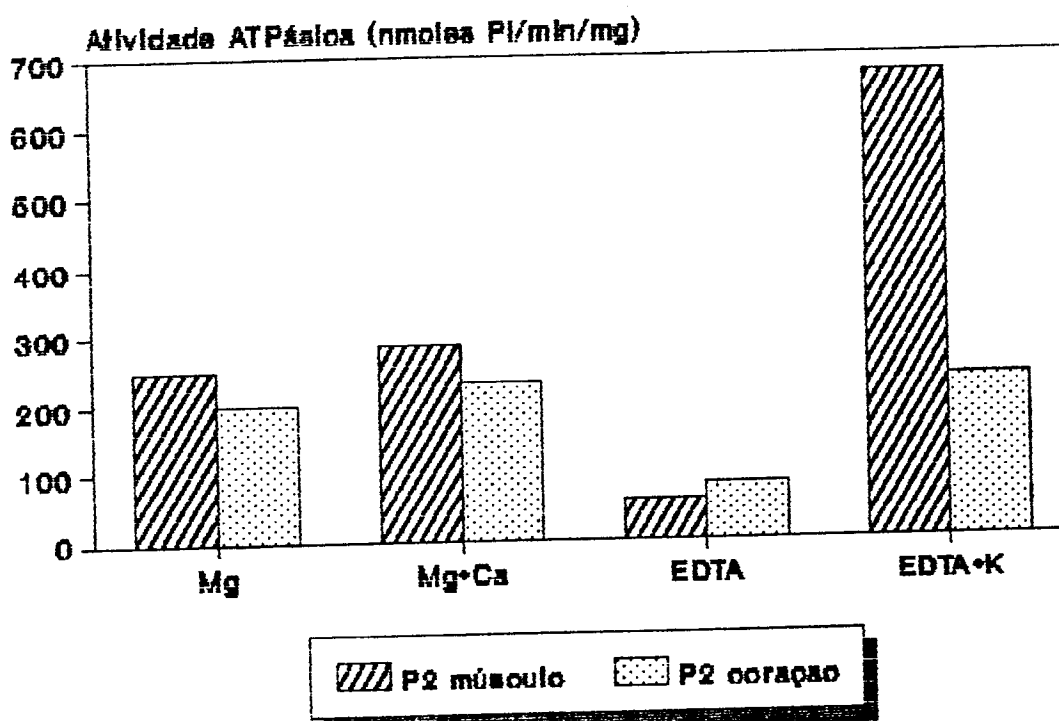
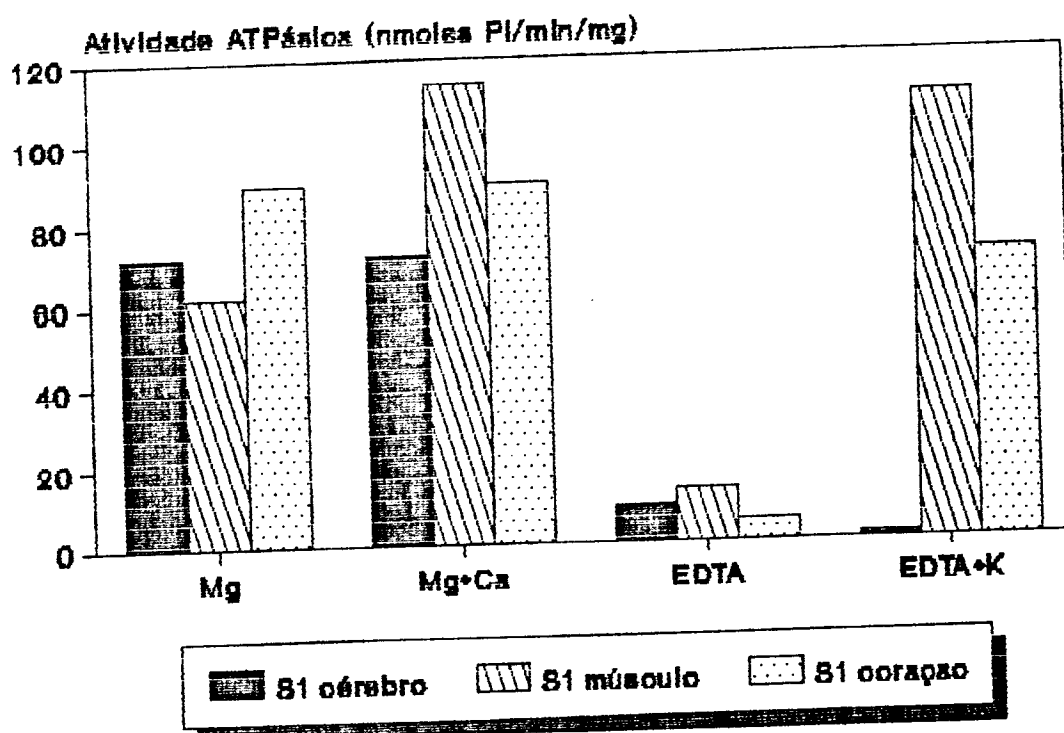


Figura 7: Atividade ATPásica da preparação de miosina II de cérebro, músculo cardíaco e músculo esquelético.

S: sobrenadante, P: precipitado, EDTA: atividade K-EDTA ATPásica com 0,06 M KCl, EDTA + K: atividade K-EDTA ATPásica com 0,6 M KCl. As concentrações de proteína (mg/reação) foram 0,0547 (S₁); 0,062 (S₂); 0,058 (S₃); 0,0408 (P₂); 0,0146 (P₃).

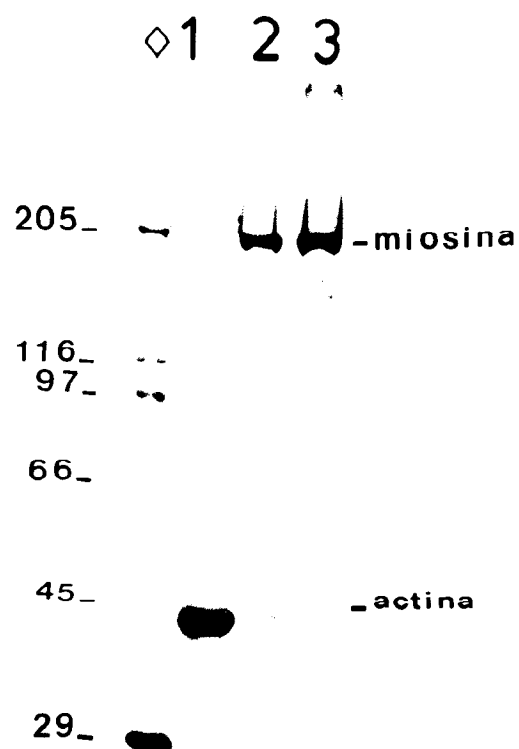


Figura 8: Perfil eletroforético de actina purificada, preparação de miosina II de músculo esquelético de coxa e preparação de miosina II de músculo esquelético dorsal.

As amostras estão indicadas na parte superior da figura: 1 refere-se à actina purificada, 2 à preparação de miosina II de músculo esquelético de coxa, 3 à preparação de miosina II de músculo esquelético dorsal. No lado esquerdo estão indicados os marcadores de peso molecular. No lado direito estão indicados os principais polipeptídeos.

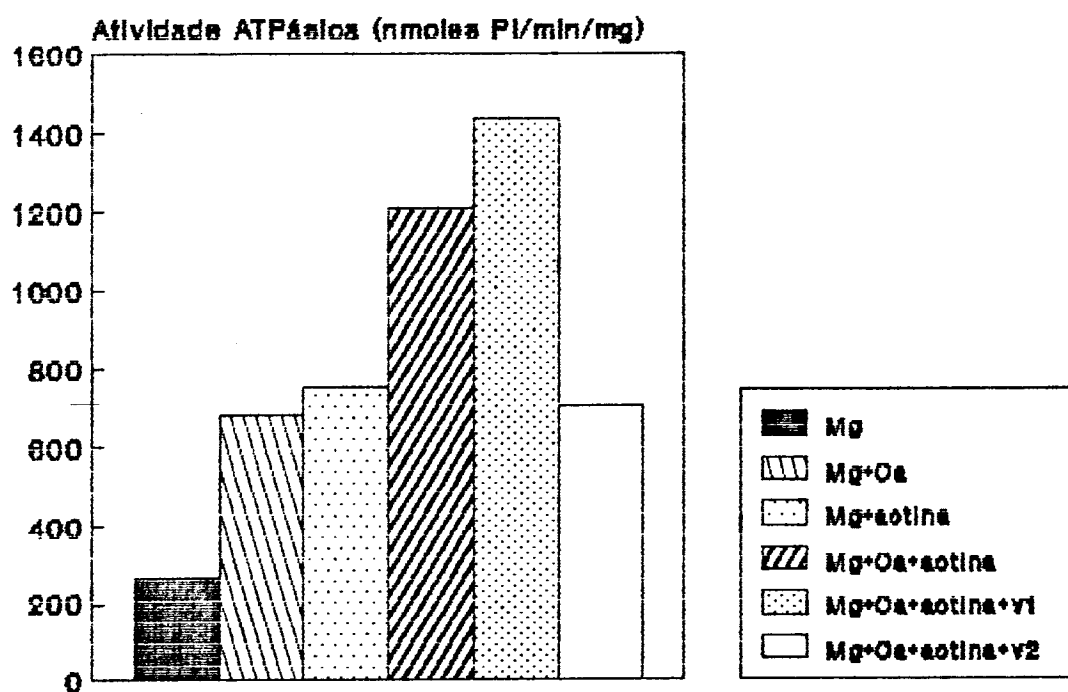


Figura 9: Atividade ATPásica da preparação de miosina II de músculo esquelético de coxa de coelho.

A concentração de proteína do veneno bruto foi 1,3 mg/ml, sendo as concentrações utilizadas 5,8% (v1) e 11,5% (v2) em relação à concentração de proteína da amostra de miosina. As concentrações de proteína da actina e miosina foram respectivamente 53 μ g e 20 μ g/reação.

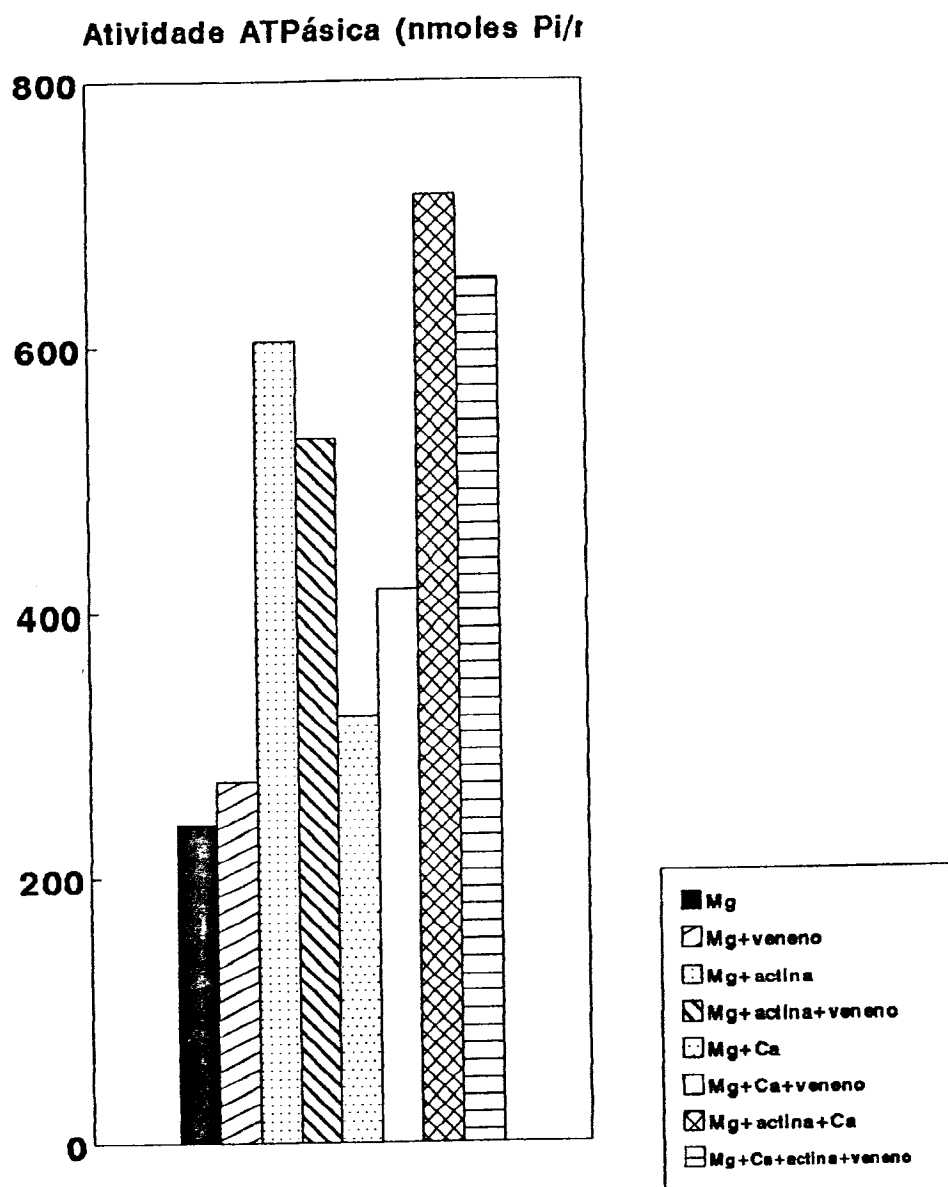


Figura 10: Atividade ATPásica de miosina II de músculo esquelético dorsal de coelho.

A concentração do veneno bruto de *Apis mellifera* foi 0,92 mg/ml, sendo a concentração utilizada 0,86% em relação à concentração de proteína da amostra de miosina. As concentrações de proteína da actina e miosina foram respectivamente 53 µg e 0,024 mg/reação.

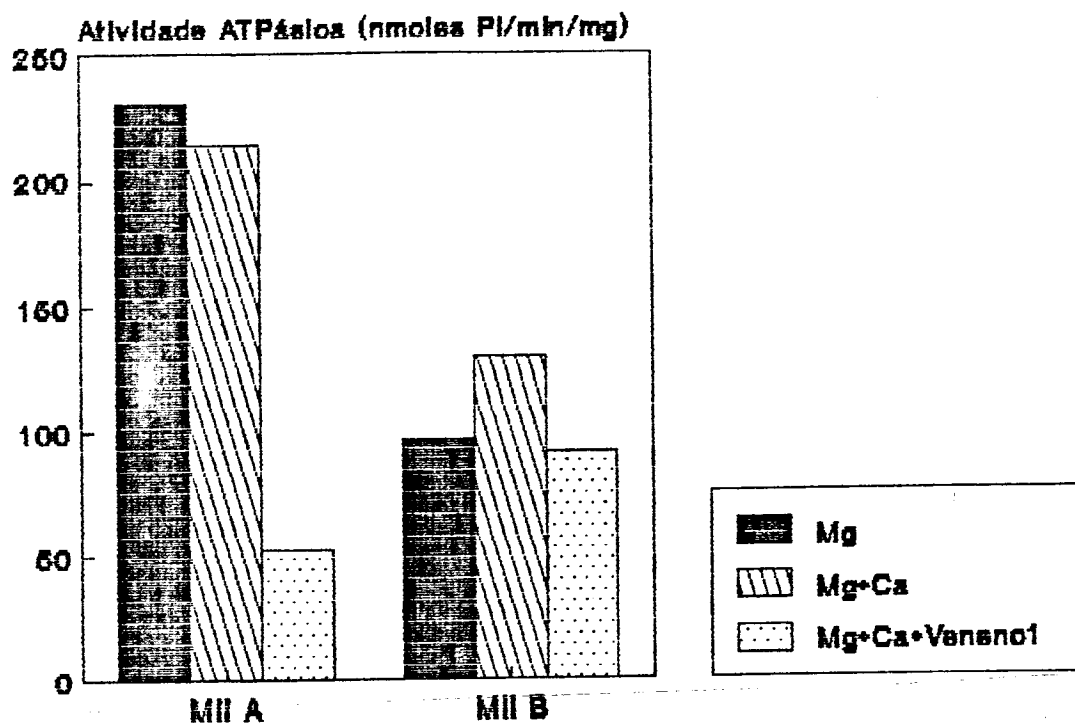


Figura 11: Atividade ATPásica de miosina II de coração de rato e de coelho.

MII A refere-se a miosina II de coração de coelho e MII B refere-se a miosina II de coração de rato. A concentração do veneno bruto de *Apis mellifera* foi 5,22 mg/ml, sendo as concentrações utilizadas cerca de 16% e 5% respectivamente em relação às concentrações de proteína das amostras de miosina de coelho (0,032 mg/reação) e rato (0,1581 mg/reação).

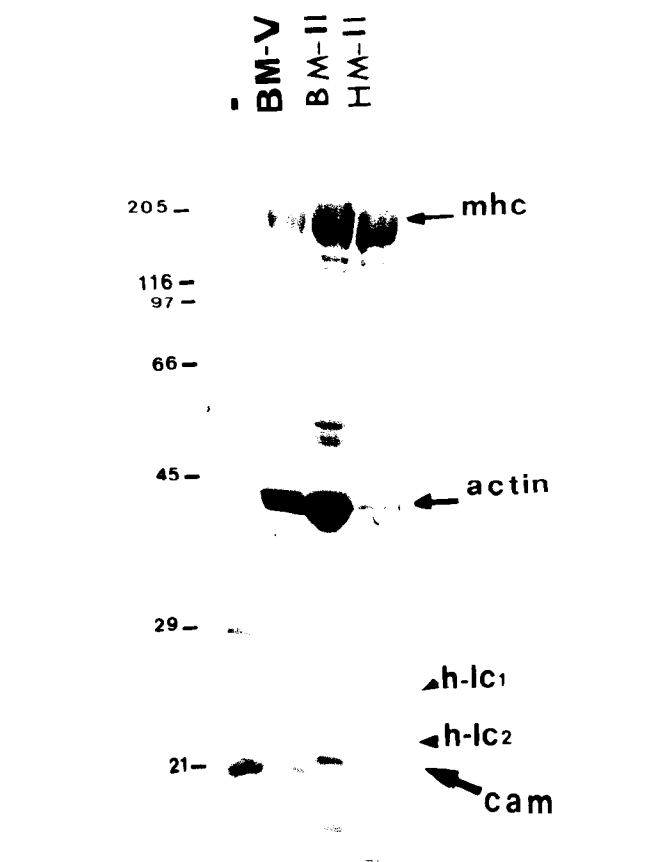


Figura 12: Comparação das cadeias leves de miosina V e miosinas II de cérebro e coração através de perfil eletroforético.

As amostras estão indicadas na parte superior da figura: BM-V refere-se à miosina V de cérebro, BM-II indica miosina II de cérebro e HM-II à miosina II de coração. No lado direito da figura estão indicados os principais polipeptídeos das preparações: mhc (myosin heavy chain) refere-se à cadeia pesada das miosinas, h-Ic₁ e h-Ic₂ são as cadeias leves da miosina II cardíaca e CaM indica calmodulina. No lado esquerdo estão indicados os marcadores de peso molecular.

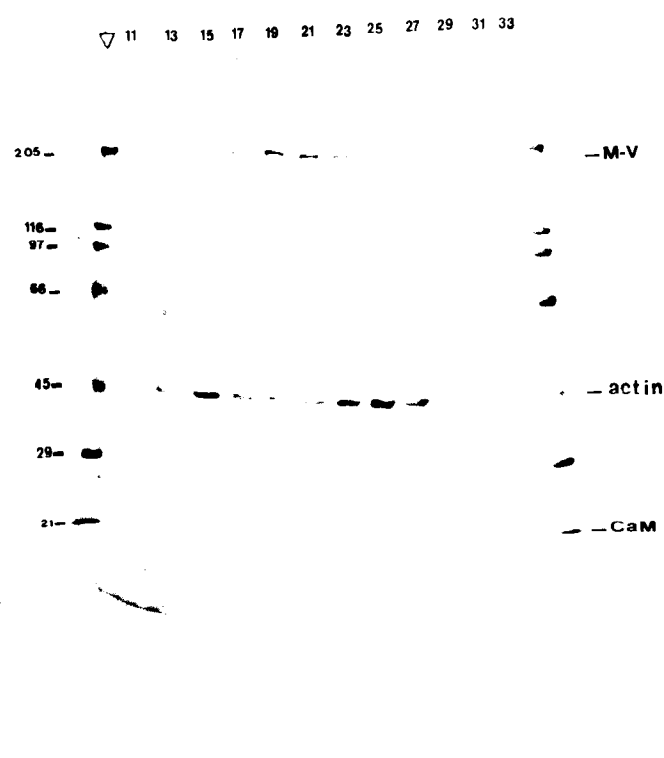
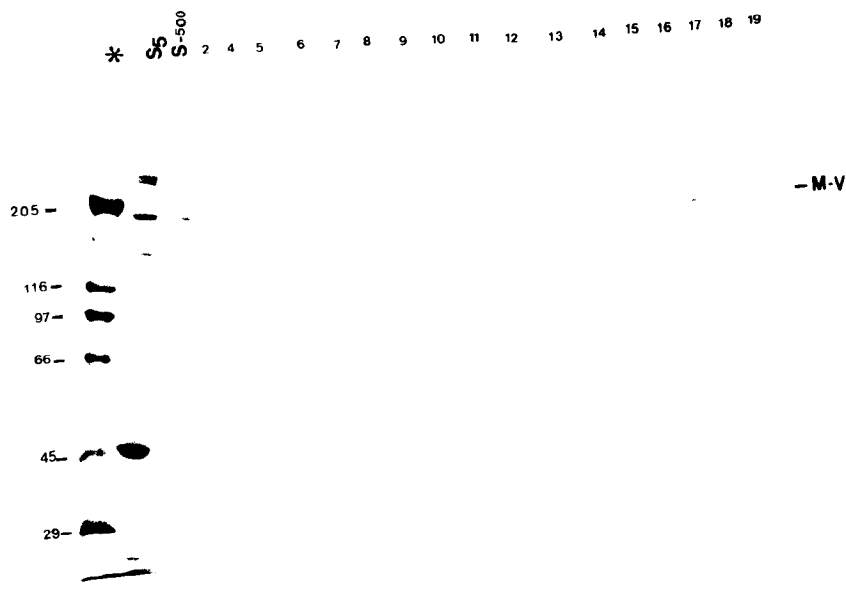


Figura 13: Purificação de miosina V pelo método de Cheney (1993) com algumas modificações.

A)- O sobrenadante S₅ obtido foi aplicado em coluna de Sephacryl S-500 pré-equilibrada como descrito na metodologia de purificação de miosina V. As frações eluídas estão indicadas na parte superior da figura. No lado esquerdo estão indicados os marcadores de peso molecular. No lado direito estão indicados os principais polipeptídeos.



B)- As frações contendo miosina V (19 a 24 fig.A) foram reunidas e, após diálise, foram aplicadas em coluna de Q-sepharose. As frações eluídas estão indicadas na parte superior da figura. S₅ refere-se ao sobrenadante enriquecido em miosina V, S₅₀₀ indica o pool dializado de frações eluídas da coluna de Sephacryl S-500 e ao padrão de peso molecular. No lado esquerdo estão indicados os marcadores de peso molecular. Miosina V (M-V) está indicada no lado direito da figura.

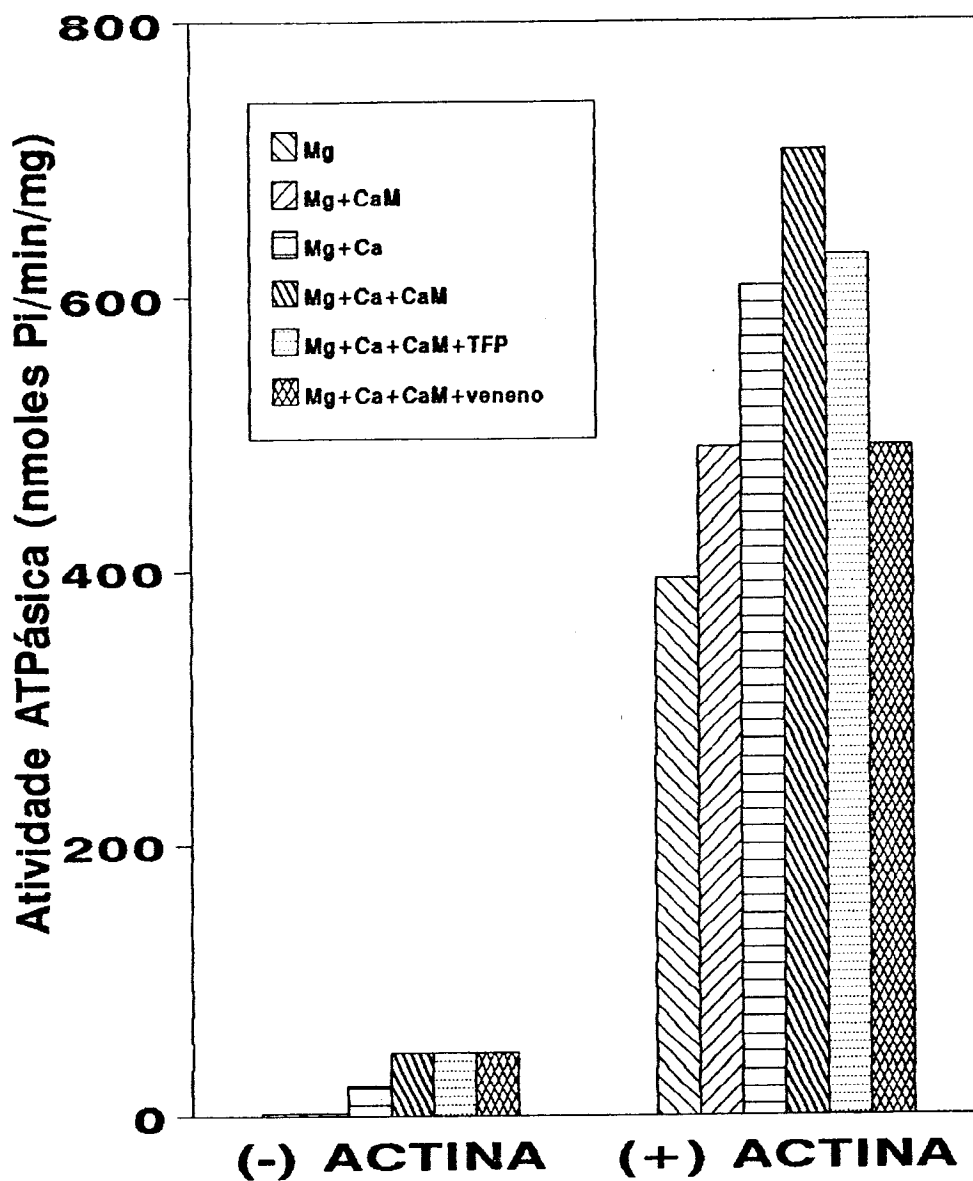


Figura 14: Atividade Mg-ATPásica de miosina V purificada.

Esta atividade foi ensaiada na ausência(-) e presença(+) de actina. A concentração do veneno bruto de *Apis mellifera* foi 1,3 mg/ml, sendo a concentração utilizada 303% em relação à concentração de miosina V (0,00428 mg/reacção). As concentrações de trifluoperazina (TFP) e de actina foram respectivamente 50 μ M e 53 μ g/reacção.

VI-DISCUSSÃO

Como o cálcio extracelular está envolvido com a estabilização da membrana não é surpresa que a ação da melitina é influenciada pelo cálcio. Porém pode ser por uma interação específica pois foi demonstrado que a melitina formar um complexo 1:1 com a calmodulina (proteína regulatória de cálcio) isolada de cérebro bovino (COMTE et al, 1983 apud BANKS & SHIPOLINI, 1986). A afinidade entre calmodulina e melitina é 10^3 vezes maior que com outros peptídeos, hormônios como ACTH, glucagon ou substância P e a associação intracelular com calmodulina pode ser uma das causas de morte celular se a melitina atravessar as membranas celulares. Funcionalmente, melitina bloqueia a ativação normal da fosfodiesterase de cérebro pela calmodulina (BANKS & SHIPOLINI, 1986). Devido a estes fatos relatados a idéia inicial deste trabalho foi testar a influência do veneno de *Apis mellifera* na atividade ATPásica de miosina V e utilizar outras miosinas tanto para controle como para verificar a especificidade da influência do veneno sobre estas miosinas.

Os resultados mostram que em todos os ensaios de atividade ATPásica de miosina V o veneno causou uma inibição total da estimulação por calmodulina, o que leva a pensar que o veneno possa conter algum componente que interfere na ação da calmodulina. Um desses componentes possivelmente pode ser a melitina atuando na calmodulina. A melitina forma um complexo 1:1 com a calmodulina. A afinidade entre calmodulina e melitina é 10^3 vezes maior que com outros peptídeos, hormônios como ACTH, glucagon ou substância P. Funcionalmente, melitina bloqueia a ativação normal da fosfodiesterase de cérebro pela calmodulina (BANKS & SHIPOLINI, 1986). Na figura 5 o veneno também inibiu a

atividade na presença só de magnésio e só de cálcio o que não inviabiliza a hipótese lançada pois miosina V contém calmodulina endógena como cadeia leve. Em miosina V purificada o veneno inibiu a estimulação por cálcio e por cálcio/calmodulina porém a análise se torna difícil pois a quantidade de veneno utilizada foi muito alta..

Segundo CHENEY et al (1993) o efeito estimulatório do cálcio na atividade Mg-actina-ATPase da miosina V pode ser resultante tanto de um efeito regulatório direto do cálcio na miosina V ou de um processo indireto como o cálcio estimulando a fosforilação. Regulação direta pelo cálcio é conhecida em miosina II de músculo de molusco, onde as cadeias leves reprimem a atividade ATPásica antes da ligação do cálcio. É possível que a ligação direta do cálcio a uma ou mais cadeias leves de miosina V tenha o mesmo papel. Portanto outra hipótese é que o veneno pode estar atuando em algum fator regulatório da atividade ATPásica de miosina V.

Quando o veneno foi utilizado na atividade ATPásica da amostra enriquecida em miosina II de músculo esquelético de coxa (fig. 9) foi observada uma inibição da estimulação por cálcio/actina quando utilizado em uma quantidade de 11,5% em relação à concentração de proteína. Com 5,8% não foi observada inibição. Entretanto em miosina de músculo dorsal não houve alteração significativa pelo veneno. O veneno também inibiu a estimulação por cálcio de miosina cardíaca. Estas miosinas foram preparadas por diferentes métodos, interferindo no grau de purificação de cada uma, o que pode justificar as diferentes respostas. Além disto elas diferem entre si em suas cadeias leves mostrando que a atuação do veneno pode ser sobre a calmodulina e sobre as próprias cadeias leves destas miosinas II.

VII- CONCLUSÃO

O preparo de frações enriquecidas e purificadas de miosinas é possível através da adequação das metodologias utilizadas às condições do laboratório de bioquímica da UFU.

Para confirmar a influência do veneno de *Apis mellifera* sobre a atividade ATPásica das miosinas é necessário em experimentos futuros repetir os ensaios de ATPase com concentrações variadas de veneno, além de testar suas frações purificadas já que neste trabalho usou-se apenas veneno bruto tornando difícil a análise desta atuação.

VIII-REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- ADELSTEIN, R. S. & EISENBERG, E. 1980. Regulation and kinetics of actin-myosin-ATP interaction. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 921-956.
- ASH, J. F. 1975. Purification and characterization of myosin from the clonal rat glial strain c-6. *J. Biol. Chem.* 250: 3560-3566.
- BANKS, B. E. C. & SHIPOLINI, R. A. 1986. Chemistry and Pharmacology of Honey-bee Venom. In: PIEK, T. 1986. **Venoms of the Hymenoptera.** 329-416. Copyright by Academic Press Inc.(London) Ltd.
- BOUVAGNET, P.; NEVEU, S.; MONTOYA, M.; LEGER, J. J. 1987. Developmental changes in the human cardiac isomyosin distribution: An immunohistochemical study using monoclonal antibodies. *Circ. Res.* 61: 329-336.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- BURRIDGE, K. & BRAY, D. 1975. Purification and structural analysis of myosins from brain and other non-muscle tissues. *J. Mol. Biol.* 99: 1-14.

- CHENEY, R. E. & MOOSEKER, M. S. 1992. Unconventional myosins. *Curr. Op. Cell. Biol.* 4: 27-35 apud CHENEY, R. E.; O'SHEA, M. K.; HEUSER, J. E. ; COELHO, M. V.; WOLENSKI, J. S.; ESPREAFICO, E. M.; FORSCHER, P.; LARSON, R. E.; MOOSEKER, M. S. 1993. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell.* 75: 13-23.
- CHENEY, R. E.; O'SHEA, M. K.; HEUSER, J. E. ; COELHO, M. V.; WOLENSKI, J. S.; ESPREAFICO, E. M.; FORSCHER, P.; LARSON, R. E.; MOOSEKER, M. S. 1993. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell.* 75: 13-23.
- CITI, S. & KENDRICK-JONES, J. 1987. Regulation of non-muscle myosin structure and function. *Bioessays.* 7: 155-164.
- COOKE, R. & FRANKS, K. 1980. All myosin heads form bonds with actin in rigor rabbit skeletal muscle. *Biochemistry.* 19: 2265-2269 apud FERRO, J. A. 1983. Purificação de miosina de cérebro de coelho: estudos de interação com actina de músculo esquelético e de cérebro e comparação estrutural e enzimática com miosina de aorta. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- DAWSON, C. R.; DRAKE, A. F.; HELLIWELL, J.; HIDER, R. C. 1978. The interaction of bee melittin with lipid bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 510: 75-86 apud DOTIMAS, E. M. & HIDER, R. C. 1987. Honeybee venom. *Bee world.* 68: 51-70.

EISENBERG, E. & MOOS, C. 1968. The adenosine triphosphatase activity of acto-heavy meromyosin. A kinetic analysis of actin activation. *Biochemistry*. 7: 1486-1489 apud FERRO, J. A. 1983. Purificação de miosina de cérebro de coelho: estudos de interação com actina de músculo esquelético e de cérebro e comparação estrutural e enzimática com miosina de aorta. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

EISENBERG, E. & MOOS, C. 1970. Actin activation of heavy meromyosin adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 245: 2451-2456 apud FERRO, J. A. 1983. Purificação de miosina de cérebro de coelho: estudos de interação com actina de músculo esquelético e de cérebro e comparação estrutural e enzimática com miosina de aorta. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

ESPINDOLA, F. S. 1991. Purificação parcial e caracterização de uma proteína ligante de calmodulina associada com actomiosina de cérebro. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

ESPINDOLA, F. S.; ESPREAFICO, E. M.; COELHO, M. V.; MARTINS, A. R.; COSTA, F. R. C.; MOOSEKER, M. S. & LARSON, R. E. 1992. Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: A novel calmodulin-binding myosin. *J. Cell Biology*. 118: 359-368.

ESPREAFICO, E. M.; CHENEY, R. E.; MATTEOLI, M.; NASCIMENTO, A. A. C.; DE CAMILLI, P. V.; LARSON, R. E.; MOOSEKER, M. S. 1992. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J. Cell Biology*. 119: 1541-1557.

FERRO, J. A. 1983. Purificação de miosina de cérebro de coelho: estudos de interação com actina de músculo esquelético e de cérebro e comparação estrutural e enzimática com miosina de aorta. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

FERRO, J. A. & LARSON, R. E. 1987. Calcium/calmodulin regulation of ATPase activity and endogenous phosphorylation of mammalian brain actomyosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145: 1217-1224.

GORDON, D. J.; EISENBERG, E.; KORN, D. 1976. Characterization of cytoplasmic actin isolated from *Acanthamoebae castellanii* by a new method. *J. Biol. Chem.* 251: 4778-4786 apud FERRO, J. A. 1983. Purificação de miosina de cérebro de coelho; estudos de interação com actina de músculo esquelético e de cérebro e comparação estrutural e enzimática com miosina de aorta. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

- GORDON, D. J.; BOYER, J. L.; KORN, E. D. 1977. Comparative biochemistry of non-muscle actins. *J. Biol. Chem.* 252: 8300-8309 apud FERRO, J. A. 1983. Purificação de miosina de cérebro de coelho: estudos de interação com actina de músculo esquelético e de cérebro e comparação estrutural e enzimática com miosina de aorta. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- HABERMANN, E.; KOWALLEK, H. 1970. Modifikation der Aminogruppen und des Tryptophans in Melittin als Mittel zur Erkennung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen. *Hoppe-Seyler' Zeitschrift für Physiologische Chemie.* 351: 884-890 apud DOTIMAS, E.M. & HIDER, R. C. 1987. Honeybee venom. *Bee world.* 68: 51-70.
- HABERMANN, E. 1972. Bee and wasp venoms: The biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. *Science.* 177: 314-322 apud BANKS, B. E. C. & SHIPOLINI, R. A. 1986. Chemistry and Pharmacology of Honey-bee Venom. In: PIEK, T. 1986. *Venoms of the Hymenoptera.* 329-416. Copyright by Academic Press Inc.(London) Ltd.
- HEINONEN, J. J. & LAHTI, R. J. 1981. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal. Biochem.* 113: 313-317.
- HIDER, R. C. ; KHADER, F. ; TATHAM, A. S. 1983. Lytic activity of monomeric and oligomeric melittin. *Biochimica et Biophysica Acta.* 728: 206-214 apud DOTIMAS, E. M. & HIDER, R. C. 1987. Honeybee venom. *Bee world.* 68: 51-70.

- HIRZEL, H. O.; TUCHSCHMID, C. R.; SCNEIDER, J.; KRAYENBUEHL, H. P. & SCHAUB, M. C. 1985. Relationship between myosin isoenzyme composition hemodynamic, and myocardial structure in various forms of human cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 57: 729-740.
- JOHNSTON, G. C.; PRENDERGAST, J. A.; SINGER, R. A. 1991. The *Saccharomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J. Cell Biol.* 113: 539-551
apud CHENEY, R. E.; O'SHEA, M. K.; HEUSER, J. E. ; COELHO, M. V.; WOLENSKI, J. S.; ESPREAFICO, E. M.; FORSCHER, P.; LARSON, R. E.; MOOSEKER, M. S. 1993. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell.* 75: 13-23.
- JONHSON, K. A. 1985. Pathways of the microtubule-dynein ATPase and the structure of dynein: A comparison with actomyosin. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14: 161-188.
- KOMURO, I.; NOMOTO, K.; SUGIAMA, T.; KURABAYASHI, M.; TAKAKU, F.; YASAKI, Y. 1987. Isolation and characterization of myosin heavy chain isozymes of the bovine conduction system. *Circ.Res.* 61: 859-865.
- KORN, E. D. & HAMMER, III. J. A. 1988. Myosin of nonmuscle cells. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17: 23-46.
- LAEMMLI, V. K. & FAVRE, M. 1973. Maturation of the head of Bacteriophage T₄. *J. Mol. Biol.* 80: 575-599.

- LARSON, R. E.; PITTA, D. E.; FERRO, J. A. 1988. A novel 190 kDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 21: 213-217.
- MATSUMURA, S.; KUMON, A. & CHIBA, T. 1985. Proteolytic substructure of brain myosin. *J. Biol. Chem.* 260: 1959-1966.
- MATSUMURA, S.; TAKASHIMA, T.; OHMORI, H. & KUMON, A. 1988. The effects of phosphorylation and dephosphorylation of brain myosin on its actin-activated Mg^{2+} -ATPase and contractile activities. *J. biochem.* 103: 237-246.
- MALIK, M. N.; FENKO, M. D.; SCOTTO, S.; MERZ, P.; ROTHMAN, J.; TUZIO, H. & WISNIEWSKI, H. M. 1983. Purification and Characterization of myosin from calf brain. *J. Neurochem.* 40: 1620-1629.
- MERCADIER, J. J.; BOUVERET, P.; GORZA, L.; SCHIAFFINO, S.; CLARK, W. A.; ZAK, R.; SWYNGHEDAUW, B. & SCHATZ, K. 1983. Myosin isoenzymes in normal and hypertrophied human ventricular myocardium. *Circ. Res.* 53: 52-62.
- MERCER, J. A.; SEPERACK, P. K.; STROBEL, M. C.; COPELAND, N. G. & JENKINS, N. A. 1991. Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature.* 349: 709-713; 352, 547 apud CHENEY, R. E.; O'SHEA, M. K.; HEUSER, J. E. ; COELHO, M. V.; WOLENSKI, J. S.; ESPREAFICO, E. M.; FORSCHER, P.; LARSON, R. E.; MOOSEKER, M. S. 1993. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell.* 75: 13-23.

MOOSEKER, M. 1993. A multitude of myosins. *Curr. Biol.* 3: 245-248.

NADAL-GINARD, B. & NAHDAVI, V. 1989. Molecular basis of cardiac performance. *J. Clin Invest.* 84: 1693-1700.

NEUMANN, W. & HABERMANN, E. 1954. Beiträge zur Charakterisierung der Wirkstoffe des Bienengiftes. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol.* 222: 367-387 apud BANKS, B. E. C. and SHIPOLINI, R. A. 1986. Chemistry and Pharmacology of Honey-bee Venom. In: PIEK, T. 1986. *Venoms of the Hymenoptera.* 329-416. Copyright by Academic Press Inc. (London) Ltd.

REISLER, E. 1980. Kinetic studies with synthetic myosin minifilaments show the equivalence of actomyosin and acto-HMM ATPases. *J. Biol. Chem.* 255: 9541-9544 apud FERRO, J. A. 1983. Purificação de miosina de cérebro de coelho: estudos de interação com actina de músculo esquelético e de cérebro e comparação estrutural e enzimática com miosina de aorta. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

RIZZINO, A. A.; BAROUCH, W. W.; EISENBERG, E.; MOOS, C. 1970. Actin-heavy meromyosin binding. Determination of binding stoichiometry from adenosine triphosphatase kinetic measurements. *Biochemistry.* 9: 2402-2408 apud FERRO, J. A. 1983. Purificação de miosina de cérebro de coelho: estudos de interação com actina de músculo esquelético e de cérebro e comparação estrutural e enzimática com miosina de aorta. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

- RUPP, H.; BERGER, H-J.; PFEIFER, A.; WERDAN, K. 1991. Effect of positive inotropic agents on myosin isozyme population and mechanical activity of cultured rat heart myocytes. *Circ. Res.* 68: 1164-1173.
- SEE, Y. P. & METUZALS, J. 1976. Purification and Characterization of squid brain myosin. *J. Biol. Chem.* 252: 7682-89.
- SLEEP, J. A.; HACKNEY, D. D.; BOYER, P. D. 1980. The equivalence of phosphate oxygens for exchange and the hydrolysis characteristics revealed by the distribution of (^{18}O)Pi species formed by myosin and actomyosin ATPase. *J. Biol. Chem.* 255: 4094-4099 apud FERRO, J. A. 1983. Purificação de miosina de cérebro de coelho: estudos de interação com actina de músculo esquelético e de cérebro e comparação estrutural e enzimática com miosina de aorta. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- STRYER, L. 1992. *Bioquímica*. 753-776. Guanabara Koogan S. A.
- STUDIER, F. W. 1973. Analysis of Bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.* 79: 237-248.
- TANAKA, E.; FUKUNAGA, K.; YAMAMOTO, H.; IWASA, T.; MIYAMOTO, E. 1986. Regulation of the actin-activated Mg-ATPase of brain myosin via phosphorylation by the brain Ca^{2+} , calmodulin-dependent protein kinases. *J. Neurochem.* 47: 254-261.

VOGT, W.; PATZER, P.; LEGE, L.; OLDIGS, H.; WILLE, G. 1970. Sinergism between phospholipase A and various peptides and SH-reagentes in causing haemolysis. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv Für Pharmakologie* 265: 442-454 apud DOTIMAS, E. M. & HIDER, R. C. 1987. Honeybee venom. *Bee world*. 68: 51-70.

WARRICK, H. M. & SPUDICH, J. A. 1987. Myosin structure and function in cell motility. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3: 379-421.