

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Ligação de Miosina V de Citosol de Cérebro bovino em
coluna Q-sepharose**

Rogério de Freitas Lacerda

Uberlândia – MG
Junho – 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Ligação de Miosina V de Citosol de Cérebro bovino em
coluna Q-sepharose**

Rogério de Freitas Lacerda

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas.

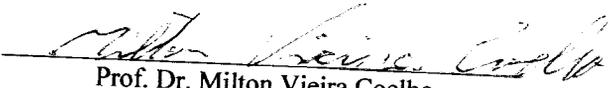
Uberlândia – MG
Junho - 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Ligação de Miosina V de Citosol de Cérebro bovino em
coluna Q-sepharose**

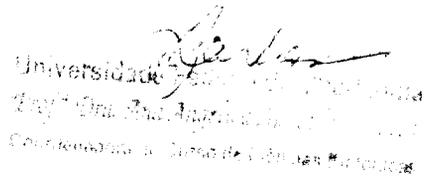
Rogério de Freitas Lacerda

Aprovado Pela Banca Examinadora Em 24/06/04 Nota 10


Prof. Dr. Milton Vieira Coelho
(Orientador)

Prof. Msc. Luiz Fernando Moreira Izidoro
(Conselheiro)

Prof. Msc. Gilvan Caetano Duarte
(Conselheiro)


Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Conselheiro do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia, 29 de Junho de 2004.

*Aos meus pais, Joaquim Pedro Ribeiro
Lacerda e Maria Carmem de Freitas
Lacerda*

Aos meus irmãos, Ricardo e Thais

A Suzana Cássia Cândida Vitorino

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Milton Vieira Coelho, pelo seu apoio e orientação.

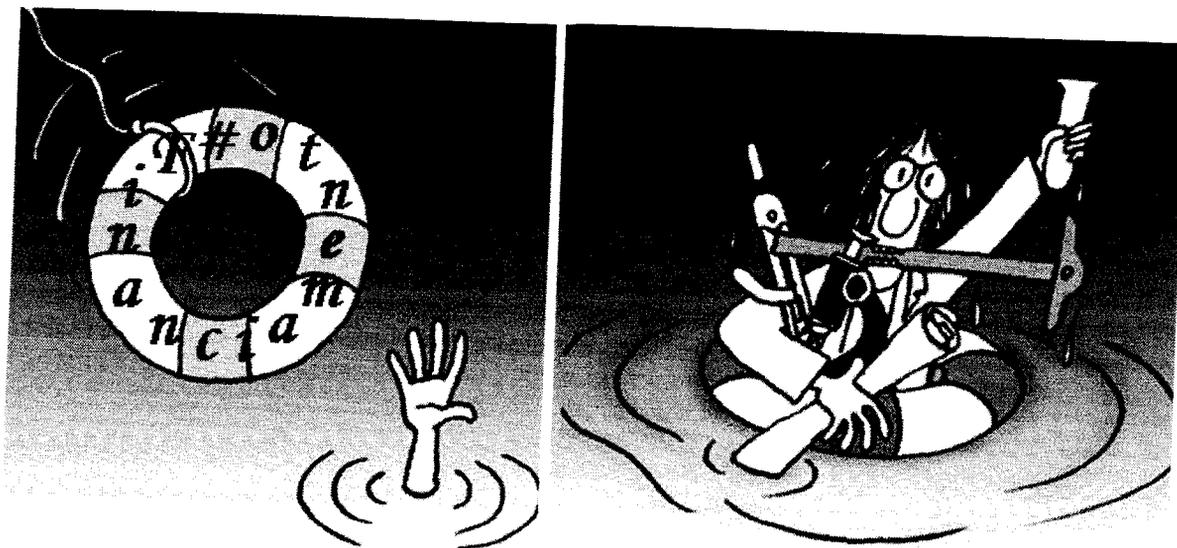
Aos amigos de laboratório: Hugo, Vinícius (vivi), Gabriel (docinho), Ademilton (papi), Morum (Johnny bravo), Decivaldo (Vicentin – Parrudo) e Dona Maura.

A secretária e amiga de instituto: Marlene.

A todos os amigos de faculdade e instituto.

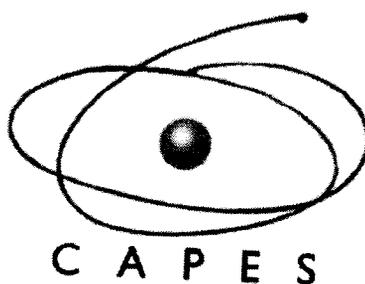
A todos aqueles, muito obrigado, por terem me ensinado, me confortado, me feito companhia, enfim participaram da minha história de vida, cada um tendo o seu papel e função, que apesar de não citado o nome de todos podem ter certeza que não são palavras que irão expressar a minha maior gratidão e satisfação de ter convivido com todos. . .

HUMOR



Extraído do Jornal da Ciência nº 490, 20/09/2002 e modificado em 22/06/2004.

APOIO:



Frigorífico Real

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADP	Adenosina-5'-difosfato
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
BSA	Soro albumina bovina
CAM	Calmodulina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Etileno Glicol-bis (β -aminoetil éter) N, N, N',N'- ácido tetracético
Imidazol	1,3-Diaza-2,4-ciclopendatieno
kDa	Kilodaltons
PPi	Pirofosfato inorgânico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
SNARE	Receptor SNAP
SNAP	Proteína de associação de sinaptossomas
TEMED	N, N, N', N'-tetrametilenodiamino
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
VAMP	Proteína de membrana de associação de vesículas

RESUMO

Os resultados deste trabalho mostram a comparação de ensaios com cérebro bovino submetidos à 3 condições, mantendo o pH 8,0 acrescentado ou não pirofosfato 100 mM e alterando o pH para 9,0. Foi homogeneizado cerca de 1 g de cérebro em 10 mL de tampão de extração. O homogeneizado foi centrifugado a 45.000 x g durante 40 minutos a 4 ° C. A fração S1, dos três ensaios foi aplicada em coluna Q-Sepharose. Para amostras com pH 8,0 obtivemos uma retenção de grande número de polipeptídios e conseqüentemente proteína, juntamente com polipeptídio com mobilidade em SDS semelhante à miosina V. Nos eluatos com NaCl 250 mM observamos dentre outros o polipeptídio de interesse com pequena atividade ATPásica que não é recuperada após diálise. Ao passo que polipeptídio em torno de 83, 31, 30 e 23 kDa juntamente com outros de 43 e 47 kDa são evidentes nos eluatos com 500 mM de NaCl, sem atividade Mg^{2+} -ATPásica. O ensaio com pH 9,0 obteve similar perfil em SDS-PAGE, contudo houve pouca retenção de proteínas e os eluatos com 250 mM de NaCl mesmo tendo um polipeptídio com peso molecular igual a miosina V, não foi verificada atividade ATPásica. Se tratando do ensaio com pH 8,0 e pirofosfato houve pouca retenção de polipeptídios. Neste caso apenas os eluatos com 500 mM de NaCl obtiveram resultados expressivos e similares aos dois ensaios anteriores, salve as exceções dos polipeptídios em torno de 66 e 43 kDa. O eluatos do ensaio com pH 8,0 e pirofosfato não obtiveram atividade, como se era esperado. No caso do ensaio com pH 9,0 foi reaplicado o void novamente em coluna Q-sepharose obtendo quase completa retenção de proteínas e atividade nula, com concomitante retenção do polipeptídio com motilidade similar a miosina V.

Palavras-chave: ATPase, Miosina-V, Q-sepharose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. MIOSINAS.....	4
2. OBJETIVO.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
<i>REAGENTES.....</i>	12
<i>PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO ATPASE.....</i>	12
<i>MÉTODO DE DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....</i>	13
<i>ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....</i>	13
<i>Determinação do peso molecular.....</i>	14
<i>WESTERN BLOTTING.....</i>	14
<i>DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ADENOSINA TRIFOSFATÁSICA.....</i>	15
<i>Determinação da atividade específica.....</i>	15
4. RESULTADOS.....	17
<i>CURVAS PADRÕES.....</i>	18
<i>PERFIL ELETROFORÉTICO DOS POLIPEPTÍDIOS.....</i>	19
<i>QUANTIDADE DE PROTEÍNA.....</i>	22
<i>ATIVIDADE Mg^{2+} - ATPÁSICA.....</i>	23
<i>IMUNOBLOTTING.....</i>	26
5. DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÃO.....	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

A vida celular possui inúmeras estruturas que são responsáveis pela manutenção das funções celulares, estas proporcionam respiração, produção de secreções, no caso de células secretoras além de grânulos de glicogênio, ATP, hormônios como acetilcolina, e mediadores como AMPc, enfim uma infinidade de compartimentos destinados a desempenharem funções específicas e de vital importância para o desenvolvimento e manutenção da vida.

Dentre estas inúmeras estruturas temos os motores moleculares que nada mais são que *máquinas* biológicas que desempenham uma função importante para o meio celular. Isto porque substâncias ou organelas que são produzidas ou sintetizadas em certos locais às vezes têm que atravessar um grande percurso relativo ao tamanho celular até o local de ação. Percurso este que se processaria por difusão e que sendo assim retardaria a resposta e estímulo a ser desempenhado pela célula como organismo único ou como unidade de algo maior, indivíduo multicelular (TIEDGE et al., 2001).

Dentre os motores moleculares temos, as miosinas, as cinesinas e as dineínas (**Figura 1**), cada qual com uma especificidade aparente e característica muito peculiares. Até pouco tempo atrás achava-se que as “cargas transportadas” pelos mesmos se baseavam em organelas membranosas, hoje sabe-se que estes podem transportar complexos de proteínas, de ácido

nucléicos e uma infinidade de outras estruturas presentes no interior da célula (KARCHER et al., 2002).

As subdivisões desses motores moleculares se baseia em 10 diferentes famílias de cinesinas, 2 grupos de dineínas e por 18 classes de miosinas diferentes em alguns aspectos. Mas todos possuem uma divisão estrutural em 2 partes denominadas de domínio motor ligado ao citoesqueleto e responsável pela conversão da energia química em movimento, seguindo por uma estrutura molecular que fica incumbida de se ligar à “carga transportada”. Sendo esta ainda pode-se desempenhar algum papel regulador no motor (KARCHER et al., 2002; SCHLIWA & WOEHLKE, 2003).

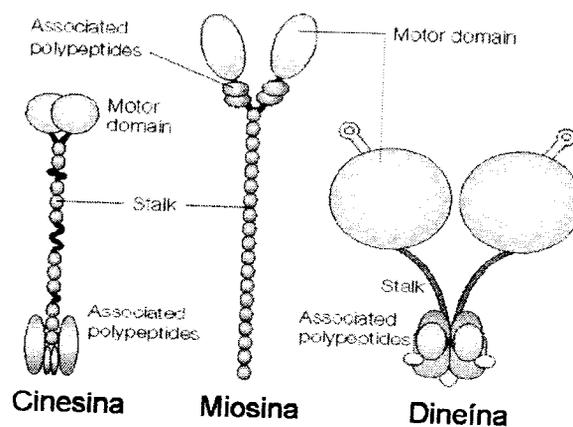


Figura 1: Três tipos de motores moleculares, evidenciando a similaridades das estruturas dos domínios. (Extraído KENT L. HILL)

A energia para o movimento se baseia na hidrólise do ATP com concomitante mudança de conformação e conversão de energia química em movimento através de um aparato ou “trilho” (SCHLIWA & WOEHLKE, 2003), que dependendo do motor pode ser filamentos de actina ou microtúbulos, como as miosinas e as dineínas ou cinesinas respectivamente (TIEDGE et al., 2001). Aspectos que hoje também têm trazido algumas mudanças devido a vasta interação entre os motores moleculares aos dois tipos de filamentos, temos por exemplo o caso da miosina VI que pode interagir com microtúbulos ou a cinesinas MKLP1 com filamentos de actina (SCHLIWA & WOEHLKE, 2003).

As cargas transportadas como dito anteriormente podem variar entre inúmeras estruturas que tanto podem ligar diretamente ao transportador, como também através de diferentes domínios de ligação, por intermédio de proteínas ou biomoléculas específicas (Figura 2) (KARCHER et al., 2002).

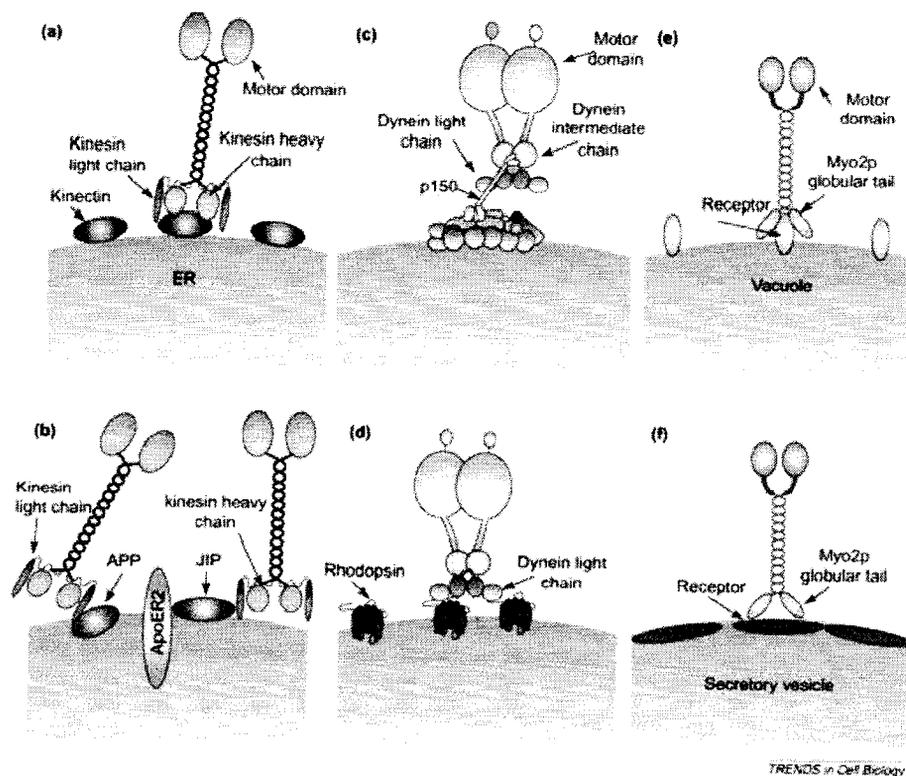


Figura 2: Motores moleculares utilizando diferentes domínios de ligação, juntamente com o auxílio de outras proteínas. Em A e B: cinesinas; C e D: dineínas; E e F: miosina. (Extraído de KARCHER, R. L. et al 2002)

Os motores moleculares utilizam o ATP como fonte de energia química e são denominadas ATPases. Eles hidrolisam o ATP em ADP e fosfato inorgânico utilizando a energia liberada em diferentes processos celulares como a contração muscular, o transporte de íons através de membranas, o batimento de cílios e flagelos e o próprio movimento das vesículas celulares (KOMOSZYNSKI & WOJTCZAK, 1996; VALE & GOLDSTEIN, 1990; SCHLIWA & WOHLKE, 2003).

Algumas ATPases são proteínas integrais de membrana, enquanto outras são solúveis e participam de movimentos ao longo do citoesqueleto (MERMALL et al., 1998; HIROKAWA, 1998).

1.1. MIOSINA

Dentre os motores moleculares, destacamos a família das miosinas que constituem proteínas motoras dependentes do citoesqueleto de actina. As miosinas foram descobertas como proteína de músculo, porém estudos de genética e biologia molecular tem revelado uma diversa família de miosinas que possuem um domínio motor comum. Sabemos hoje que, das 18 classes de miosina identificadas (**Figura 3**), 3 já foram isoladas de cérebro, sendo elas as miosinas de classe I, II e V (**Figura 4**).

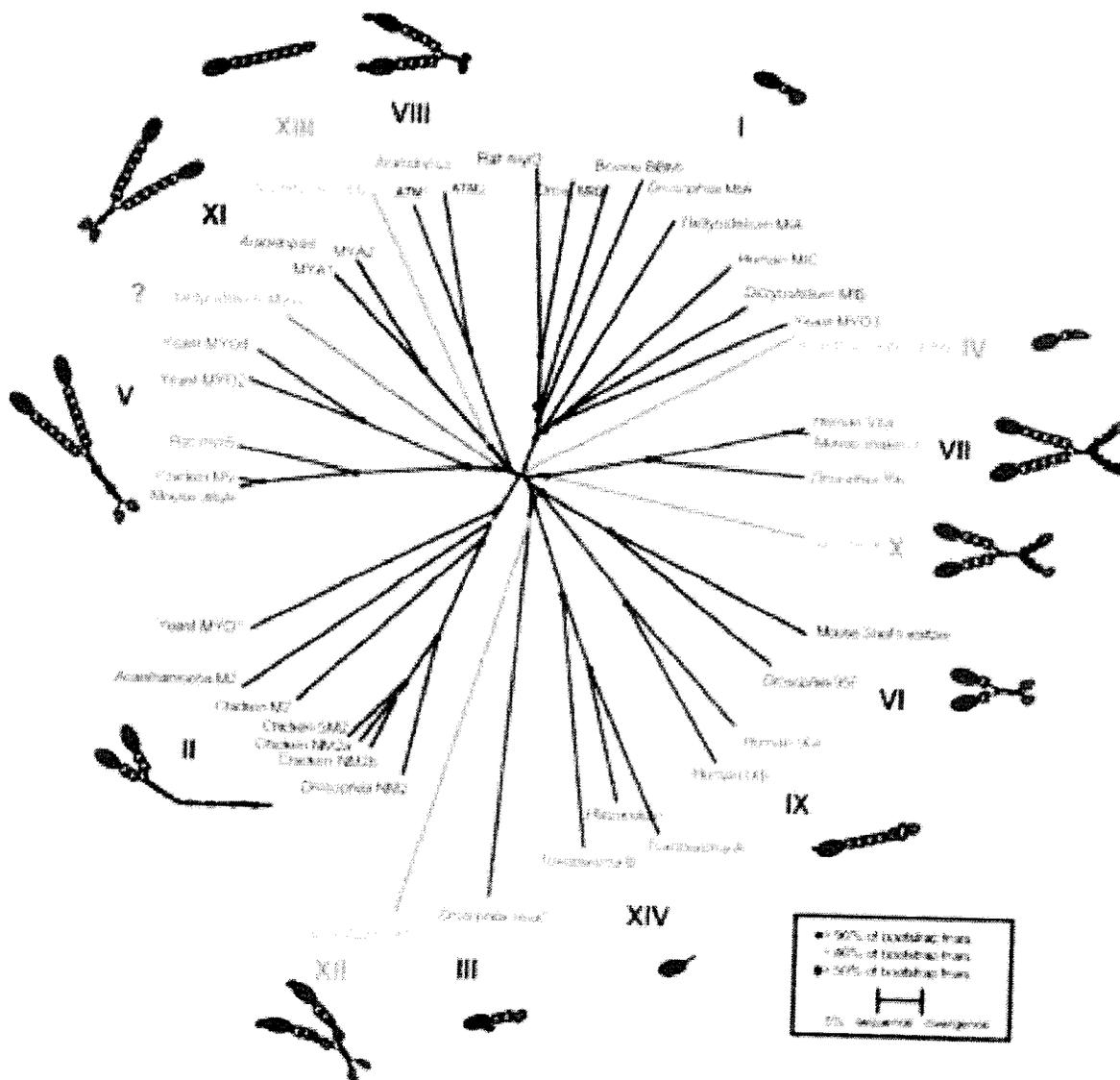


Figura 3: Arvore filogenética da distribuição das diferentes classes de miosina baseada na seqüência do domínio cabeça (extraído de MERMAI et al., 1998)

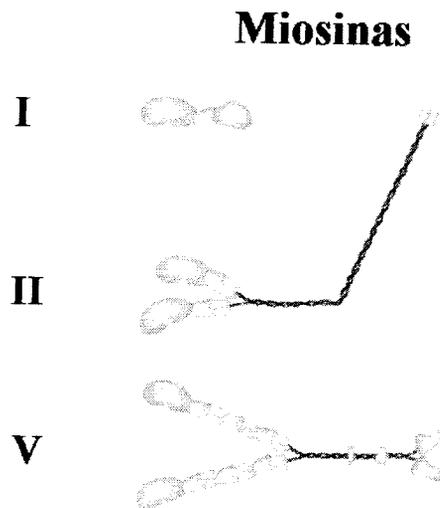


Figura 4: Os três tipos de miosina isoladas em cérebro (extraído de HODGE & COPE 2000)

As miosinas são enzimas que se caracterizam por apresentarem três subdomínios funcionais: um domínio N-terminal globular (denominado cabeça, ou domínio motor), que pode ligar-se a actina, hidrolisar o ATP e translocar-se ao longo de filamentos de actina; um domínio peçoço (ou regulatório), que se constitui de uma seqüência ligante de calmodulina e/ou cadeias leves, que geralmente são pequenas, ácidas e membros da família de proteínas ligantes de Ca^{2+} , formando os motivos IQ, esses podem variar de zero a seis nas diferentes classes de miosinas. Por último uma região C-terminal (domínio cauda) disposto em α -hélice com capacidade de interagir com caudas de outras moléculas de miosinas para formar filamentos bipolares (HASSON & MOOSEKER, 1996; SELLERS, 2000).

A região C-terminal, que é específica para cada classe de miosina (MERMALL et al, 1998), pode atuar como “âncora” para o posicionamento do domínio cabeça na interação com actina. Essa região também parece ter função regulatória e/ou de direcionamento da miosina com sua carga (HASSON & MOSSEKER, 1996; MERMALL et al., 1998).

As miosinas estão relacionadas à uma infinidade de funções celulares tais como transporte de vesículas de melanosomas ou RNA no caso das miosina V, endo ou exocitose ou fagocitose se tratando das miosina I (**Figura 5**) (HASSON & MOSSEKER, 1996; MERMALL et al., 1998).

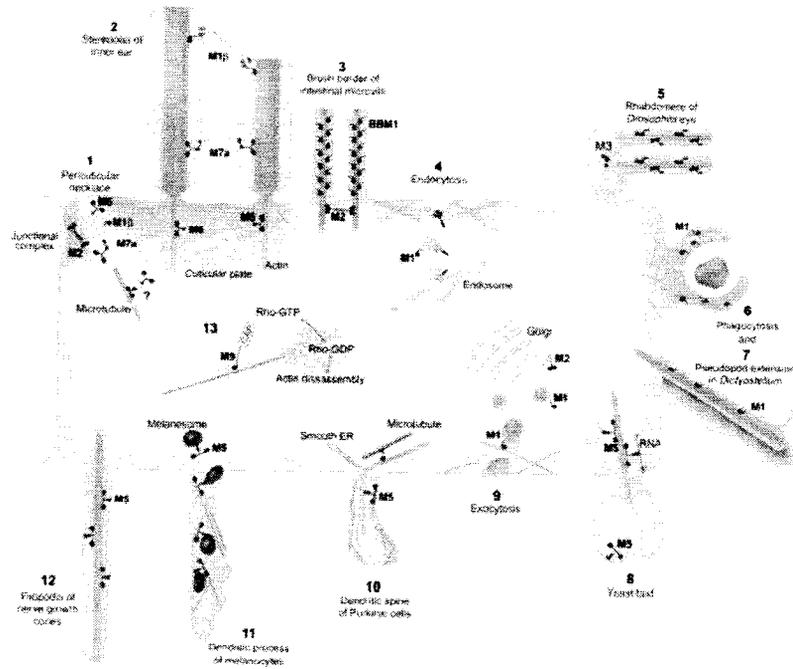


Figura 5: Funções potenciais desempenhadas pelas diversas classes de miosinas. (extraído de MERMAL, V. et al 1998)

As miosinas do tipo II foram definidas como convencionais, enquanto os outros tipos são coletivamente referidos como não-convencionais (TITUS, 1997). Todas as classes identificadas são empiricamente definidas com base na comparação da seqüência de seus domínios motores, mas nada é conhecido sobre as propriedades mecanoquímicas da maioria destas miosinas (MERMALL et al., 1998).

As miosinas de classe II possuem duas cadeias pesadas com peso molecular entre 171 e 244 kDa e dois pares de cadeias leves. A porção N-terminal possui um domínio motor e dois motivos IQ no pescoço. A metade C-terminal consiste em um segmento provindo de duas cabeças que se enrolaram entre si formando uma seqüência homodimérica que terminara em uma pequena seqüência não enrolada (SELLER, 2000). A dimerização, como no caso das miosinas convencionais, é dependente da propriedade que alguns domínios cauda possuem em formar uma estrutura em forma de mola (coiled-coil).

As miosinas II podem ser clivadas em discretos domínios funcionais, por exemplo temos entre a junção da cabeça e o domínio cauda, produzindo um subfragmento (S1) fragmento solúvel e um filamento com o restante do dímero "coiled-coil". Este por sua vez

pode sofrer nova clivagem produzindo 2 fragmentos, meromiosina pesada (HMM), sendo este solúvel em baixa força iônica e meromiosina leve (LMM) (SELLERS, 2000).

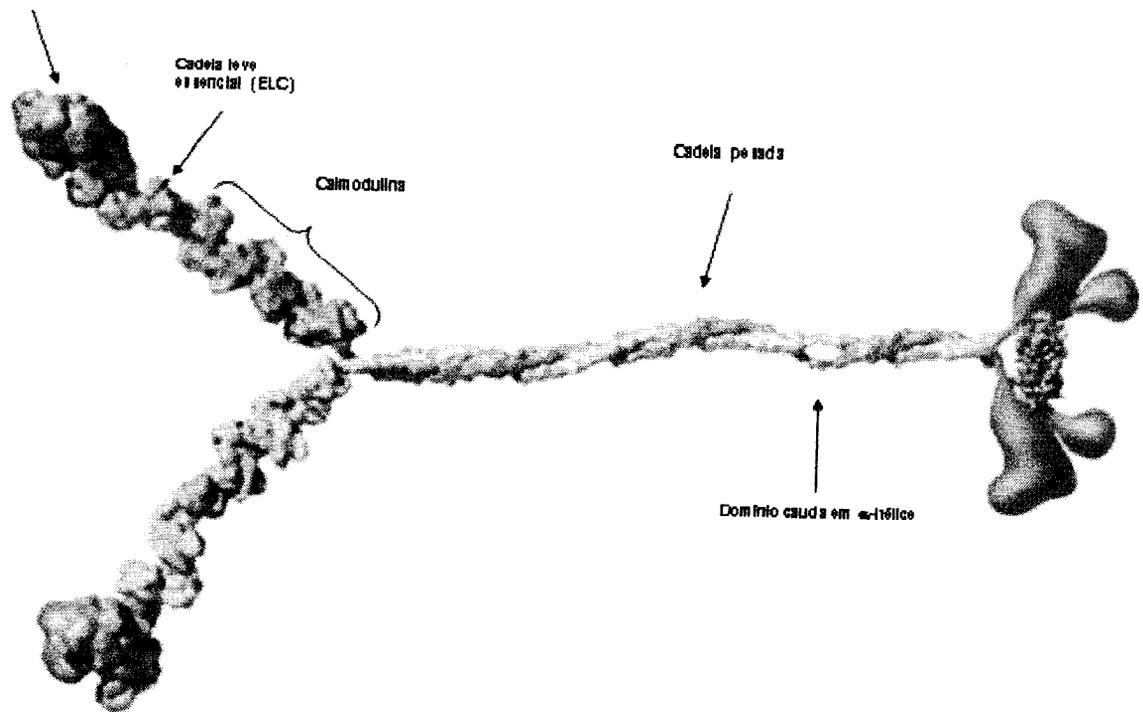
Temos as miosinas de classe II como membro que provavelmente originou outros diversos tipos de miosina. Um caso especial temos as miosina XI que possui o domínio cauda e a extensão N-terminal similares com este tipo de classe (LANGFORD & THOMPSON, 2002).

As miosinas de classe I, ligam a actina e possuem atividade ATPásica característica de miosina de músculo, mas apresentam peso molecular inferior. Miosinas dessa classe possuem uma única cabeça e variações de tamanho da cauda. Estão principalmente relacionadas com os movimentos de endocitose e exocitose na membrana. Os primeiros estudos aconteceram principalmente em organismos como *Acanthamoeba* e *Dictyostelium*, se estendendo para os vertebrados (MERMALL, 1998; WU, 2000).

As miosinas I possuem cadeia pesada entre 110 a 130 kDa juntamente com a ligação de 1 a 6 cadeias leves no domínio pescoço, que como relatado anteriormente podem ser calmodulina. Quando a comparação entre os domínios cabeça desta classe de miosina temos uma divisão ou distinção de 4 subclasses, em que cada uma desempenha uma determinada função (HASSON & MOOSEKER, 1996).

Ainda se tratando da classe I das miosinas temos a característica desta de se ligar facilmente à miosina de classe IV. Além dessa temos a semelhança no domínio MyTH4 seguidos por um domínio SH3. Da mesma forma temos a classe VII que possui domínios similares (MyTH4 e SH3). Dessa forma as classes de miosina IV e VII possuem uma proteína ancestral em comum, contudo não sendo de uma mesma linhagem evolucionária (LANGFORD & THOMPSON, 2002).

Região de
cabeça globular



As miosinas da classe V (**Figura 6**), identificadas como uma proteína ligante de actina com massa molecular estimada de 190 kDa, como a miosina I e as Ca^{2+} ATPase apresentam atividade Mg^{2+} - ATPásica estimulada pelo complexo Ca^{2+} / Calmodulina (ESPINDOLA et al., 1992). O domínio cabeça ou domínio motor contém os sítios para ligação de ATP e actina, localizados na região N-terminal da molécula. A região do pescoço possui 6 “IQ-motifs”, cada qual é um sítio potencial para ligação de uma cadeia leve (HASSON & MOOSEKER, 1996). A região da cauda também possui uma estrutura em “coiled-coil”, intercalada com regiões globulares.

As miosinas V possuem seqüências similares e propriedades estruturais com a classe XI, como observado no transporte de organelas, mostrando que ambas possuem um ancestral comum (LANGFORD & THOMPSON, 2002).

As miosinas V também apresentam como características a capacidade de terem suas atividades mecanoquímicas reguladas pela presença de certas substâncias. A atividade Mg^{2+} -ATPásica de miosina V é estimulada pela presença Ca^{2+} e calmodulina (HASSON & MOOSEKER, 1996; ESPINDOLA et al., 1992).

Segundo ESPINDOLA et al (1992) as miosinas do tipo V não possuem atividade K^+ /EDTA, porém NASCIMENTO et al (1996) evidencia a atividade K^+ /EDTA-ATPásica,

valendo se ressaltar o método adotado, em que a diferenciação da concentração de EDTA, DTT, pH e tempo de reação.

As miosinas desta classe possuem mudanças conformacionais semelhantes ao encontrado com as cinesinas, quanto à regulação (interação do domínio cauda com o domínio cabeça). Um fator adicional temos o efeito dos íons cálcio que além de induzirem a ativação da atividade ATPásica são responsáveis pela mudança da conformação apresentada pelo motor (WANG et al., 2004).

Sabe-se que além da estimulação da atividade ATPásica pelo íons cálcio, temos uma redução do coeficiente de sedimentação de 14S para 11S, devido em parte a dissociação de cadeias leves (calmodulina) na ordem de 4 a 12 calmodulina ligadas. Isto porém pode também ser influenciado pela força iônica presente, que juntamente com a presença ou não de íons cálcio promove uma extensão ou compactação da molécula (LI et al., 2004). Sendo assim em baixa força iônica e presença dos íons (Ca^{2+}) a miosina se apresenta compactada, e na presença de EGTA sua conformação estendida apresenta os domínios cabeça ligados ao pescoço. O mesmo sendo presente em alta força iônica e na presença de íons cálcio, e quando estes são retirados há uma extensão por completo (Figura 7) (LI et al., 2004).

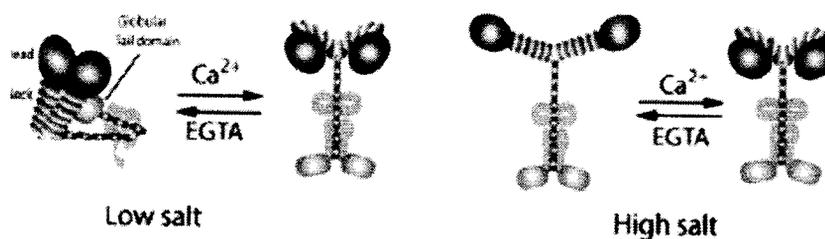


Figura 7: Modelo de conformação de Miosina V sob efeito de baixa ou alta força iônica, juntamente na ausência e presença de íons cálcio. Obtidos através de eletro-micrografia. (Extraído de LI, X. et al 2004).

Outro ponto também influenciado pela presença de $\text{Ca}^{2+}/\text{CAM}$ é a ligação ou recrutamento de “syntaxin” pelo complexo VAMP-miosina V, contudo a ligação de VAMP (receptor de vesícula sináptica) ao domínio cauda se processa independente de íons cálcio. Além do que a interação VAMP-CAM não somente inibi a formação do complexo SNARE (TAKUMA et al., 2000) como também o recrutamento de “syntaxin” pela miosina V, envolvidos nos processo de excitose (OHYAMA et al., 2001).

Em se tratando da clivagem de miosina V, por calpaína há surgimento de dois polipeptídios correspondente a 130 kDa, que posteriores sofreram novas clivagem produzindo 2 de 65 kDa, e um de 80 kDa. Esta clivagem ocorre em um aminoácido abaixo do sitio PEST na região cauda da miosina V (NASCIMENTO et al 1996). Dessa forma foi observado que despolarização de terminais nervosos na presença de cálcio produzem um polipeptídio de 80 kDa originário da clivagem de miosina V (CASALETTI et al., 2003).

Para purificações de miosina V, o primeiro passo consiste em precipitação utilizando NaCl (cloreto de sódio) 600 mM arrastando junto organelas membranosas. Estas por sua vez são eliminadas através da utilização de detergentes, nesse caso o Triton X-100. Posteriormente, miosina V é solubilizada através de NaCl 600 mM, agora com o complexo Mg^{2+} -ATP, sendo então aplicada em coluna de filtração que remove compostos como espectrina e tubulina. As frações contendo miosina V são então aplicadas em coluna de troca iônica, neste caso TMAE ou Q-sepharose, que promove a separação, de outros contaminantes e actina. Sendo miosina V eluída aproximadamente entre 350 e 420 mM de NaCl (CHENEY, 1998).

2. OBJETIVO

Nesse trabalho procuramos verificar se miosina V de citosol de cérebro bovino liga à coluna Q-sepharose, sem a utilização de precipitação e posterior solubilização da amostra.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes

Os reagentes ATP, Trizma-Base, Imidazol, EDTA, EGTA, inibidores de proteases e DTT foram obtidos da SIGMA, Suécia. A resina Q-Sepharose foi obtida junto a *Amersham Biosciences, USA*. Os demais reagentes usados foram de grau analítico.

Preparação da Fração ATPase

Cérebros bovinos, fornecidos pelo frigorífico Real, foram limpos retirando vasos e membranas e imediatamente lavados em solução salina. Estes foram homogeneizados em liquidificador e manualmente em homogeneizador de vidro tipo Potter. Foram homogeneizado cerca de 1 g de cérebro em 10 mL de tampão de extração (Imidazol 25 mM contendo Sacarose 250 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, DTT 1 mM, Benzamidina 1 mM e inibidor de Ca^{2+} -proteases). Os ensaios foram submetidos à 3 condições, mantendo o pH 8,0 acrescentado ou não pirofosfato 100 mM e alterando o pH para 9,0. O homogeneizado de

cada condição foi centrifugado a 45.000 x g durante 40 minutos a 4 ° C em centrífuga Sigma 3K30.

A fração precipitada P1 foi descartada e a fração protéica solúvel S1 foi imediatamente aplicado em coluna Q-Sepharose (5,0 x 2,5 cm; 25 mL) - previamente equilibrada com tampão Imidazol 20 mM contendo EDTA 1 mM, DTT 0,1 mM e pH conforme indicado. Posteriormente foi feita a lavagem da coluna com mesmo tampão seguido de eluições com NaCl 250, 500 e 1000 mM em tampão Imidazol 20 mM pH 8,0 contendo EDTA 1 mM, no caso dos ensaios com pH 8,0. Para o ensaio com pH 9,0 foram feitas eluições com tampão Imidazol 20 mM pH 6,0 contendo EDTA 1 mM seguido de eluições com NaCl 250, 500 e 1000 mM no mesmo tampão em pH 7,5.

Método de Dosagem de Proteínas

A concentração protéica das amostras foi determinada segundo o método quantitativo de BRADFORD (1976). O volume de 20 µL das frações obtidas foi adicionado a 80 µL de H₂O Milli-Q em tubos de vidro. A cada tubo foram adicionados 3 mL de solução de Bradford (Coomassie Blue G-250 0,001 % em etanol 4,7 % e ácido fosfórico 8,5 %). As reações foram realizadas em duplicatas. A absorbância foi medida em 595 nm. Paralelamente a dosagem protéica das frações, uma curva padrão de dosagem de soroalbumina bovina (BSA) foi preparada (**Figura 8**). A curva apresentou-se linear entre 0 e 30 µg de BSA.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

O perfil de polipeptídeos das frações protéicas foi analisado em SDS-PAGE usando o sistema tampão descontínuo de LAEMMLI e FAVRE (1973) e o sistema de placas empregado por STUDIER (1973).

Os mini-géis foram preparados em concentração fixa de 5 % de acrilamida (gel de empilhamento), seguido por gel gradiente 5-15 % e / ou 5-22 % (gel de separação). Os géis foram montados entre placas de vidro e alumina de 10 x 10 x 0,06 cm.

As amostras protéicas foram preparadas adicionando-se 90 µL da respectiva fração a 10 µL de tampão de amostra (Tris 18,7 mM pH 6,8 contendo β-mercaptoetanol 2,8 mM, SDS

0,6 %, EDTA 0,6 mM, Glicerol 2,76 %, Bromofenol 0,05 g). Antes da aplicação, as amostras foram colocadas em H₂O em ebulição por 2 minutos. Utilizando microseringa de vidro Hamilton[®], as amostras foram aplicadas no gel, devidamente montado em cuba Hoefer[®] SE 250, *Amersham Biosciences, USA*.

A separação eletroforética dos polipeptídeos foi conduzida em tampão Tris 25 mM pH 8,3, EDTA 2 mM, Glicina 0,2 M, SDS 2,5 mM, sob corrente constante de 25 mA utilizando fonte Bio-Rad Power Pac 1000. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant blue-R 0,25 % em metanol 50 % e ácido acético 10 % e descorados em solução de metanol 30 % e ácido acético 10 %.

O padrão SDS-6H (cadeia pesada de miosina 205 kDa, β -galactosidase 116 kDa, fosforilase-b 97 kDa, albumina bovina 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, anidrase carbônica 29 kDa), foi utilizado para comparar a mobilidade relativa dos polipeptídeos no gel.

Determinação do peso molecular de polipeptídios

A estimativa do peso molecular dos polipeptídios de interesse foi feita utilizando uma curva de calibração, obtida através de uma curva plotada com o logaritmo (log) da porcentagem de poliacrilamida do gel correspondente ao logaritmo (log) de cada polipeptídio presente no padrão de peso molecular (**Figura 9**). O cálculo é feito através da medida do gel, por exemplo onde começa os 5 % e termina os 22% seguido pela determinação da porcentagem de poliacrilamida o qual o polipeptídio do padrão está.

O peso molecular do polipeptídio de interesse é calculado pela determinação da porcentagem do mesmo no gráfico plotado com os polipeptídios do padrão de peso molecular. É importante lembrar que este tipo de cálculo não é 100% confiável, pois alguns polipeptídios migram de forma anômala.

WESTERN BLOTTING

Segundo GERSHONI e PALADE (1982), a técnica de Immunoblotting pode ser dividida em duas etapas: transferência da banda protéica do gel para a matrix e a ligação do epítipo com o anticorpo específico (anticorpo primário). O método de transferência usado foi o conhecido como "wet blotting", no qual um sanduíche de gel-matrix é submerso no tampão

de transferência para ser eletrotransferido. A eletrotransferência foi realizada com “BioRad Mini Trans-Blot transfer cell”, utilizando-se tampão de transferência composto por Tris-HCl 15,6 mM e glicina 120 mM. Géis SDS-PAGE gradiente de 5 a 22 % e membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Biosciences, USA) foram utilizados na eletrotransferência.

Seguido da transferência, a detecção do epítipo procede em algumas etapas, separadas com etapas de lavagem com tampão TBS (Solução pronta Bio-Rad, Tris 20 mM pH 7,5, cloreto de sódio 500mM). Primeiro, a membrana de nitrocelulose é incubada com o anticorpo primário por aproximadamente 10 horas (geralmente overnight). Em seguida, um anticorpo secundário, que reconhece um epítipo no primeiro anticorpo é incubado com a membrana. O segundo anticorpo é conjugado a um agente marcador, no nosso caso fosfatase alcalina. Este marcador é então visualizado por uma reação colorimétrica catalisada por uma enzima que fornece um produto colorido. O anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina reage com o substrato “bromochloroindolyl phosphate – nitro blue tetrazolium” para liberar um precipitado púrpura escura estável.

Os anticorpos primários por nós utilizados foram respectivamente contra: cabeça de miosina V (400µg/ml), produzidos em coelho, estando em diluição de 1:5000. Os anticorpos secundários utilizados foram anti-coelho conjugados com fosfatase alcalina (AP) e em diluição de 1:7500.

Determinação da Atividade Adenosina Trifosfatásica

A dosagem colorimétrica do ortofosfato inorgânico liberado durante a reação de hidrólise do substrato foi realizada segundo o método de HEINONEN e LAHTI, 1981.

A cada tubo de ensaio foram adicionados 40 µL do meio de reação (Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM) contendo MgCl₂ 4 mM para dosagem da atividade Mg²⁺-ATPásica.

Volumes pré-determinados das frações protéicas foram adicionados aos tubos e o volume final de 200 µL foi completado com adição de H₂O Milli-Q.

A reação foi iniciada com adição de substrato, seguida da incubação a 37 ° C durante 20 minutos. Após este tempo, a reação foi interrompida com adição de 2 mL de solução de dosagem AAM (acetona 100 %, molibdato de amônio 10 mM e ácido sulfúrico 5 N numa

proporção de 2: 1: 1, respectivamente) e submetida à agitação. Após 15 segundos, 200 µL de ácido cítrico 1 M foram adicionados mantendo-se a agitação por mais 10 segundos. Foram preparadas reações controle para cada amostra, nas quais a incubação se procedeu sem a adição de substrato, o qual foi adicionado imediatamente antes de interromper a reação com solução de dosagem.

As reações foram realizadas em duplicata e a absorbância medida em 355 nm. Paralelamente foi feita uma curva padrão de ortofosfato inorgânico, entre 0 e 250 nmols de ortofosfato (**Figura 10**).

Determinação da atividade específica das frações

A atividade específica foi calculada a partir da densidade óptica das amostras, através da equação:

$$AE = \frac{\text{D.O. amostra} \times \text{nmols de P}_i \text{ do padrão}}{\text{D.O. padrão} \times \text{mg de proteína na reação} \times \text{tempo de reação}}$$

Onde: D.O. = densidade óptica ou absorbância.

AE = Atividade Específica

A atividade específica foi expressa em nmols de P_i por mg de proteína por unidade de tempo. Sendo a atividade total para cada amostra o produto de sua atividade específica pela quantidade de proteína total da amostra.

4. RESULTADOS

Curvas padrões

Para todos ensaios realizados, a determinação da quantidade de proteína das amostras em *mg/mL*, como indicado, utilizou uma curva padrão de dosagem de soroalbumina bovina (BSA) (**Figura 8**). No caso da determinação do peso molecular foi utilizada uma curva padrão que continha os log da porcentagem de poliacrilamida correspondente ao log do polipeptídeo do padrão de peso molecular (**Figura 9**). A concentração de ortofosfato das amostras em *nmols* foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos a partir da curva-padrão (**Figura 10**).

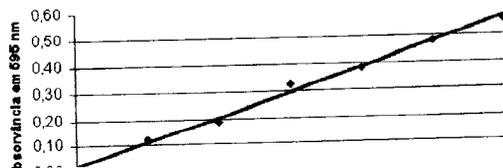


Figura 8: Exemplo de uma curva padrão de BSA, no intervalo linear do método, com equação e coeficiente de linearidade.

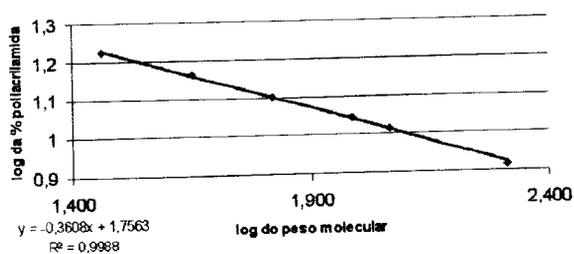


Figura 9: Exemplo de curva padrão do log da porcentagem de poliácridamida correspondente ao log do polipeptídeo do padrão de peso molecular, com equação e coeficiente de linearidade.

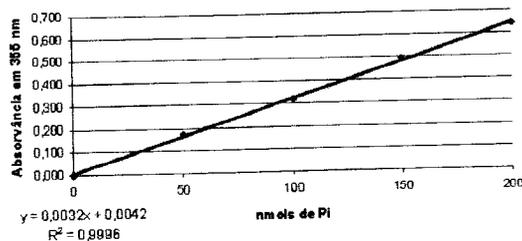


Figura 10: Exemplo de uma curva padrão usado para determinar a concentração de fosfato, com equação e coeficiente de linearidade.

Cérebros bovinos frescos

Perfil eletroforético dos polipeptídios em coluna Q-sepharose

Se tratando de amostras com pH 8,0 e diluídas conforme indicado fica evidente em SDS-PAGE a retenção de um grande número de polipeptídios (**Figura 11**), juntamente com a análise de dosagem de proteína do aplicado e do coletado no “void” (ver adiante), contudo o polipeptídio com motilidade semelhante à miosina V foi observado tanto no aplicado (S1) como no void (V1).

Como esperado nas subseqüentes eluições os eluatos com tampão Imidazol 20 mM pH 8,0 contendo EDTA 1 mM e NaCl 250 mM apresentaram inúmeros polipeptídios juntamente com pequena evidência de polipeptídio com motilidade em gel próximos de miosina II (padrão de peso molecular), possivelmente miosina V, pouco visível em SDS-PAGE (**Figura 11**). No caso dos eluatos com tampão Imidazol 20 mM pH 8,0 contendo EDTA 1 mM e NaCl 500 mM em SDS-PAGE observou polipeptídios com peso molecular em torno de 83, 31, 30 e 23 kDa juntamente com outros em torno de 43 e 47 kDa (**Figura 11**).

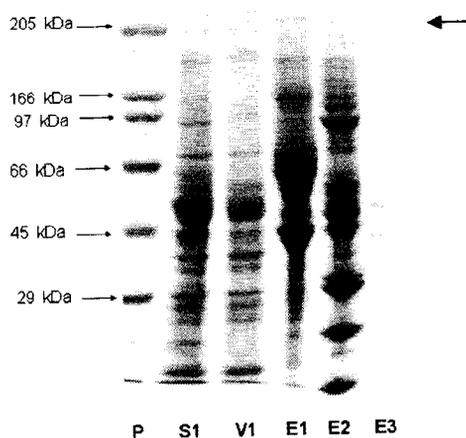


Figura 11: Perfil de polipeptídios da fração ATPase de cérebro bovino sem o tratamento com pirofosfato. Foram aplicados: 42 µg de S1(aplicado na coluna); 31 µg de V1(void da coluna), 106 µg de E1(eluatos com 250 mM de NaCl); 107µg de E2(eluatos com 500 mM de NaCl); 0,0 µg de E3(eluatos com 1000 mM de NaCl). P-padrão SDS 6H. A seta indica polipeptídio com motilidade próximo de miosina V.

Se tratando de amostras com pH 8,0 tratadas com pirofosfato (PPi), em SDS-PAGE não observaram a retenção dos principais polipeptídios aplicados em coluna Q-sepharose, inclusive o correspondente a miosina V. Contudo pode se observar em eluições subseqüentes, principalmente eluatos com tampão Imidazol 20 mM pH 8,0 contendo EDTA 1 mM e NaCl 500 mM, polipeptídios em torno de 83, 31, 30 e 23 kDa com mais evidencia (Figura 12). Ao passo que as outras eluições correspondentes a NaCl 250 e 1000 mM observou a pequena evidencia de polipeptídios.

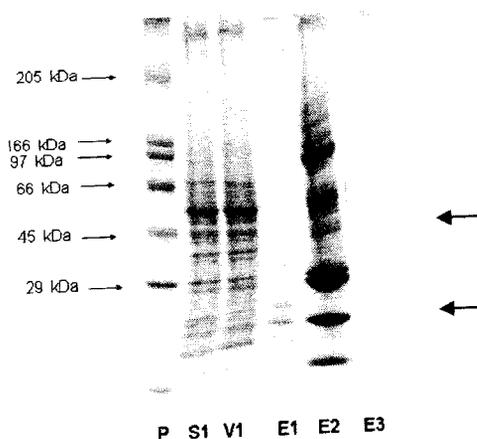


Figura 12: Perfil de polipeptídios da fração ATPase de cérebro bovino. Foram aplicados: 48 µg de S1 (aplicado na coluna); 44 µg de V1 (void da coluna); 6 µg de E1 (eluatos com 250 mM de NaCl); 14 µg de E2 (eluatos com 500 mM de NaCl); 0,0 µg de E3 (eluatos com 1000 mM de NaCl). P-padrão SDS 6H. A seta evidencia polipeptídios encontrados nos eluatos com 250 e 1000 mM de NaCl.

No caso do ensaio com elevação do pH para 9,0, podemos observar, em SDS-PAGE, uma pequena retenção de polipeptídios, inclusive o polipeptídio com motilidade semelhante a miosina V. Contudo eluições com NaCl 250 mM em tampão imidazol pH 7,5 observamos polipeptídios em torno de 66 e 43 kDa, juntamente podemos evidenciar um polipeptídio com motilidade em gel próximo do padrão de miosina II. Juntamente nos eluatos com NaCl 500 mM evidenciou polipeptídios com peso próximo de 83, 31 30 e 23 kDa (Figura 13), muito semelhante as frações anteriores do ensaio sem pirofosfato.

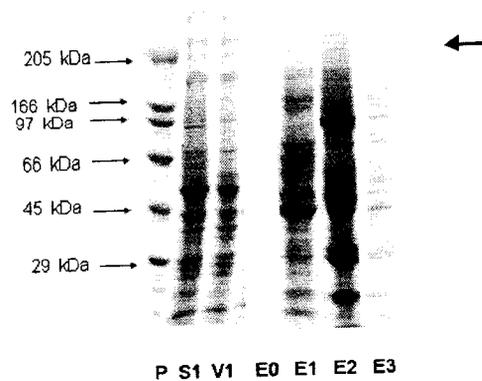


Figura 13: Perfil de polipeptídios da fração ATPase de cérebro bovino elevando o pH para 9,0. Foram aplicados: 70 μg de S1 (aplicado na coluna); 52 μg de V1 (void da coluna); 0,0 μg de E0 (eluatados com pH 6,0); 166 μg de E1 (eluatados com 250 mM de NaCl); 114 μg de E2 (eluatados com 500 mM de NaCl); 0,0 μg de E3 (eluatados com 1000 mM de NaCl). P-padrão SDS 6H. A seta evidencia o polipeptídio com correspondente a miosina V.

Se tratando do *void* (V1) do ensaio com pH 9,0, foi elevado o pH para 10,8 sendo novamente aplicado em coluna Q-sepharose, mostrando uma retenção de polipeptídios, inclusive o com motilidade semelhante a miosina V. O *void* (V2) contudo apresentou alguns polipeptídios correspondentes ao aplicados em coluna (**Figura 14**). Seguindo o mesmo padrão de eluição, colhendo eluatados com pH 6,0, e NaCl 250 e 500 mM em tampão imidazol 20 mM pH 7,5, não foi possível verificar a presença do polipeptídio com peso molecular semelhante a miosina V (**Figura 14**).

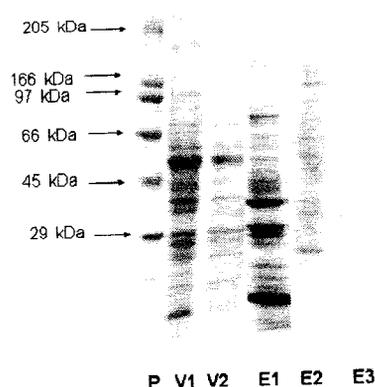


Figura 14: Perfil de polipeptídios da fração V1 aplicada em coluna Q-sepharose. Foram aplicados: 52 μg de V1 (1° void – aplicado na coluna); 36 μg de V2 (2° void); 36 μg de E0 (eluatados com pH 6,0); 0,0 μg de E1 (eluatados com 250 mM de NaCl); 0,0 μg de E2 (eluatados com 500 mM de NaCl). P-padrão SDS 6H.

Quantidade de proteína

Como observado em SDS-PAGE, a dosagem de proteína mostra uma pequena diferença entre o aplicado (S1) e o void (V1) dos três ensaios realizados. Dessa forma a dosagem de proteína (**Tabela I**), como esperado obteve diferentes porcentagem de proteínas retidas na coluna. Comparando os três void podemos ver que houve uma maior retenção de proteínas no caso dos ensaios sem o tratamento com pirofosfato, seguidos pelo ensaio com PPi e as amostras do ensaio com pH 9,0.

Tabela I: Porcentagem de proteína aplicada e coletada no void. Foram feitos ensaios com pH 8,0 com e sem pirofosfato 100 mM e ensaios alterando o pH para 9,0. Sendo adotado como 100 % o aplicado em coluna.

Amostras	Prot. (mg/ml)	Vol. (mL)	Prot. Total	% Prot. Total
S1 pH 8,0 w/ PPI	1,613	250	403,22	100,0
V1 pH 8,0 w/ PPI	1,488	230	341,70	84,7
S1 pH 8,0 w/ PPI	1,407	244	343,42	100,0
V1 pH 8,0 w/ PPI	1,052	250	262,98	76,8
S1 pH 9,0	1,305	254	331,36	100,0
V1 pH 9,0	1,183	246	290,92	87,8

Visando a pouca retenção de proteína, mas uma pequena limpeza de polipeptídios observados em gel SDS-PAGE tanto com eluatos de 250 e 500 mM de NaCl. Reaplicamos a fração denominada void (V1) do ensaio com pH 9,0 após elevação para pH 10,8, em coluna Q-sepharose previamente equilibrada, obtendo uma retenção significativa de proteína (**Tabela II**).

Tabela II: Porcentagem de proteína aplicada e coletada no void. Foi elevado o pH para 10,8 do aplicado (V1) antes de levado para a coluna. Sendo adotado como 100 % o aplicado em coluna.

Amostras	Prot. (mg/ml)	Vol. (mL)	Prot. Total	% Prot. Total
S1	1,305	254	331,36	100,0
V1	1,183	246	290,92	87,8
V2	0,722	70	50,51	15,2

Atividade Mg^{2+} -ATPásica

No caso da atividade, foram feitas atividades Mg^{2+} -ATPásica para S1 e V1 dos três ensaios obtendo valores não muito expressivos. Para o ensaio com pH 8,0 foi observado atividade tanto no *void* (V1) em menor quantidade, como no eluato com NaCl 250, que possui o polipeptídeo com motilidade semelhante a miosina V (Figura 15). Contudo a atividade destas amostras obtidas dos eluatos, com 250 mM de NaCl, quando dialisadas reduziram ainda mais seus valores (Figura 16).

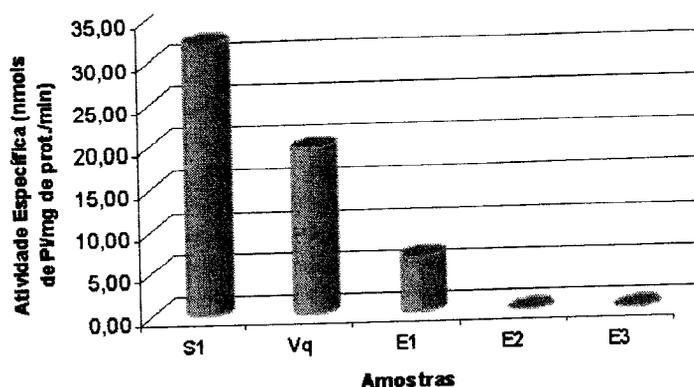


Figura 15: Atividade Específica das frações do ensaio com pH 8,0. Adicionou-se 50 μ L de amostra S1; V1 e E2 e E3; 100 μ L para E1 ao meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0 contendo EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 5 mM). A reação foi iniciada com adição de ATP 1 mM, incubada a 37 ° C durante 10 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. No caso das amostras S1 e V1 foram adicionados mais 4 mM de $MgCl_2$.

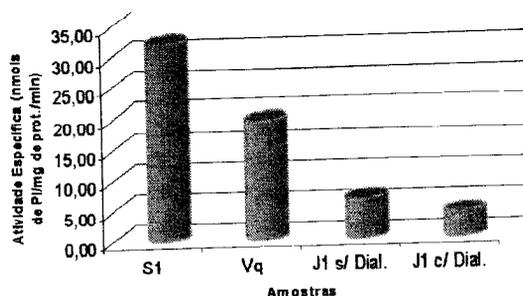


Figura 16: Atividade Específica dos eluatos com 250 mM de NaCl antes e após diálise.. Adicionou-se 100 μ L de amostra S1; V1 e J1 antes ou após diálise ao meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0 contendo EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 5 mM). A reação foi iniciada com adição de ATP 1 mM, incubada a 37 ° C durante 10 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. No caso das amostras S1 e V1 foram adicionados mais 4 mM de $MgCl_2$.

Se tratando de outras amostras com quantidade superior de sal (NaCl 500 mM), como verificado anteriormente obtiveram praticamente o mesmo perfil protéico nos três ensaios. A atividade foi nula tanto antes ou após a diálise (**Figura 17**).

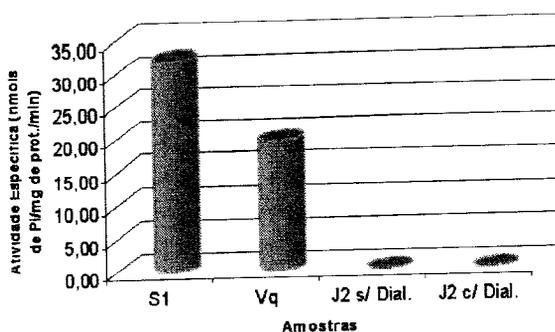


Figura 17: Atividade Específica dos eluatos com 500 mM de NaCl antes e após diálise.. Adicionou-se 50 μ L de amostra S1 e V1; 100 μ L para J2 antes ou após diálise ao meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0 contendo EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 5 mM). A reação foi iniciada com adição de ATP 1 mM, incubada a 37 ° C durante 10 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. No caso das amostras S1 e V1 foram adicionados mais 4 mM de $MgCl_2$.

As amostras proveniente do ensaio com pH 8,0 com pirofosfato obtiveram pouca retenção de proteína (visto anteriormente) e o perfil de atividade específica apresentou-se maior no *void* (V1), juntamente com o polipeptídeo correspondente a miosina V, que praticamente não foi retido. Dessa forma os eluatos com 250 e 500 mM de NaCl não apresentaram atividade (**Figura 18**) mesmo após diálise.

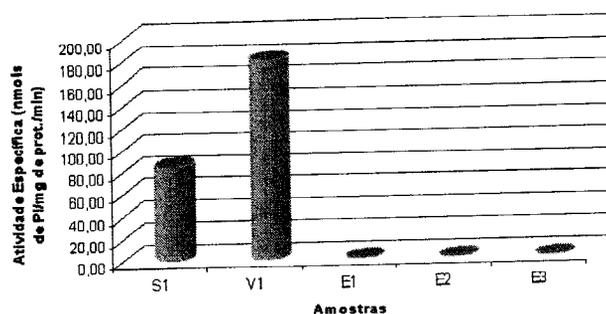


Figura 18 Atividade Específica das frações do ensaio com pH 8,0, tratadas com pirofosfato. Adicionou-se 50 μ L de amostra S1; V1; E1; E2 e E3 ao meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0 contendo EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 5 mM). A reação foi iniciada com adição de ATP 1 mM, incubada a 37 ° C durante 10 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. No caso das amostras S1 e V1 foram adicionados mais 4 mM de $MgCl_2$.

Para o ensaio com pH 9,0 houve presença de atividade Mg^{2+} -ATPásica tanto no aplicado (S1) como no *void* (V1), mas ao contrário do ensaio com pH 8,0 não foi observado atividade dos eluatos com 250 mM de NaCl, mesmo apresentando o polipeptídeo correspondente a miosina V, visto em SDS-PAGE. Da mesma forma os eluatos com 500 e 1000 mM de NaCl não apresentaram atividade (**Figura 19**).

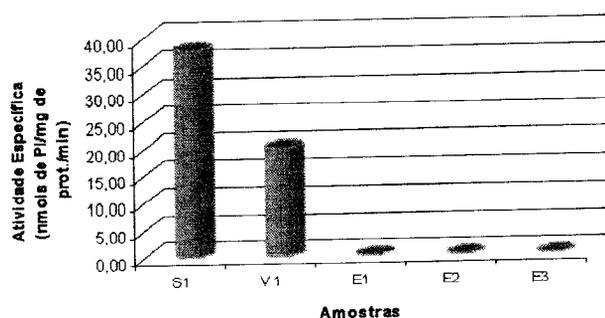


Figura 19: Atividade Específica das frações do ensaio com pH 9,0. Adicionou-se 40 μ L de amostra S1 e V1; 50 μ L para E1; E2 e E3 ao meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0 contendo EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 5 mM). A reação foi iniciada com adição de ATP 1 mM, incubada a 37 ° C durante 10 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. No caso das amostras S1 e V1 foram adicionados mais 4 mM de $MgCl_2$.

Quando aplicamos o void (V1), proveniente do ensaio com pH 9,0, em coluna Q-sepharose obtivemos uma retenção da atividade (**Figura 20**), verificado pela atividade nula do void (V2).

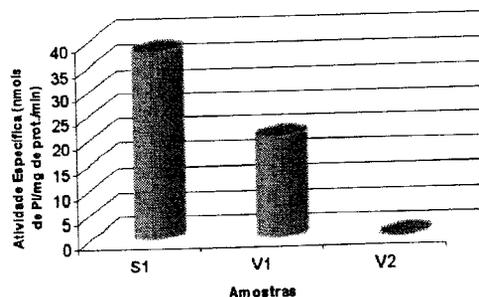


Figura 20: Atividade Específica do aplicado (V1) e void (V2) da coluna Q-sepharose. Adicionou-se 50 μ L de amostra S1 e V1 e V2 ao meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0 contendo EDTA 1 mM, DIT 1 mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 5 mM). A reação foi iniciada com adição de ATP 1 mM, incubada a 37 ° C durante 10 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. No caso das amostras S1 e V1 foram adicionados mais 4 mM de $MgCl_2$.

IMUNOBLOTTING

O ensaio com anti-miosina V não mostrou marcação do polipeptídeo similar a miosina V presente provavelmente no eluatos com NaCl 250 mM em tampão imidazol 20 mM pH 7,5 dos ensaio com pH 8,0 e pH 9,0, como também nos aplicados (S1) e void (V1 e V2) dos ensaios realizados (**Figura 21**). Porém acredita ser provável que a qualidade dos anticorpos utilizados esteja comprometida, uma vez que nossa fração S1, de ambos ensaios, que teoricamente possuía miosina V, também não foi marcada pelo mesmo. O mesmo ensaio foi feito com anti-miosina II obtendo os mesmos resultados, inclusive com o padrão utilizado.

205kDa →
116kDa →
97kDa →
66kDa →

45kDa →

29kDa →

P S1 V1 E1

Figura 21: Imunoblotting do aplicado (S1), void (V1) e Eluato 250 mM de NaCl (E1) do ensaio com pH 8,0. Foram aplicados em gel 14 µg de S1, 10 µg de V1 e 30 µg de E1. O gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose, sob uma amperagem de 280mA, por aproximadamente 12 horas. P-padrão SDS-6H. O blotting foi revelado com fosfatase alcalina.

5. DISCUSSÃO

Tendo como base a alta concentração de proteínas em solução, principalmente em extratos brutos, contendo inúmeras proteínas com cargas positivas, negativas ou neutras, a interação e conseqüentemente precipitação ou não destas é muito provável. Visando diminuir esses efeitos, diluindo nossos extratos proporcionamos uma maior distancia entre tais proteínas e conseqüentemente, se tratando de uma fração solúvel tentar a ligação da proteína de interesse em coluna de troca iônica.

Os resultados do presente trabalho mostram uma pequena ligação de um polipeptídeo com motilidade correspondente à miosina V com atividade Mg^{2+} -ATPásica, nos ensaios em pH 8,0 na ausência de pirofosfato 100 mM.

Contudo amostras do ensaio com pH 9,0 apesar de apresentarem o mesmo polipeptídeo não apresentaram atividade aparente. Fato este que pode ser inferido a outros fatores, pois em ambos os casos a presença do polipeptídeo semelhante a actina foi verificada, mas este pode ter sofrido modificações de sua estrutura, inviabilizando a ligação de F-actina ao motor e

conseqüentemente aparecimento de atividade. Como sabemos miosina V possui a capacidade de clivar o ATP, mas a liberação do ADP e Pi somente se processam quando há ligação com filamentos de actina, havendo a ligação de nova molécula de ATP (ESPINDOLA, 1992; NASCIMENTO, 1996; HOMMA, 2000).

Da mesma forma, a diálise (figura 15 e 16) de tais amostras proporciona perda de compostos ou mesmo mudanças da estabilidade da molécula, diminuindo a atividade analisada, que ao contrário do ensaio com pH, não são tão marcantes.

De acordo com esse resultado podemos verificar uma maior retenção de proteína no ensaio com pH 8,0 em comparação com o ensaio com pH 9,0 reforçando a probabilidade da ausência de algum fator nos eluídos com 250 mM de NaCl do ensaio correspondente, que poderiam estar sendo necessários para a atividade ATPásica.

Podemos verificar também que nos 3 ensaios realizados a “limpeza” de nossas frações subseqüentes foi verificado, com exceção do ensaio com pirofosfato (figura 12). Tal resultado pode ser explicado pela adição do composto, com carga negativa que não interagindo com as proteínas se ligou facilmente com a resina de carga positiva. Nos ensaios sem pirofosfato, com pH 8,0 e 9,0 não havendo um competidor para os sítios da resina houve uma ligação de polipeptídios, principalmente verificados pelo perfil dos eluatos com 250 mM de NaCl (figura 11 e 13).

A atividade dos eluídos com 500 e 1000 mM de NaCl se apresentou nula, mesmo após diálise das amostras, provavelmente pela ausência do polipeptídio com motilidade semelhante a miosina V, que liga a resina Q-sepharose e é eluído com gradiente de NaCl de 350-420 mM (CHENEY, 1998). Contudo a atividade desempenhada por outros polipeptídios entre 62 e 83 kDa com características ATPásicas, como o caso de cinesinas dependentes de calmodulina presente em plantas, pode estar sendo inibida pelas altas concentrações de NaCl (REDDY, V. & REDDY, A. 2002).

Outro ponto a destacar é o fato de que certos motores moleculares como as cinesinas possuem a capacidade de interagir, semelhante às miosinas V, seus domínios cabeça e cauda impedindo a clivagem do ATP, e conseqüentemente desaparecimento da atividade ATPásica nestas condições de alta força iônica (COY et al., 1999), não sendo revertidos pela diálise devido as condições estruturais adquiridas.

Se tratando dos aplicados S1 e *void* (V) podemos verificar um polipeptídio com peso molecular semelhante a cadeia pesada de dineína, em torno de 400 kDa, que poderiam estar colaborando com a atividade, juntamente com o provável polipeptídio referente a miosina II e V (figura 11, 12 e 13). Fato este que foi verificado também polipeptídios semelhante a espectrina co-purificados com cadeias de dineína (figura 11 e 13) (MURESAN et al., 2001)

Nas condições usadas nossa amostra possuía muitos contaminantes com prováveis cargas negativa que competiam desfavoravelmente com nossa proteína de interesse. Como verificado em reaplicação da fração *void* (V1), do ensaio com pH 9,0, houve praticamente total retenção de proteína e completa ausência de atividade (Tabela II e figura 20).

Como também nos três ensaio realizados podemos observar certos polipeptídios tanto nos eluídos como no próprio *void*, mostrando uma saturação de nossa coluna (figura 11, 12 e 13).

Quanto aos eluídos dos ensaios com pH 8,0 e pH 9,0, há uma distinção de polipeptídios que apresentam características físico-químicas bem definidas, pois tanto nesses como no outro ensaio, com pirofosfato, tais polipeptídios se ligam com maior intensidade, como é o caso dos eluídos com 500 mM de NaCl, que apresentaram uma identidade semelhante entre os experimentos realizados. Mostrando que independente das condições impostas tais polipeptídios se ligam em coluna Q-sepharose, sendo eluídos conforme indicado anteriormente.

6. Conclusão

Mesmo obtendo resultados satisfatórios a respeito da ligação do polipeptídeo de interesse, com motilidade semelhante com miosina V, há a necessidade aprimorar novos ensaios para que se possa obter uma ligação mais eficiente, contudo não utilizando métodos que utilizam precipitação e posterior solubilização.

Ainda podemos concluir que afinidade de nosso polipeptídeo de interesse por coluna aniônica sofre algumas modificações quanto ao pH utilizado no ensaio, se mostrado mais efetivo em pH 8,0 na ausência de pirofosfato. Ao passo que também observamos uma saturação da resina verificado por polipeptídeo tanto nos aplicados (S1) como nos *void* (V1) como também quanto reaplicamos novamente o V1 (ensaio pH 9,0) em resina Q-sepharose.

Além disso, utilizando resinas aniônicas com grau de especificidade menor em uma etapa anterior pode colaborar com a ligação de nosso polipeptídeo de interesse, sem, contudo haver ligação de outros de menor interesse, como visto quando acrescentamos 100 mM de

pirofosfato. Quanto há uma quantidade muito grande de tal substrato, não há ligação de outros polipeptídios eluídos com 250 mM de NaCl.

Nesse caso até mesmo a própria concentração de pirofosfato pode colaborar com a ligação sendo muito inibitório em altas concentrações (100 mM), devido a competição pelos sítios de ligação da resina, mas em concentrações menores os resultados podem ser outros, colaborando em parte para resultados mais expressivos.

7. Referências Bibliográficas¹

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.** v.72, p.248-254. 1976.

CASALETTI, L.; TAUHATA, S. B. F.; MOREIRA, J. E. and LARSON, R. E. Myosin-Va proteolysis by Ca^{2+} /calpain in depolarized nerve endings from rat brain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.308, p.159-164. 2003.

CHENEY, R. E. Purification and assay of myosin V. **Methods in Enzimology.** v.298, p.3-18. 1998.

COY, D. L.; HANCOCK, W. O.; WAGENBACH, M. and HOWARD, J. Kinesin's tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain. **Nature Cell Biology.** v.1, p. 288-292. 1999.

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

¹ Referências segundo a NBR 6023, 2002

GERSHONI, J. M.; PALADE, G. E. Protein blotting: principles and application. **Anal Biochem.** v.131, p.1-15. 1982.

HASSON, T.; MOOSEKER, M. S. Vertebrate unconventional myosins. **J. Biol. Chem.** v. 271, n.28 p. 16431-434. 1996.

HEINONEN, J. K.; LATHI, R. J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. **Anal. Biochem.** v.113, p.313-317. 1981.

HIROKAWA, N.; NODA, Y.; OKADA, Y. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. **Curr. Opin. Cell Biol.** n.10, p. 60-73. 1998.

HODGE, T.; COPE, J. T. U. A myosin family tree. **J. of Cell Science.** v.113, p.1-2. 2000.

HOMMA, K.; SAITO, J.; IKEBE, R.; IKEBE, M. Ca^{2+} -Dependent regulation of the motor activity of myosin V. **The J. Biol. Chem.** v.275, n.44, p.34766-34771. 2000.

KARCHER, R. L.; DEACON, S. W. and GELFAND, V. Motor-cargo interactions: the key to transport specificity. **Trends in Cell Biology.** v.12, n.1, p.21-27. 2002.

KOWOSZYNSKI, M.; WOJTCZAK, A. Apyrases (ATP diphosphohydrolases, E. C. 3. 6. 1. 5): function and relationship to ATPases. **Biochem. Biophys. Acta.** v.1310, p.233-241. 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** v.227, p.680-685. 1973.

LI, X.; MABUCHI, K.; IKEBE, R. and IKEBE, M. Ca^{2+} -induced activation of ATPase activity of myosin Va is accompanied with a large conformational change. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.315, p.538-545. 2004.

MERMALL, V.; POST, P.L.; MOOSEKER, M. S. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic and signal transduction. **Science,** v.279, p.527-533. 1998.

MURESAN, V.; STANKEWICH, M. C.; STEFFEN, W.; MORROW, J. S.; HOLZBAUR, E. L. F. and SCHNAPP, B. J. Dynactin-dependent, dynein-driven vesicle transport in the absence of membrane proteins: a role for spectrin and acidic phospholipids. **Molec. Cell.** v.7, p.173-183. 2001.

NASCIMENTO, A. A. C.; CHENEY, R. E.; TAUHATA, S. B. F.; LARSON, R. E.; MOOSEKER, M. S. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain Myosin V. **The J. Biol. Chem.** v.271, n.29, p.17561-17569. 1996.

OHYAMA, A.; KOMIYA, Y. and IGARASHI, M. Globular tail of myosin-V is bound to VAMP/synaptobrevin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.280, p.988-991. 2001.

SCHLIWA, M. and WOHLKE, G. Molecular motors. **Nature.** v.422, p.759-765. 2003.

SELLERS, R. J. Myosins: a diverse superfamily. **Biochim. Biophys. Acta,** v.1496, p.03-22. 2000.

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol. Biol.** v.79, p.237-248. 1973.

REDDY, V.; REDDY, A. S. N. The calmodulin-binding domain from a plant kinesin functions as a modular domain in conferring Ca^{2+} -calmodulin regulation to animal plus-and minus-end kinesins. **The J. Biological Chem.** v.277, n.50, p.48058-48065. 2002.

TAKUMA, T.; ARAKAWA, T.; TAJIMA, Y. Interaction of SNARE proteins in rat parotid acinar cells. **Arc. of Oral Biol.** v.45, p.369-375. 2000.

TIEDGE, H.; BLOOM, F. E. and RICHTER, D. Molecular kinesin in cellular function and plasticity. **PNAS.** v.98, n.13, p.6997-6998. 2001.

TITUS, M. A. – Motor proteins: myosin V – the multi-purpose transport motor. **Current Biology.** v.7, p.301-304. 1997.

THOMPSON, R. and LANGFORD, G. M. Myosin superfamily evolutionary history. **The Anatomical Record.** v.268, p.276-289. 2002.

VALE, R. D. The molecular motor toolbox for intracellular transport. **Cell.** v.112, p.467-480. 2003.

VALE, R. D.; GOLDSTEIN, LSB. One motor, many tails: an expanding repertoire of force-generating enzymes. **Cells.** v.60, p.883-885. 1990.

WANG, F.; THIRUMURUGAN, K.; STAFFORD, W. F.; HAMMER III, J. A.; KNIGHT, P. J. and SELLERS, J. R. Regulated conformation of myosin V. **The J. Biol. Chem.** v.279, n.4, p.2333-2336. 2004.

WU, J. SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling. **Mol. Cell. Biol.** v.20, p.23-33. 2000.