

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

LETÍCIA BORGES EUQUERES PARTATA

MON  
577.1  
P273a  
TES/MEM

ANÁLISE DOS EFEITOS DOS  
ANTAGONISTAS DE CALMODULINA - W-7 E  
MELITINA - NAS PROPRIEDADES  
BIOQUÍMICAS DA MIOSINA-V DE  
CÉREBRO

**Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola**

Uberlândia - MG  
Maio - 2000

SISBI/UFU



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**ANÁLISE DOS EFEITOS DOS ANTAGONISTAS DE  
CALMODULINA - W-7 E MELITINA - NAS  
PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA MIOSINA-V DE  
CÉREBRO**

*UMU  
577.1  
P273a  
TES/FU  
ex.1*

**LETÍCIA BORGES EUQUERES PARTATA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Curso de Pós Graduação em Genética e Bioquímica, para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica.

Uberlândia-MG  
Maio-2000

39207

Partata, Leticia Borges Euqueres, 1972

Análise dos efeitos dos antagonistas de calmodulina –W-7 e Melitina - nas propriedades bioquímicas da miosina-V de cérebro- Uberlândia: 2000

79

Foued Salmen Espindola

Tese de Mestrado - Universidade Federal de Uberlândia - Coordenação de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

1.motores moleculares - 2. Miosina-V Universidade Federal de Uberlândia.  
Coordenação de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, Senhor maior, e sentido de nossas vidas;

Ao meu pai, Geraldo, ausente deste mundo, mas sempre vivo em minha memória;

À minha mãe Maria Luiza por ter me dado a vida e a oportunidade desta conquista;

Ao meu companheiro Flávio Henrique, pelo estímulo, compreensão, amor e dedicação;

A minhas irmãs Valéria e Rosiane pelo apoio;

Um agradecimento especial ao meu sogro e minha sogra pelo constante incentivo;

Aos meus familiares e amigos pela força;

Ao meu orientador, o pesquisador Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, pela valiosa e indispensável orientação, e principalmente, por ter me proporcionado a oportunidade de conhecer o tortuosos caminhos da pesquisa científica, meus sinceros agradecimentos;

Ao Prof. Dr. Milton Vieira Coelho pela contribuição ao desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Luís Cláudio Cameron pela valiosa atenção;

A Prof<sup>ª</sup> Dra Fernanda Mani pelo apoio e amizade;

Ao Dr. Sinji Borges Ferreira Tauhata pelas sugestões;

Ao Prof. Dr. Roy Edward Larson pelo acesso ao Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para a purificação da G-actina;

Ao Prof Dr. Wilson Felipe do Laboratório de Neurociências pelo financiamento das gaiolas e fornecimento de espaço para os pintainhos;

Ao Prof. Dr. Luís Ricardo Goulard pela disponibilidade dos equipamentos necessários à realização deste trabalho;

Ao DECFIS pela concessão do espaço físico para o sacrificio dos animais e a FUNDAP pela contribuição na preparação do pó-cetônico;

À Granja Planalto pelo fornecimento gratuito de pintainhos;

À Coordenação e a todos os professores do Curso de Pós Graduação em Genética e Bioquímica pela atenção;

À todos os colegas e amigos da Pós-Graduação;

Ao Júnior pelos ensinamentos e incentivo no mestrado.

Ao Pablo e Andreia, não tenho palavras para expressar meu agradecimento. Não só pelo estímulo e ajuda durante a execução deste trabalho, mas principalmente pelo carinho e amizade.

Aos colegas do Laboratório (Fátima, Lissandra, Lúcia, Danielle, Alexandre, Maura, André, Hugo, Carla, Edilge, Wellington, Luís, Sybelly, Camila e Thiago) pelo convívio e ajuda em diversos momentos.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>1.INTRODUÇÃO</b>   | 1  |
| 1.1. Miosinas não convencionais   | 2  |
| 1.2. As miosinas da classe V  | 4  |
| 1.3. Caracterização dos domínios  | 7  |
| 1.4. Caracterização bioquímica da BM-V  | 11 |
| 1.5. Localização celular  | 15 |
| 1.6. Funções  | 16 |
| 1.7. Calmodulina  | 17 |
| 1.8. Antagonistas de Calmodulina  | 21 |
| <br>  |    |
| <b>2.OBJETIVOS</b>  | 24 |
| <br>  |    |
| <b>3.MATERIAIS E MÉTODOS</b>  | 25 |
| 3.1. Purificação de BM-V  | 25 |
| 3.2. Purificação de actina de músculo esquelético de galinha<br>e preparação do pó cetônico | 26 |
| 3.2.2. Preparação de G-actina a partir do pó cetônico                                       | 28 |
| 3.2.3. Preparação de F-actina e sua estabilização com faloidina                             | 29 |
| 3.3. Purificação de calmodulina de cérebro bovino   | 29 |
| 3.4. Ensaio de ATPase   | 30 |
| 3.5. Ensaio de cossedimentação da BM-V com melitina   | 30 |
| 3.6. Ensaio de sedimentação da BM-V com melitina e W-7                                      | 32 |
| 3.7. Proteólise por calpaína  | 32 |
| 3.8. Proteólise por calpaína e ensaio com Q-Sepharose                                       | 33 |
| 3.9. Dosagem de proteínas   | 33 |
| 3.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS<br>(SDS-PAGE)                | 33 |
| 3.11. <i>Western Blot</i>   | 34 |
| 3.12. Aquisição e análise de imagens  | 35 |

---

|   | <i>Índice</i> |
|---|---------------|
| 3.13. Cálculo da concentração de cálcio livre | 35            |
| <b>4.RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>               | 36            |
| <b>5.CONCLUSÃO</b>                            | 62            |
| <b>6.RESUMO</b>                               | 63            |
| <b>7.SUMMARY</b>                              | 64            |
| <b>8.BIBLIOGRAFIA</b>                         | 65            |

## ABREVIATURAS

|                  |   |
|------------------|---|
| ATP              | adenosina 5' trifosfato   |
| BBMI             | "brush border myosin I" (miosina I da borda em escova)                |
| BM-V             | brain myosin-V (miosina-V de cérebro)                                 |
| CaM              | calmodulina   |
| CaMK             | proteína quinase dependente de $Ca^{2+}$ /calmodulina                 |
| cDNA             | ácido desoxirribonucléico complementar                                |
| C-terminal       | carboxi-terminal  |
| DTT              | ditiotretitol   |
| EDTA             | ácido etilenodiaminoteracético  |
| EGTA             | ácido etilenoglicol-bis-( $\beta$ amino etil éter) N', N'-tetracético |
| ELC              | "essencial light chain" – cadeia leve essencial de miosina            |
| F-actina         | actina filamentosa (polimerizada)                                     |
| kDa              | kilodaltons   |
| Hepes            | ácido N-2-hidroximetilpiperazina N'-etanosulfônico                    |
| NMR              | ressonância magnética nuclear   |
| N-terminal       | amino-terminal  |
| PMSF             | fluoreto de fenilmetilsulfonila                                       |
| RNA <sub>m</sub> | ácido ribonucleico  |
| S-500            | sephacryl 500   |
| SDS              | dodecil sulfato de sódio  |
| SDS-PAGE         | eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS              |
| TA               | tampão da amostra   |
| TCA              | ácido tricloroacético   |
| TBS-T            | <i>Tris buffer saline</i> - tween                                     |
| TMA-E            | resina "tentáculo" de troca de ânions                                 |
| TRIS             | hidroximetilaminometano   |
| W-7              | aminohexil 1-naftalenosulfonamida                                     |

## 1. INTRODUÇÃO

Através da biologia celular são continuamente descobertos novos papéis para o citoesqueleto. A revolução sobre seu conhecimento tornou-se possível graças à caracterização funcional de novas proteínas a ele associadas, projetos de seqüenciamento genômico e à bioinformática (SALMON, WAY, 1999).

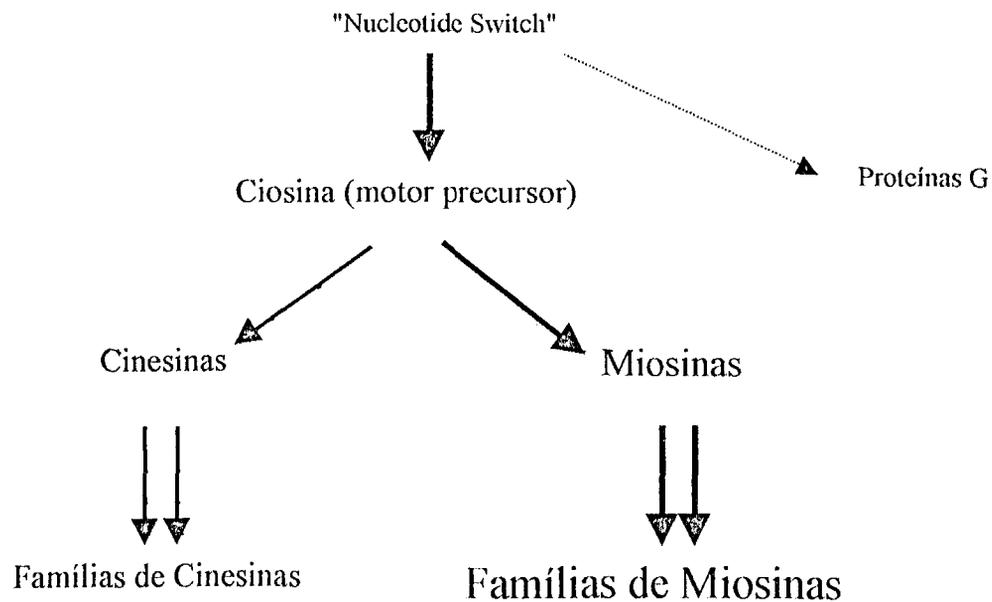
Microfilamentos e microtúbulos, principais componentes do citoesqueleto, representam complexos sistemas de polímeros que desempenham papéis essenciais durante muitos processos celulares, que incluem segregação cromossômica, citocinese e motilidade (MOREAU, WAY, 1999).

As superfamílias das proteínas motoras cinesinas e dineínas, associadas aos microtúbulos, atuam em mecanismos celulares como o transporte de organelas e mitose (HIROKAWA *et al.*, 1998). Em adição aos motores dependentes de microtúbulos encontramos as miosinas não-convencionais, dependentes de actina, que estão envolvidas no tráfego de membranas e no movimento de organelas.

SMALL *et al.* (1999) sugerem que o citoesqueleto de actina desempenha o principal papel na determinação da forma celular. No entanto, sua própria reorganização está sujeita a modulação por interações extracelulares e por atividades dependentes de microtúbulos. Assim, a interação entre microfilamentos e microtúbulos é uma característica importante na adesão e motilidade celular.

Com base em similaridades estruturais, propõe-se que as cinesinas, miosinas e proteínas G possuem um ancestral comum (VALE, MILLIGAN, 2000). A evolução destes motores moleculares encontra-se representada na Figura 1.

As funções de diferentes classes de miosinas são investigadas através de análises bioquímicas, genéticas, citológicas, e estudos de localização sugerem que as miosinas da classe V relacionam-se com o transporte de organelas (MERMALL *et al.*, 1998; BAKER, TITUS, 1998).



**Figura 1** - Evolução das proteínas motoras miosinas e cinesinas (VALE, MILLIGAN, 2000, com modificações).

### 1.1. Miosinas não convencionais

As miosinas são proteínas motoras que se translocam ao longo dos filamentos de actina de uma maneira dependente de ATP (BAKER, TITUS, 1998). São classificadas com base nas comparações da estrutura primária dos domínios motores dos genes das cadeias pesadas das miosinas conhecidas (MERMALL *et al.*, 1998). A superfamília das miosinas consiste de 17 classes distintas estruturalmente (HODGE, COPE, 2000).

A Figura 2 mostra a árvore filogenética atual com as 16 classes e seus respectivos modelos esquemáticos (HODGE, COPE, 2000).

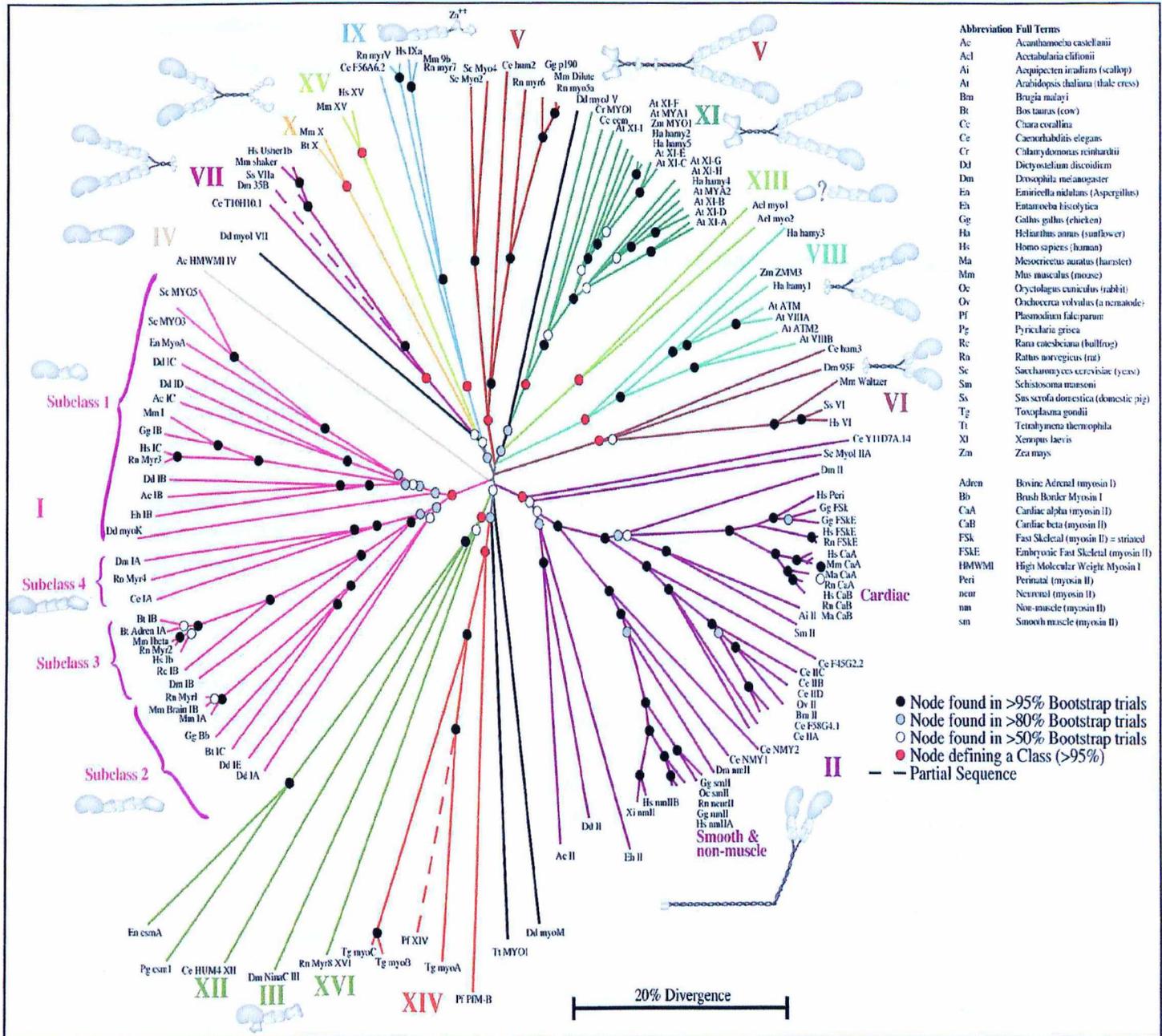


Figura 2. Árvore filogenética das 16 classes de miosinas atualmente descritas (HODGE, COPE, 2000)

A maioria das miosinas consiste de um domínio motor N-terminal ou cabeça, um domínio pescoço ou regulatório, sítio de ligação das cadeias leves, e um domínio cauda, específico para cada classe. A exceção é a miosina de *Toxoplasma gondii* (classe XIV), que não possui domínio pescoço regulatório (MERMALL *et al.*, 1998).

Informações considerando a função e propriedades mecanoquímicas de muitas destas classes de miosinas ainda são escassas em relação às bem caracterizadas miosinas das classes I, II e V.

Na Tabela I podemos observar a diversidade de funções das miosinas não convencionais nos processos celulares.

**Tabela I – Funções potenciais de miosinas não convencionais (extraído de MERMALL *et al.*, 1998, TAUHATA, 1999).**

| Função em potencial                              | Miosina                             | Classe |
|--|-------------------------------------|--------|
| Crescimento e desenvolvimento celular            | MyoA,B,C de <i>Dictioselium</i>     | I      |
|  | Myo 3p e 5p de levedura             | I      |
|  | MYOA de <i>Aspergillus</i>          | I      |
| Movimento Celular                                | MyoA e B de <i>Dictiostelium</i>    | I      |
| Transporte de RNA                                | Myo4p de levedura                   | V      |
| Movimento de partículas e organelas              | BM-V                                | V      |
|  | Dilute de camundongo                | V      |
|  | Myo2p de levedura                   | V      |
|  | 95F de <i>Drosophila</i>            | VI     |
| Localização de quitina                           | Myo2p de levedura                   | V      |
| Transporte de melanossomos                       | Dilute de camundongo                | V      |
| Herança vacuolar                                 | Myo2p de levedura                   | V      |
| Endocitose                                       | MyoA, B e C de <i>Dictiostelium</i> | I      |
|  | Myo 3p e 5p de levedura             | I      |
| Exocitose  | Myo A e B de <i>Dictiostelium</i>   | I      |
|  | Myo 3p e 5p de levedura             | I      |
|  | MYOA de <i>Aspergillus</i>          | I      |
| Fotorreceptor de membrana                        | ninaC de <i>Drosophila</i>          | III    |
|  | miosina 7a de humano                | VII    |
| Fototransdução                                   | ninac de <i>Drosophila</i>          | III    |
| Integridade rabdomérica                          | ninac de <i>Drosophila</i>          | III    |
| Ancoramento e estabilização de estereocílios     | Snell's waltzer de camundongo       | VI     |
|  | M7a de humano                       | VII    |
| Adaptação de células ciliares                    | M1 $\beta$                          | I      |
| Organização de actina em estereocílios da cóclea | Myo15 de camundongo                 | XV     |
|  | MYO15 de humano                     | XV     |
| Diferenciação leucocitária                       | M9b de humano                       | IX     |
| Transdução de sinal                              | M9b de humano                       | IX     |
|  | Myr5 de rato                        | IX     |

## 1.2. As miosinas da classe V

A miosina-V foi originalmente identificada em preparações de cérebro de coelhos, como uma proteína ligante de calmodulina (CaM) com peso molecular em torno de 190 kDa (p190) associada ao citoesqueleto de actina (LARSON *et al.*, 1988; LARSON *et al.*, 1990).

LARSON *et al.* (1990) mostraram que uma fração obtida de cérebro e enriquecida em p190 apresentava atividade Mg-ATPásica ativada por actina, característica de todas as miosinas, e esta atividade era estimulada por cálcio/CaM; a mesma fração, entretanto, não apresentava a atividade K-EDTA-ATPásica também característica de miosinas. Além disto, com base na imuno-reatividade diferencial de anticorpos policlonais gerados contra a cadeia pesada da p190, ficou demonstrado que esta proteína não era um fragmento proteolítico da miosina II, sendo ainda distinta desta miosina.

ESPINDOLA *et al.* (1992) encontraram evidências bioquímicas e imunológicas de que a p190 apresentava propriedades similares às de miosinas. Observaram a interação da actina com a p190 e determinaram seu efeito na sedimentação com actina em baixas velocidades de centrifugação.

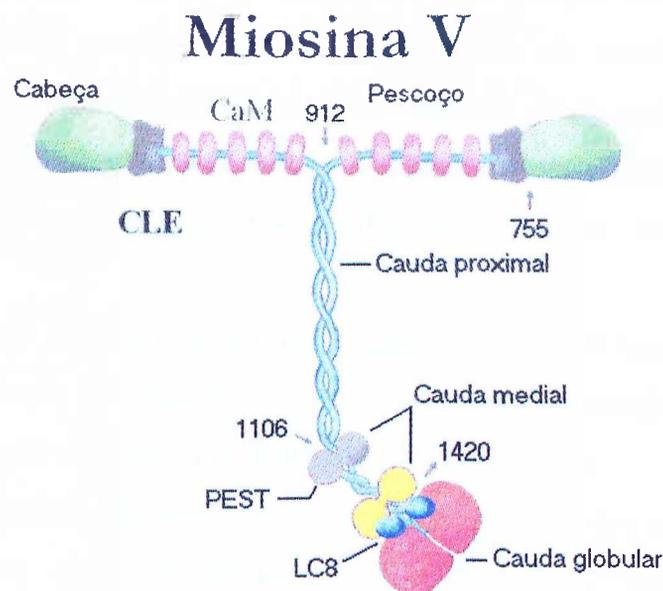
Os genes da cadeia pesada da miosina-V foram clonados em camundongo, levedura e galinha definindo a classe V dos motores baseados em actina. O seqüenciamento completo do cDNA da BM-V, mostrou que a cadeia pesada é composta por 1830 aminoácidos (212.509 kDa) (ESPREFICO *et al.*, 1992).

São conhecidas a miosina-V na levedura *Saccharomyces cerevisiae*: *MYO2p* (JONHSTON *et al.*, 1991) e *MYO4p* (HARRER *et al.*, 1994), o produto do gene *dilute* de camundongo (MERCER *et al.*, 1991), a miosina-V de cérebro de galinha (BM-V) (ESPREFICO *et al.*, 1992; SANDERS *et al.*, 1992), a miosina de cérebro humano (ENGLE, KENNET, 1994), a *MYOJ* de *Dictyostelium* (PETERSON *et al.*, 1996), a *myr6* de rato (ZHAO *et al.*, 1996), o produto do gene *HUM-2* do nematóide *Caenorhabditis elegans* (BAKER, TITUS, 1997), a miosina-V de ouriço-do-mar (SIROTKIN, BONDER, 1997), a miosina-V de lula (MOLYNEAUX, LANGFORD, 1997) e a miosina-V (*dindum*) de *Drosophila* (BONAFÉ, SELLERS, 1998).

Em vertebrados, observamos a existência de três subclasses distintas de miosina-V. A miosina Va (MVa): miosina-V de cérebro de galinha (BM-V), o gene *dilute* de camundongo e a miosina-V humana (HumcM-VA) (BEMENT, 1994); a miosina Vb (MVb): a *myr6* de rato (HUANG, 1990) e a miosina Vc (MVc) de humanos (HumcM-

Vc) (RODRIGUES, CHENEY, 1998). Comparações do RNAm e dados da proteína de expressão das MVa, b e c mostram que as três isoformas expressam-se diferentemente e podem ter funções celulares distintas ou sobrepostas (RECK-PETERSON *et al.*, 2000).

A visualização da BM-V por microscopia eletrônica, depois da adsorção em mica, mostrou que ela é uma molécula dimérica, apresentando pescoço longo e cauda em sua maior parte globular, onde se intercalam certas porções em  $\alpha$ -hélice *coiled-coil* (CHENEY *et al.*, 1993). Análises densitométricas de várias preparações de BM-V revelaram a presença de aproximadamente 4 a 5 calmodulinas (CaM) por cadeia pesada. Outras duas subunidades adicionais de 17 e 23 kDa eram copurificadas com a BM-V e ocupavam um dos sítios IQ do domínio pescoço (CHENEY *et al.*, 1993). Na Figura 3 está representado um modelo hipotético da estrutura da BM-V, elaborado a partir de sua visualização por microscopia eletrônica (CHENEY *et al.*, 1993).



**Figura 3 - Modelo esquemático da estrutura da miosina-V.**

A estequiometria da CaM (16,8 kDa), cadeias leves (23 e 17 kDa) e cadeia pesada é de 4,0:0,3:0,7:1,0 sugerindo que cada molécula de BM-V tenha de 10 a 12 cadeias leves, das quais 8 parecem ser CaM (CHENEY *et al.*, 1993). ESPREAFICO *et*

*al.* (1992) mostraram que as cadeias leves de CaM ligavam-se ao domínio pescoço e que não havia sido detectada nenhuma interação destas a outra parte da molécula.

### 1.3. Caracterização dos domínios

As miosinas da classe V são miosinas não convencionais cujas cadeias pesadas formam dímeros que consistem de três domínios principais: domínio cabeça globular, domínio pescoço em  $\alpha$ -hélice e um domínio cauda consistindo de regiões globulares intercaladas com regiões em  $\alpha$ -hélice super espiralada (CHENEY *et al.*, 1993).

O domínio amino-terminal ou domínio motor contém ambos os sítios de hidrólise de ATP e de ligação com actina, o domínio pescoço em  $\alpha$ -hélice que contém 6 sítios de ligação para as cadeias leves e o domínio cauda que constitui a região carboxi-terminal e apresenta segmentos diferentes que podem ser divididos em três subdomínios: cauda proximal que é um segmento em  $\alpha$ -hélice super espiralada responsável pela dimerização das duas cadeias pesadas, cauda medial que possui regiões globulares intercaladas com segmentos de  $\alpha$ -hélice super espiralada e a cauda distal, região C-terminal em forma globular (ESPREADICO *et al.*, 1992; CHENEY *et al.*, 1993).

O domínio cabeça globular ou domínio motor está localizado na região N-terminal da molécula. Consiste dos aminoácidos 1 ao 765 contendo os sítios de hidrólise de ATP e de ligação com actina (ESPREADICO *et al.*, 1992).

Foram identificadas duas regiões no domínio motor que podem potencialmente codificar funções classe-específicas (GOODSON *et al.*, 1999). São regiões já identificadas como *loops* superficiais na estrutura cristalina da miosina II de músculo esquelético de galinha e correspondem aos sítios proteolíticos mais bem caracterizados (RAYMENT *et al.*, 1993a).

O *loop* 1 está próximo ao sítio de ligação do ATP; substituições dentro desta região nas miosinas da classe II levam a uma alteração na taxa de liberação de ATP. O *loop* 2 relaciona-se à interação com actina. Substituições dentro deste domínio na

miosina II levam a alteração na afinidade da miosina por actina e na taxa de atividade ATPásica ativada por actina (GOODSON *et al.*, 1999, RECK-PETERSON, 2000).

Uma investigação destes domínios de *loop* dentro da MVa revelou que somente o *loop* 1 é altamente conservado. Análises similares para todas as classes de miosina-V sugerem que o *loop* 1, mas não o *loop* 2 pode ter uma função classe específica. Como o *loop* 2 pode contribuir para a interação com actina, a falta de conservação desta região entre as miosinas pode indicar que nem todas as miosinas da classe V são motores processivos ou que esta região não é importante para o movimento processivo (GOODSON *et al.*, 1999).

A determinação da estrutura primária dos membros conhecidos da classe V mostrou que o domínio cabeça é altamente conservado, de leveduras a vertebrados, apresentando 42% de identidade e 23% de homologia (LARSON, 1996).

O domínio pescoço em  $\alpha$ -hélice consiste do aminoácido 765 ao 912. É alongado quando comparado a outras miosinas e é o sítio de ligação à CaM e às outras cadeias leves (pertencentes às EF-hand – família das proteínas ligantes de cálcio). A estrutura primária do pescoço contém 6 motivos repetitivos denominados motivos IQ (IQXXQRGXXXRXXQ) que são encontrados na maioria das miosinas e representam os sítios de ligação às cadeias leves. Cada um consiste de 23 aminoácidos em resíduos básicos e hidrofóbicos (ESPREADICO *et al.*, 1992; LARSON, 1996).

A ligação das cadeias leves de CaM e outros membros das EF-hand ao domínio pescoço pode estabilizar o “lever arm” (braço-movimento de alavanca) que é necessário para gerar o passo e a velocidade de deslizamento da BM-V no filamento de actina (MEHTA *et al.*, 1999).

As proteínas de 17 e 23 kDa são ambas membros da família das cadeias leves essenciais, que nas miosinas da classe II estão ligadas ao primeiro dos dois motivos IQ, dentro do domínio pescoço. Análises de microsequenciamento revelaram que as cadeias leves de 17 e 23 kDa possuem 100% de identidade com as cadeias leves essenciais da miosina II codificadas, respectivamente, pelos genes L17 e L23 (ESPINDOLA *et al.*, 2000a).

KAWASHIMA *et al.* (1987) isolaram clones de cDNA do RNAm da cadeia leve de 23 kDa de miosina de embriões de galinha, pela hibridização cruzada com o cDNA de Mlc1 de músculo esquelético. Análises sequenciais destes clones revelaram que ele continha 832 nucleótidos e predizia um polipeptídeo com 185 aminoácidos com um

peso molecular de 20,687 KDa. A sequência de aminoácidos deduzida para a L23 mostrou alta similaridade de sequências com as cadeias leves de miosinas de vários tecidos, indicando que a L23 pertence a este grupo. Usando clonagem de cDNA e sondas de hibridização, foi verificado que a L23 é regulada de forma temporal e tecido-específica. É transitoriamente expressa, por um simples gene, em músculo esquelético, cardíaco embrionário de galinhas e em tecidos de cérebro durante os vários estágios de desenvolvimento investigados.

O extenso domínio pescoço apresenta sequência de aminoácidos pouco conservada, com somente 22% de identidade entre as classes, sendo que todo o domínio pescoço apresenta 47% de resíduos hidrofóbicos e 30% de resíduos básicos, típico de polipeptídeos que ligam as cadeias leves de calmodulina (LARSON, 1996).

A cauda possui as maiores variações na composição de aminoácidos, apresentando pouca identidade de sequência entre os membros desta classe (LARSON, 1996). A cauda das miosinas da classe V consiste de uma região predita a formar  $\alpha$ -hélice super espiralada de comprimento variável, seguida por domínios globulares que podem estar envolvidos com a ligação de cargas ou com a localização dentro da célula (CHENEY *et al.*, 1993).

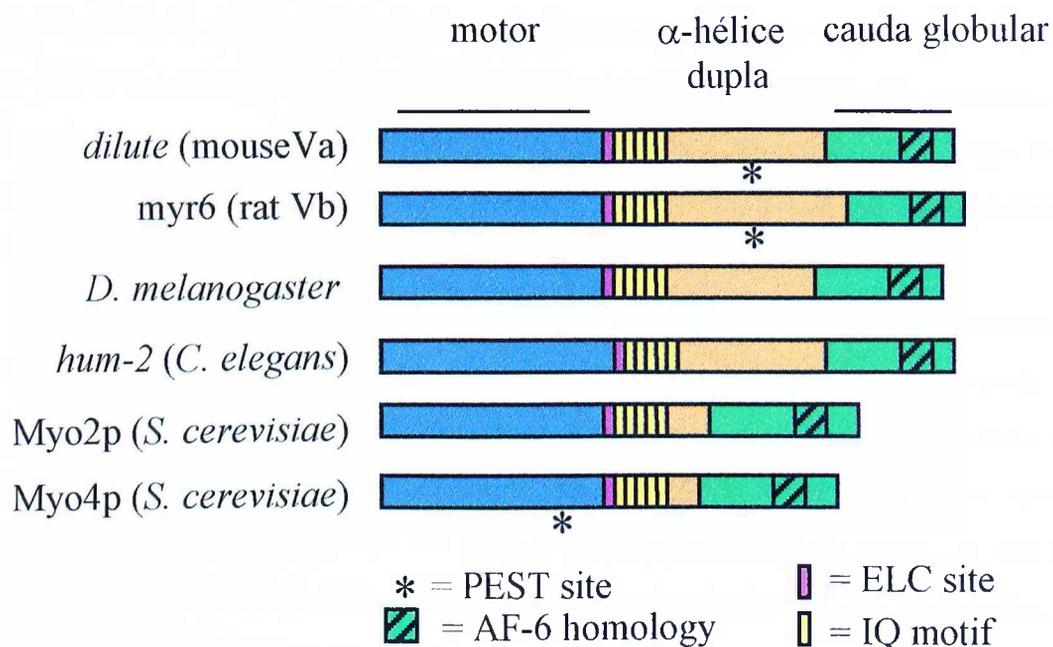
O domínio cauda globular da BM-V possui um domínio denominado DIL identificado como um possível sítio de ligação de membranas (PONTING, 1995). Este motivo é encontrado nos produtos do gene de *Drosophila* canoe (MIYAMOTO *et al.*, 1995) e AF-6 humano (PRASAD *et al.*, 1993). AF-6 possui uma complexa estrutura de domínios que incluem os domínios ligantes de RAS, domínios encontrados em proteínas como cinesinas, e domínios PDZ em adição a domínios como os de miosina-V (PONTING, 1995). Isto sugere que a AF-6 possa representar uma importante ligação entre o citoesqueleto, vias de sinalização celular e interações célula-célula (LANGFORD, MOLYNEAUX, 1998; RECK-PETERSON *et al.*, 2000).

ESPINDOLA *et al.* (1996) verificaram a existência de uma proteína de 10kDa associada a BM-V. Esta subunidade de 10 kDa foi primeiramente caracterizada como homóloga a uma das cadeias leves da dineína axonemal e citoplasmática (DLC8) com a qual apresentou de 85 a 100% de identidade (KING, PATEL-KING, 1995; KING *et al.*, 1996). Esta proteína foi identificada também como um inibidor neuronal da NO sintase (PIN) (JAFFREY, SNYDER, 1996), como um "interactor" com a proteína de controle transcricional 1 kappaB alpha (CREPIEUX, 1997) e como uma proteína ligante do

RNA<sub>m</sub> do 3'-UTR do hormônio da paratireoide (EPSTEIN *et al.*, 2000). A DLC8/PIN é uma proteína altamente conservada em inúmeros organismos (KING, PATEL-KING, 1995).

BENASHSKI *et al.* (1997) e ESPINDOLA *et al.* (2000a) mostraram que a DLC8/PIN interage com a cauda da BM-V e a relação estimada através de análises densitométricas entre a cadeia pesada de BM-V:cadeia leve de 10 kDa foi de 1:0,97 sendo sua estequiometria de interação de duas DLC8/PIN por dímero de miosina V. Esta proteína adicional associada a BM-V pode desempenhar papéis críticos na estrutura e função desta proteína (ESPINDOLA *et al.*, 2000a).

Quando o gene da cadeia pesada da BM-V foi clonado, uma seqüência PEST dentro da região super-espinalada do domínio cauda foi identificada. A seqüência PEST (prolina, glutamato, serina e treonina) está localizada entre os aminoácidos 1119 a 1138. A seqüência PEST tem importância na proteólise mediada por calpaína, uma cisteína protease intracelular não lisossomal ativada por cálcio. A proteólise por calpaína resultou na formação de um peptídeo cabeça de 65 kDa, um fragmento cauda estável de 80 kDa que engloba uma parte da cauda medial e a cauda globular e outro de aproximadamente 63 kDa, correspondente à região pescoço, cauda proximal e parte da cauda medial (NASCIMENTO *et al.*, 1996). A figura 4 representa esquematicamente a homologia dos domínios motor, pescoço e cauda da MV nos diferentes filamentos (RECK-PETERSON *et al.*, 2000)



**Figura 4 - Homologia do domínio motor, pescoço e cauda das miosinas da classe V nos diferentes filos (RECK-PETERSON *et al.*, 2000).**

#### 1.4. Caracterização bioquímica da BM-V

A BM-V exibe baixa atividade K-EDTA-ATPásica e Ca-ATPásica (1.8 e 0.8 ATP/s/cabeça). A atividade Mg-ATPásica de relevância fisiológica também é baixa (~0,3 ATP/s) a não ser quando ativada pela presença de F-actina e cálcio. Na ausência de cálcio, a adição de actina não tem efeito na atividade Mg-ATPásica. No entanto, em concentrações de cálcio acima de 3 $\mu$ M a atividade aumenta dramaticamente na presença de actina e CaM exógena, com taxas de 23 ATPs/segundo/cabeça de BM-V (NASCIMENTO *et al.*, 1996).

A BM-V é um motor molecular capaz de translocar filamentos de actina na velocidade de 200 a 400 nm/s. Porém, enquanto o cálcio aumenta a atividade ATPásica da BM-V, não possui efeito estimulatório nos ensaios de motilidade “in vitro”. Esta inibição é minimizada pela adição de CaM exógena, mas a velocidade de deslizamento ainda é reduzida (CHENEY *et al.*, 1993). Essa diferença da sensibilidade ao cálcio em relação a atividade ATPásica da miosina-V e a motilidade de moléculas adsorvidas em

superfície permanecem inexplicadas. Foi sugerido que a adsorção da BM-V na superfície da câmara de motilidade, na ausência de cálcio, induza uma mudança estrutural que imita o efeito do cálcio na molécula em solução. Alternativamente, os efeitos inibitórios do cálcio na motilidade devem ser causados pelo aumento da adsorção do domínio pescoço na superfície, resultado da dissociação das cadeias leves de CaM induzida pelo cálcio. Isto deve conter o “lever arm” resultando a imobilidade (RECK-PETERSON *et al.*, 2000).

Muitas populações de organelas purificadas também exibem atividade motora de miosina-V “in vitro”. Populações de vesículas de cérebro de galinha enriquecida em BM-V e marcadores de vesículas sinápticas suportam o movimento de actina em velocidades equivalentes à da BM-V purificada (EVANS *et al.*, 1998). A BM-V associada a vesículas na presença de baixos níveis de detergente pode ser ativada suportando a motilidade, sugerindo que a BM-V nestas vesículas possam ser purificadas em estado inativo (EVANS *et al.*, 1998).

Nos experimentos de motilidade a importância da CaM foi demonstrada utilizando-se W-7 ([ N-(aminohexil)-1-naftalenosulfonamida]) (antagonista de CaM) na concentração de 100µM. Em tampão contendo EGTA-Ca<sup>2+</sup> o movimento foi bloqueado mostrando a dependência do cálcio para a ação do antagonista (CHENEY *et al.*, 1993). ESPINDOLA e WOLENSKI demonstraram que em ensaios de motilidade “in vitro”, a ação de miosina V no deslizamento de actina foi inteiramente inibida por W-7 (dados não publicados). Em análises de microscopia eletrônica pela técnica de sombreamento rotatório foram observadas alterações na estrutura da BM-V submetida a bombardeamento de W-7 na presença de cálcio, possivelmente devido a dissociação das moléculas de CaM da miosina-V (ESPINDOLA, HEUSER, MOOSEKER, dados não publicados).

A BM-V exibe alta afinidade de ligação com F-actina na presença de ATP ou ATP-gamma-S, como ensaiado pela combinação de métodos, incluindo cossedimentação, “quenching” de fluorescência com a pirene-F-actina e microscopia eletrônica (NASCIMENTO *et al.*, 1996; TAUHATA, 1999). Na ausência de ATP a miosina-V faz ligações cruzadas com os filamentos de actina (CHENEY *et al.*, 1993). Notavelmente na presença de ATP e cálcio, a miosina-V retém a habilidade de fazer estas ligações cruzadas com os filamentos de actina (TAUHATA, 1999),

presumivelmente, devido a ligações cabeça-cabeça entre estes dois filamentos, já que a cauda não liga actina (NASCIMENTO *et al.*, 1996).

CAMERON *et al.* (1998) investigaram a fluorescência intrínseca do triptofano na BM-V para monitorar as mudanças de conformação induzidas pelo cálcio. Estas mudanças de conformação foram relacionadas com a dissociação das moléculas de CaM da BM-V. A intensidade de fluorescência diminuiu 17% pela adição de concentrações submicromolares de cálcio. Este processo foi revertido pela adição de EGTA e altas concentrações de CaM mostrando que, possivelmente, é parte do sistema regulado pelo cálcio.

COELHO, LARSON (1993) mostraram que o domínio cauda da BM-V estava sujeito a fosforilação por uma proteína quinase associada com o citoesqueleto de actina (CaMK-II) e controlada por íons  $Ca^{2+}$ . COSTA *et al.* (1999) mostraram que a BM-V imunoprecipita juntamente com a CaMK-II em uma fração de terminais nervosos solubilizada com Triton X-100. Na presença de cálcio e BM-V a CaMK-II foi autofosforilada e subsequentemente fosforilou a BM-V. Experimentos de overlay e imunoprecipitação empregando BM-V, CaMK-II purificada e anticorpos específicos para BM-V mostraram uma interação física entre as duas proteínas. Esses resultados sugerem que a BM-V com suas cadeias leves de CaM poderiam estar transportando a própria CaM para ativação de CaMK-II em sítios específicos da célula (COSTA *et al.*, 1999).

MANI *et al.* (1998) e PREKERIS, TERRIAN (1997) mostraram que a BM-V está presente em sinaptossomas e vesículas sinápticas, sugerindo a participação desta molécula em algum processo nos terminais nervosos, local que também é enriquecido em CaMK-II, e que, esta fosforilação pode ser um ponto de controle e interação com vários sistemas como: proteólise induzida por calpaína; atividade enzimática da proteína e sua afinidade por cálcio e actina.

Com os fragmentos da BM-V expressos em baculovírus foi possível obter dados cinéticos e regulatórios verificando o papel das cadeias leves no 1º e 2º IQ do domínio pescoço (WANG *et al.*, 2000; TRYBUS *et al.*, 1999; DE LA CRUZ *et al.*, 1999). Constructos monoméricos de MVa de murinos expressos em baculovírus e constituídos pelo domínio motor e por dois motivos IQ apresentaram atividade Mg-ATPásica potencialmente regulada pelo cálcio quando um excesso de CaM estava presente, neste

caso, o mecanismo de inibição pareceu ser a dissociação das CaM ligadas (TRYBUS *et al.*, 1999).

A atividade Mg-ATPásica da miosina-V sem a cauda expressa em baculovírus foi também ativada por baixas concentrações de actina, mas, ao contrário da miosina-V purificada de tecidos, esta ativação não necessitou de cálcio (WANG *et al.*, 2000; DE LA CRUZ *et al.*, 1999). Estes resultados sugerem que a regulação da atividade Mg-ATPásica pelo cálcio requer um complexo de cadeias leves de CaM mediando interações alostéricas entre os domínios cabeça, pescoço e cauda da molécula de miosina-V (WANG *et al.*, 2000; DE LA CRUZ *et al.*, 1999).

A MVa purificada de tecidos e a MVa de camundongo expressa em baculovírus movem F-actina a 400 nm/segundo dependendo das condições de temperatura e de sais (CHENEY *et al.*, 1993; WOLENSKI *et al.* 1993; WANG *et al.*, 2000).

Propriedades biofísicas de uma única molécula de miosina-V foram examinadas utilizando ensaios de ferramentas ópticas. Estes experimentos demonstraram que uma simples molécula de MVa pode dar múltiplos passos antes de parar em uma armadilha de força de resistência de aproximadamente 3 pN, uma força um pouco menor do que a medida para cinesinas (MEHTA *et al.*, 1999; SVOBODA, BLOCK, 1994).

Estudos de ligação de actina e atividade Mg-ATPásica indicam que a MVa possui alta afinidade por actina na presença de ATP, uma propriedade diferente de outras miosina, mas consistente com motores processivos. Motores processivos podem ser submetidos a múltiplos ciclos de hidrólise de ATP acoplados com o movimento ao longo dos filamentos de actina sem se difundir (MEHTA *et al.*, 1999).

O movimento da miosina-V pode ocorrer através de dois mecanismos: a carga pode afetar o ciclo catalítico ou pode afetar a probabilidade e a direção do passo resultante do ciclo catalítico. A medida do tamanho do passo foi de 30-38 nm contra 4-17 nm reportado para a miosina II. Este grande passo é plausível dado ao comprimento do pescoço (aproximadamente 23 nm) e o ângulo (maior que 100°) entre as duas cabeças de miosina-V (CHENEY *et al.*, 1993). Como o passo entre 30 a 38 nm se repete na pseudo-hélice do filamento de actina (36 nm) permite que uma simples molécula de miosina-V e sua carga mova-se ao longo de um simples filamento sem ter que dar a volta ao redor deste filamento para encontrar o próximo sítio de ligação (MEHTA *et al.*, 1999).

## 1.5. Localização celular

Estudos imunocitoquímicos mostraram que a p190 estava presente na periferia e nas extensões dendríticas das células de Purkinje do cerebelo e também na região perinuclear do corpo celular de ratos (ESPINDOLA *et al.*, 1992, ESPREAFICO *et al.*, 1992). Foi encontrada, também, nas regiões ricas em organelas dos cones de crescimento de roedores e em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal de embriões de galinha (EVANS *et al.*, 1997; SUTER *et al.*, 2000).

Em vertebrados, numerosas interações entre as miosinas e o citoesqueleto de microtúbulos tem sido demonstradas. ESPREAFICO *et al.* (1998) localizaram MVa em centrossomos durante a interfase e a divisão celular em diferentes tipos celulares e TSAKRAKLIDES *et al.* (1999) verificaram que a localização intracelular da miosina-V nos centrossomos ocorria sem a interação com o domínio motor e era dependente de microtúbulos intactos.

EVANS *et al.* (1997) verificaram que miosina-V associada a organelas colocalizava com microtúbulos e filamentos de actina, sugerindo que esta proteína poderia ser carregada como um passageiro em organelas que são transportadas ao longo dos microtúbulos e que essas organelas também são capazes de se mover ao longo dos filamentos de actina.

Recentemente o domínio AF6/canoe da cauda da MVa mostrou interações físicas com as cinesinas. HUANG *et al.* (1999) mostraram que a MVa pode interagir diretamente com a KhcU, um motor de microtúbulos, indicando que o transporte celular é, em parte, coordenado através de interações diretas de moléculas motoras diferentes.

Os melanossomos representam a primeira organela que possui motilidade celular dependente de proteínas motoras baseadas em actina e microtúbulos (MOREAU, WAY, 1999). RODIONOV *et al.* (1998) mostraram que a distribuição uniforme dos grânulos de pigmentos nos melanócitos é dependente de motores baseados em actina em adição a movimentos dirigidos por motores baseados em microtúbulos. ROGERS, GELFAND (1998) usando melanossomos purificados de *Xenopus laevis* evidenciaram que os melanossomos são transportados ao longo de microtúbulos e filamentos de actina de uma maneira coordenada, e que a miosina-V está ligada aos melanossomos purificados.

BRIDGMAN (1999) investigando o papel que a MVa desempenhava no transporte axonal de organelas verificou que a atividade deste motor não era necessária para o transporte de longas distâncias em axônios e sim para o movimento local e processamento de organelas em regiões, como os terminais pré-sinápticos que não possuem microtúbulos.

LANGFORD *et al.* (1999) propuseram que movimentos de longa distância das vesículas ocorrem nos microtúbulos e os movimentos de curta distância nos filamentos de actina e que as vesículas de retículo endoplasmático liso são a principais populações de vesículas no axônio que usam a miosina-V para se mover nos filamentos de actina.

## 1.6. Funções

A Myo4 possui função no transporte do RNAm de leveduras. Nessas, o mutante *myo4* desempenha papel tanto no transporte direto como no ancoramento do RNA mensageiro requerido para a determinação do destino celular de proteínas essenciais em processos de conjugação (BAKER, TITUS, 1998).

Outra mutação na Myo2p de leveduras provoca nos mutantes desorganização do citoesqueleto de actina e acúmulo de vesículas no citoplasma, o que as tornam incapazes de realizar o brotamento (JONHSTON *et al.*, 1991, BAKER, TITUS, 1998). SCHOTT *et al.* (1999) descobriram que o domínio globular carboxiterminal da Myo2p liga vesículas secretórias e o domínio motor dirige a translocação da miosina e sua carga atada, ao longo dos cabos de actina para sítios de exocitose.

Muitos dos fenótipos associados à perda de função envolvem defeitos no tráfego de membranas. Na miosina-V são conhecidos dois tipos de mutações em camundongos, o *dilute* viral ( $d^v$ ) que, em homozigose, causa alterações no transporte de melanossomos dos melanócitos para os queratinócitos na base do pêlo, promovendo diluição na pigmentação normal do animal (MERCER *et al.*, 1991). A outra mutação denominada *dilute* letal ( $d^l$ ), manifestada também em homozigose, produz graves defeitos neurológicos que se caracterizam por convulsões, alterações da postura e do equilíbrio e morte precoce (MERCER *et al.*, 1991).

Normalmente, os pigmentos de melanossomos sintetizados nos melanócitos são transportados para os queratinócitos via processos dendríticos. Os melanócitos *dilute* possuem processos dendríticos normais morfologicamente e não mostram defeitos na

morfologia dos melanossomos (PROVANCE *et al.*, 1996; WEI *et al.*, 1997). No entanto, nos melanócitos *dilute* os melanossomos formam agregados em torno do núcleo, enquanto no tipo selvagem os melanossomos estão distribuídos no citoplasma. Além disso, a MVa tem papel direto no tráfego de melanossomos estando concentrada em regiões da célula que contém melanossomos em culturas primárias de melanócitos (PROVANCE *et al.*, 1996).

Em humanos, uma mutação no gene que codifica a miosina-V produz uma doença autossômica recessiva caracterizada por diluição pigmentar e imunodeficiência com fases de ativação linfocítica e macrofágica denominada Síndrome de Griscelli (PASTURAL *et al.*, 1997). Esta doença é caracterizada por uma diluição pigmentar na qual os melanossomos não estão presentes nos dendritos dos melanócitos, mas agrupados em torno do núcleo (GRISCELLI *et al.*, 1978; KLEIN *et al.*, 1994).

## 1.7. Calmodulina

A CaM, uma pequena proteína ácida de 148 aminoácidos, está presente em todas as células eucarióticas e pode ser considerada como a primeira codificadora de informação na célula. É o principal receptor intracelular de íons cálcio em células nervosas e o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM regula muitos sistemas enzimáticos envolvendo nervos e vesículas sinápticas (LARSON *et al.*, 1990; JAMES *et al.*, 1995).

Muitas miosinas não convencionais possuem ligadas ao domínio pescoço múltiplas cadeias leves de CaM. Elas são reguladas em parte pela interação das CaM com o  $\text{Ca}^{2+}$ , o que resulta em dramáticas alterações na atividade enzimática e mecanoquímica destas miosinas. Este método de regulação ocorre como consequência direta da dissociação de uma ou mais cadeias leves de CaM ou devido a efeitos alóstericos mediados pelas cadeias leves que permanecem ligadas à cadeia pesada na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (WOLENSKI *et al.*, 1993).

Os efeitos do  $\text{Ca}^{2+}$  e da CaM na atividade das miosinas foram mais intensivamente investigados nas miosinas da classe I de vertebrados. WOLENSKI *et al.* (1993) examinaram a regulação dependente de cálcio da miosina I de borda em escova (BBMI) pela sondagem dos possíveis papéis das cadeias leves de CaM. O cálcio

regula a atividade Mg-ATPásica da MIBB, ligando-se diretamente nas cadeias leves de CaM e induzindo-as à dissociação, a qual pode ser evitada pela adição de CaM exógena. Desse modo, a CaM atua como um repressor endógeno da atividade Mg-ATPásica. A dissociação de uma ou mais cadeias leves de CaM, por concentrações elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$ , causa a completa inibição da motilidade "in vitro" que pode ser recuperada pela adição de CaM exógena. Estes resultados sugerem que os efeitos do  $\text{Ca}^{2+}$  na sensibilidade a proteases, dissociação das cadeias leves de CaM e atividade Mg-ATPásica são mediados pela interação  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM e não pela interação direta do  $\text{Ca}^{2+}$  com as cadeias pesadas. Quando os sítios de ligação da CaM foram removidos proteoliticamente por quimiotripsina, o fragmento cabeça resultante mostrou elevada atividade Mg<sup>2+</sup>-ATPásica ativada por actina, a qual foi completamente insensível ao cálcio. Isto demonstrou que a CaM provoca na miosina um aumento da sensibilidade ao cálcio e atua como supressora inerente da atividade da BBMI na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ . A regulação das cadeias leves de CaM por  $\text{Ca}^{2+}$  pode também ser mediada pela fosforilação da cadeia pesada pela proteína quinase C na presença de fosfolipídios. A fosforilação diminui a afinidade da CaM pela cadeia pesada e pode ser inibida pela adição de CaM exógena. Assim, na BBMI o  $\text{Ca}^{2+}$  estimula a fosforilação e dissocia as cadeias leves de CaM (WOLENSKI, 1995).

Nas BBMI o  $\text{Ca}^{2+}$  estimula a atividade ATPásica ativada por actina sob condições nas quais 3 a 4 CaM são ligadas. Em contraste, inibe a ativação pela actina nas BBMI contendo somente 1 a 2 CaM. A ativação da BBMI pelo  $\text{Ca}^{2+}$  é presumivelmente disparada pelas mudanças de conformação induzidas pelo cálcio na CaM, que são transmitidas para a ATPase e os sítios de actina na cadeia pesada. Níveis fisiológicos de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulam ou inibem a atividade mecanoenzimática da MIBB, com um modo de regulação determinado pelo número de cadeias leves de CaM associadas (SWANLJUNG-COLLINS *et al.*, 1991).

Na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ , as CaM associam-se frequentemente aos motivos IQ. Em alguns casos, o  $\text{Ca}^{2+}$  atua liberando as cadeias leves de CaM destes sítios, o que é exatamente o oposto ao comportamento esperado para os convencionais sítios ligantes de CaM dependentes de cálcio (CHENEY *et al.*, 1993). Inúmeras proteínas que ligam CaM com alta afinidade não possuem motivos IQ, mas possuem 2 longas cadeias hidrofóbicas ou aminoácidos aromáticos separados por 12 resíduos (WOLENSKI, 1995).

Muitas miosinas I de vertebrados são purificadas com CaM e interessantemente a máxima ligação da CaM é conseguida na ausência de cálcio, em contraste com o já mostrado para outras enzimas ativadas por CaM (GELL *et al.*, 1998).

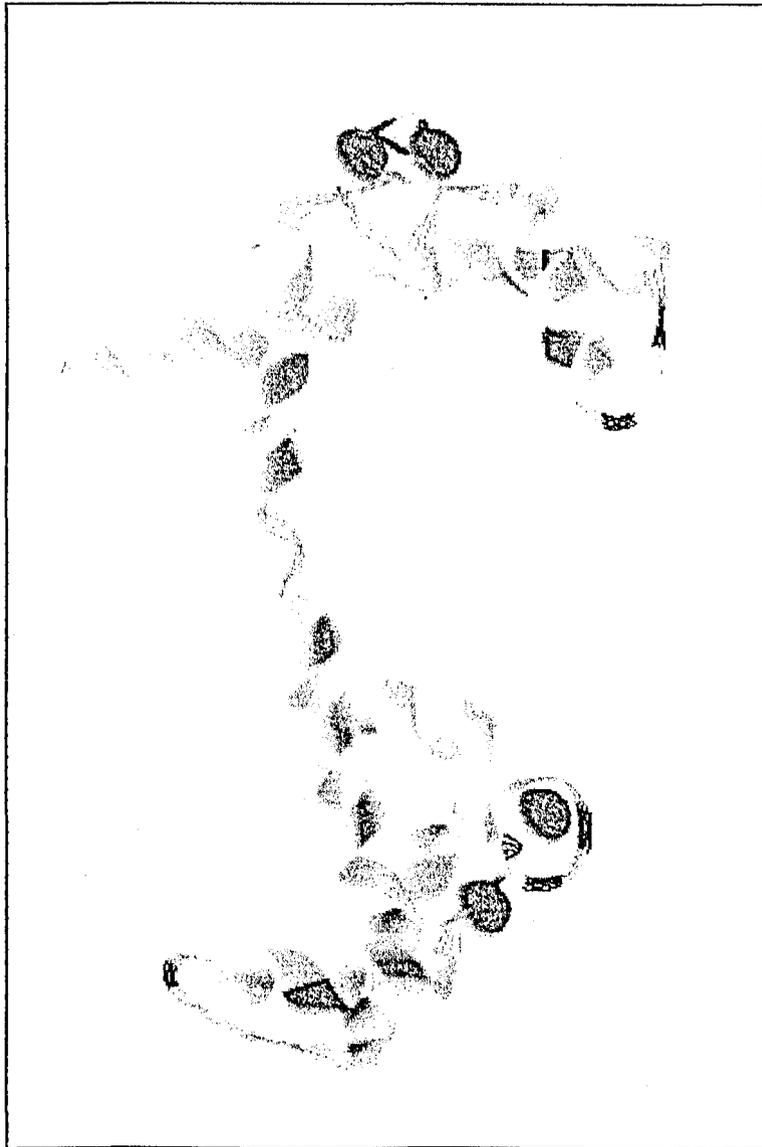
BÄHLER *et al* (1994) encontraram na myr4 dois motivos consecutivos de ligação às cadeias leves presentes no domínio regulatório. Estes dois motivos diferem em seus requerimentos de cálcio para ótima ligação da CaM. O IQ NH<sub>2</sub> terminal liga CaM na ausência de cálcio livre enquanto o motivo IQ COOH-terminal liga CaM na presença de cálcio livre.

O complexo Ca<sup>2+</sup>/CaM interage com mais de 100 diferentes alvos proteicos. Tipicamente liga-se ao segmento peptídico autoinibitório na enzima alvo ou peptídeo alvo (CELIO *et al.*, 1996). A distribuição ubíqua da CaM e o amplo espectro de funções dependentes de Ca<sup>2+</sup> que são reguladas por esta proteína representam um desafio para o entendimento das vias do controle celular e a integração dos vários eventos dependentes de cálcio (ROUFOGALIS *et al.*, 1982).

A estrutura cristalina da CaM mostra formas ligantes de Ca<sup>2+</sup> com dois domínios globulares arranjados em uma configuração “trans”, conectados por uma longa  $\alpha$ -hélice”, que ligam dois íons Ca<sup>2+</sup> cada um. Cada domínio globular consiste de dois motivos em hélice-loop-hélice (Figura 5) os quais são ligados por uma  $\beta$ -pregueada antiparalela pequena. A porção carboxiterminal liga Ca<sup>2+</sup> com alta afinidade e o aminoterminal com baixa afinidade. A ligação do primeiro íon Ca<sup>2+</sup> ao domínio globular carboxiterminal induz uma grande mudança de conformação que provoca dois sinais hidrofóbicos, uma em cada lado da molécula, disponível como alvo da interação. A ligação de Ca<sup>2+</sup> à CaM induz dramáticas mudanças conformacionais, que causam a exposição de grupamentos hidrofóbicos, disponibilizando a interação do complexo Ca<sup>2+</sup>/CaM com as proteínas alvo (JAMES *et al.*, 1995).

O conhecimento sobre as interações físicas entre Ca<sup>2+</sup>/CaM e proteína aceptora foi possível através do uso de peptídeos sintéticos correspondentes aos domínios ligantes de CaM de várias proteínas alvo relevantes fisiologicamente, enzimas ou drogas peptídicas e toxinas. Muitos destes peptídeos possuem uma sequência muito similar à da CaM. A determinação, por NMR e cristalografia de raio X da estrutura tridimensional do complexo Ca<sup>2+</sup>/CaM ligado a análogos dos peptídeos sintéticos das regiões ligantes de CaM na quinase de cadeia leve de miosina (MLCK) de músculo liso e esquelético revelaram que a porção da hélice central na estrutura não ligada e não espiralada,

capacita os dois domínios a engolfar os peptídeos alvos helicoidais. A modulação da plasticidade inerente da CaM por ligantes diferentes é o elemento chave do reconhecimento molecular dos mecanismos do sinal de transdução (MEADOR *et al.*, 1992; IKURA *et al.*, 1992; MEADOR *et al.*, 1993).



**Figura 5 - Modelo tridimensional da calmodulina (BABU, Y. S. *et al.* 1988)**

A CaM liga-se a peptídeos anfifílicos helicoidais de variáveis sequências de aminoácidos. A superfície de ligação da CaM é estericamente maleável e forças de Van der Waals provavelmente dominam as ligações com os peptídeos alvo. A investigação da seletividade quiral da CaM usando análogos sintéticos da melitina (peptídeo citotativo

do veneno de abelha - *Apis mellifera*) e da MLCK através de medidas de fluorescência e NMR mostraram que, ambos ligam avidamente a CaM e que a superfície de ligação dos peptídeos de CaM é notavelmente tolerante estericamente, o que sugere um potencial e útil enfoque para o modelo dos não-hidrolisáveis ou lentamente hidrolisáveis inibidores intracelulares de CaM (FISCHER *et al.*, 1994).

## 1.8. Antagonistas de calmodulina

A interação do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  com proteínas alvo pode ser bloqueada por antagonistas de CaM, que incluem uma variedade de pequenas moléculas com características hidrofóbicas que apresentam alta afinidade pelo complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . A aplicação destes agentes farmacológicos possibilita o controle da função celular através da seletiva modificação das funções mediadas pela CaM (ROUFOGALIS *et al.*, 1982).

A trifluorperazina (TFP) e outros derivados feniltiazínicos foram as primeiras moléculas descritas com habilidade de bloquear a interação da CaM com moléculas alvo. Outro grupo de grande diversidade estrutural inclui os relaxantes musculares de músculo liso, dentre eles, o W-7. A potencialidade destes agentes depende principalmente de sua hidrofobicidade e habilidade de acumular interfaces hidrofóbicas (ROUFOGALIS *et al.*, 1982).

A atividade de enzimas dependentes de CaM também pode ser afetada por numerosos pequenos peptídeos que são ligados à CaM de maneira dependente de cálcio. Esses peptídeos são usados como sondas para interação entre a CaM e enzimas alvo. Entre eles a melitina, que exhibe excepcionalmente alta afinidade por CaM (BABIYCHUK, SOBIESZEK, 1997).

A melitina é a menor das proteínas enzimáticas encontradas no veneno de abelha. Contém 26 aminoácidos que adotam uma forma helicoidal cilíndrica dobrada no centro. Sob certas condições a hélice forma tetrâmeros protegendo as superfícies hidrofóbicas da água; esta é a forma não lítica estocada no saco de veneno (DOTIMAS, HIDER, 1987).

A melitina interage com a CaM saturada de  $\text{Ca}^{2+}$  formando um complexo 1:1 com alta afinidade ( $K_d=3$  nM; COMTE *et al.*, 1983) e assumindo uma conformação em

$\alpha$ -hélice (SEEHOLSER *et al.*, 1986; SCALONI *et al.*, 1998). Porém, ITAKURA, IIO, (1992) através da medida da fluorescência intrínseca do triptofano e experimentos de cromatografia em gel com o sistema melitina-CaM revelaram que a melitina liga-se à CaM mesmo na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ , quando a concentração de sal é igual a zero. Isto significa que não somente ligações hidrofóbicas mas também interações eletrostáticas contribuem para a ligação da melitina à CaM.

LIU *et al.*, (1994) estudando a interação da CaM com peptídeos de melitina deletados sinteticamente verificaram a importância dos resíduos de triptofano para a ligação com a CaM.

BABIYCHUK, SOBIESZEK (1997) demonstraram que a melitina interage reversivelmente com a MLCK com afinidade comparável à CaM influenciando o estado de oligomerização desta quinase. Na presença de altas concentrações de melitina a MLCK forma oligômeros solúveis e em baixas concentrações de melitina forma oligômeros insolúveis. Estes oligômeros insolúveis apareceram pela agregação dos dímeros de MLCK, já os oligômeros solúveis são formados depois da saturação da quinase com a melitina, resultado de um enfraquecimento da interação entre os protômeros induzida pela melitina

Espectrometria de massa de proteólise limitada e experimentos de ligação cruzada sugerem que a melitina interage com a CaM adotando uma orientação invertida dentro do complexo quando comparada a outros substratos analisados até o momento. As metades N e C-terminal do peptídeo são ancoradas no domínio amino e carboxi-terminal da CaM, respectivamente (SCALONI *et al.*, 1998).

INAGAKI *et al.* (1996) observaram que na presença dos antagonistas de CaM: W-7 e TFP a extensão das ligações de cálcio à CaM aumentavam, de acordo com a dose, podendo ocorrer um aumento da sensibilidade de todos os quatro sítios ligantes de  $\text{Ca}^{2+}$  na CaM. Análises da CaM no espectro ultra-violeta revelou que a conformação do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM diferia na presença ou ausência destes antagonistas concluindo que a ligação destes na CaM aumentam as ligações dos íons cálcio.

A estrutura em solução do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM com o antagonista W-7 consiste de uma molécula de W-7 ligando cada um dos dois domínios da CaM. Em cada domínio, o anel cloronaftaleno do W-7 ligado interage com quatro metioninas do grupo metil e de outras cadeias laterais alifáticas e aromáticas no "pocket hidrofóbico", o sítio responsável pela ligação da CaM às enzimas dependentes de CaM. Esta estrutura do

complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{W-7}$  sugere a inibição pelo W-7 da mediação da CaM na ativação de proteínas alvo através do bloqueio do “pocket” hidrofóbico (OSAWA *et al.*, 1998).

OSAWA *et al.* (1999) investigaram as mudanças estruturais na ligação  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM na presença de W-7. A ligação de duas moléculas de W-7 induziu mudanças estruturais drásticas para o complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  que passou de uma estrutura alongada para uma compacta estrutura globular provavelmente pela dobra do ligante flexível. Em adição à interação direta do W-7 no “pocket” hidrofóbico do  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  deve também contribuir para a inibição da atividade, desde que as regiões que ligam a CaM às proteínas alvo estão menos acessíveis devido a conformação compacta do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (OSAWA *et al.*, 1998; OSAWA *et al.*, 1999).

Uma compactação entre os domínios do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  foram também observadas previamente para as estruturas cristalinas do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{TFP}$  (MEADOR *et al.*, 1992). No entanto, a estrutura química do W-7 difere do TFP, apesar de ambos conterem grupos aromáticos hidrofóbicos com grupos carregados positivamente via cadeias alifáticas. No complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{W-7}$  o anel naftaleno das duas moléculas do W-7 interagem intimamente com o “pocket” hidrofóbico dos dois domínios de CaM, enquanto somente o anel final da fenotiazina TFP interage no “pocket” hidrofóbico do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{TFP}$ . Este “pocket” hidrofóbico pode acomodar contatos de Van der Waals com grupos quimicamente diferentes (OSAWA *et al.*, 1999).

Diante do que foi exposto sobre o papel regulatório das cadeias leves de CaM na estrutura e função das miosinas, procuramos investigar através do uso da melitina e W-7 as funções destas cadeias leves nas propriedades bioquímicas da BM-V.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

O objetivo inicial proposto em nosso laboratório era a purificação, com alta qualidade de miosina-V de cérebros de pintainhos. Após a purificação, o perfil proteico das cadeias leves e pesadas da proteína purificada foram analisados através de SDS-PAGE e, a seguir, iniciados os experimentos bioquímicos que evidenciavam que a proteína pura tinha atividade funcional. A partir de tal evidência utilizamos drogas antagonistas de calmodulina (W-7 e melitina) na tentativa de verificar os efeitos ocasionados por estas substâncias nas características bioquímicas da BM-V.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar os aspectos bioquímicos da interação da melitina e W-7 com a BM-V e suas cadeias leves.
- Determinar o efeito da melitina na cossedimentação da BM-V com F-actina e na sua clivagem com calpaína
- Investigar a possível reversibilidade dos processo de perda de solubilidade da BM-V induzidos pelos antagonistas de CaM.
- Verificar como as cadeias leves permanecem associadas aos fragmentos de BM-V obtidos pela clivagem com calpaína

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Purificação de BM-V

A BM-V foi purificada a partir de cérebros de pintainhos fornecidos pela Granja Planalto S/A. O método de purificação foi o mesmo descrito por CHENEY *et al.* (1993), com algumas modificações. Em cada preparação foram utilizados, em média, 120 cérebros de pintainhos de 1 dia de idade. Os animais foram sacrificados por decapitação e seus cérebros foram rapidamente removidos e congelados em nitrogênio líquido à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Todos os passos subsequentes foram realizados à  $4^{\circ}\text{C}$  ou em gelo, a não ser quando especificados de outra maneira. Todos os tampões utilizados durante a preparação continham os seguintes inibidores de proteases: PMSF 0,3 mM, Aprotinina 2,0  $\mu\text{g/ml}$  e Benzamidina 1 mM.

Os 120 cérebros foram homogeneizados em tampão de extração (Hepes 40 mM pH 7,7, EDTA-Na 10 mM, ATP 5 mM, DTT 2 mM) com um homogeneizador Ommnimacro. O homogeneizado total foi centrifugado à 40.000g por 40 minutos e o precipitado descartado. Após a adição de NaCl ao sobrenadante (S1) para a obtenção de uma concentração final de 600 mM a fração foi deixada em repouso por uma hora e seguida de centrifugação a 40.000g por 40 minutos. O precipitado (P2) obtido foi ressuspensão em 30 ml de tampão Hepes 25 mM pH 7,2, EDTA-Na 2 mM, EGTA-Na 2 mM e DTT 2 mM, utilizando-se um homogeneizador do tipo *potter* (teflon-vidro). Foi adicionada à amostra Triton X-100 para uma concentração final de 1%, seguido de aquecimento em banho-maria à  $37^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos e nova homogeneização. A fração acrescida do Triton X-100 foi centrifugada a 40.000g por 30 minutos e o precipitado (P3) foi ressuspensão em 10 ml do tampão Hepes 25 mM pH 7,2, EDTA-Na 2 mM, EGTA-Na 2 mM e DTT 2 mM, homogeneizada e centrifugada a 40.000g por 30 minutos para remover o excesso do Triton X-100. O precipitado obtido (P4) foi ressuspensão em 8 ml tampão de solubilização (Hepes 25 mM pH 8,0, NaCl 600 mM, EGTA 2mM, ATP 10mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM e DTT 2 mM) e centrifugado a 60.000g por 60 minutos. O sobrenadante (S5) foi cromatografado durante a noite em uma coluna de Sephacryl S-500 (1,5 x 100 cm) previamente equilibrada no tampão especificado acima,

a um fluxo de 0,25 ml/min. As frações coletadas (3 ml cada) foram analisadas por SDS-PAGE e aquelas contendo BM-V foram reunidas, o volume total foi diluído com 2 volumes de tampão Trietanolamina 20 mM pH 7,4 e EGTA 1 mM sendo a seguir adicionado DTT e ATP para a concentração final de 1 mM. O pH foi ajustado para 7,55 com uma solução de trietanolamina 10% pH 6,8 e a amostra foi então aplicada em uma coluna (1,0 x 3 cm) de TMA-E (Merck) previamente equilibrada com tampão Trietanolamina 20 mM pH 7,4, NaCl 250 mM, EGTA 1mM e DTT 2mM a um fluxo de 1 ml/min. Após a aplicação da amostra a coluna foi lavada com 30 ml do tampão descrito acima e as proteínas retidas foram eluídas com um gradiente contínuo de NaCl 250 a 750 mM em 50 ml do tampão descrito acima, a um fluxo de 2 ml/min, sendo coletadas frações de 1 ml. Estas foram analisadas em SDS-PAGE e aquelas contendo o complexo BMV-cadeias leves foram reunidas e dialisadas em tampão Imidazol 10 mM pH 7,2, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, EGTA 0,1 mM e DTT 2 mM. Após quantificação proteica por absorvância à 280 nm(coeficiente de extinção molar=1,04) a amostra foi utilizada em ensaios de atividade ATPásica, cossedimentação, sedimentação e clivagem por calpaína.

Os passos da purificação da BM-V podem ser observados na representação esquemática da Figura 6.

### **3.2. Purificação de actina de músculo esquelético de galinha preparação do pó cetônico**

A actina foi purificada à partir de músculo peitoral de galinha pelo método descrito por SPUDICH, WATT (1971). Para cada preparação partiu-se de 500 g de músculo peitoral de galinha. Os procedimentos foram realizados à 4 °C a não ser quando especificado de outra maneira. Aos tampões utilizados foram adicionados Benzamidina 1 mM e Aprotinina 2 µg/ml. Após sacrifício por decapitação, retirou-se rapidamente o músculo peitoral, que após ser envolvido em plástico PVC foi colocado no gelo e deixado em repouso por 20 minutos.

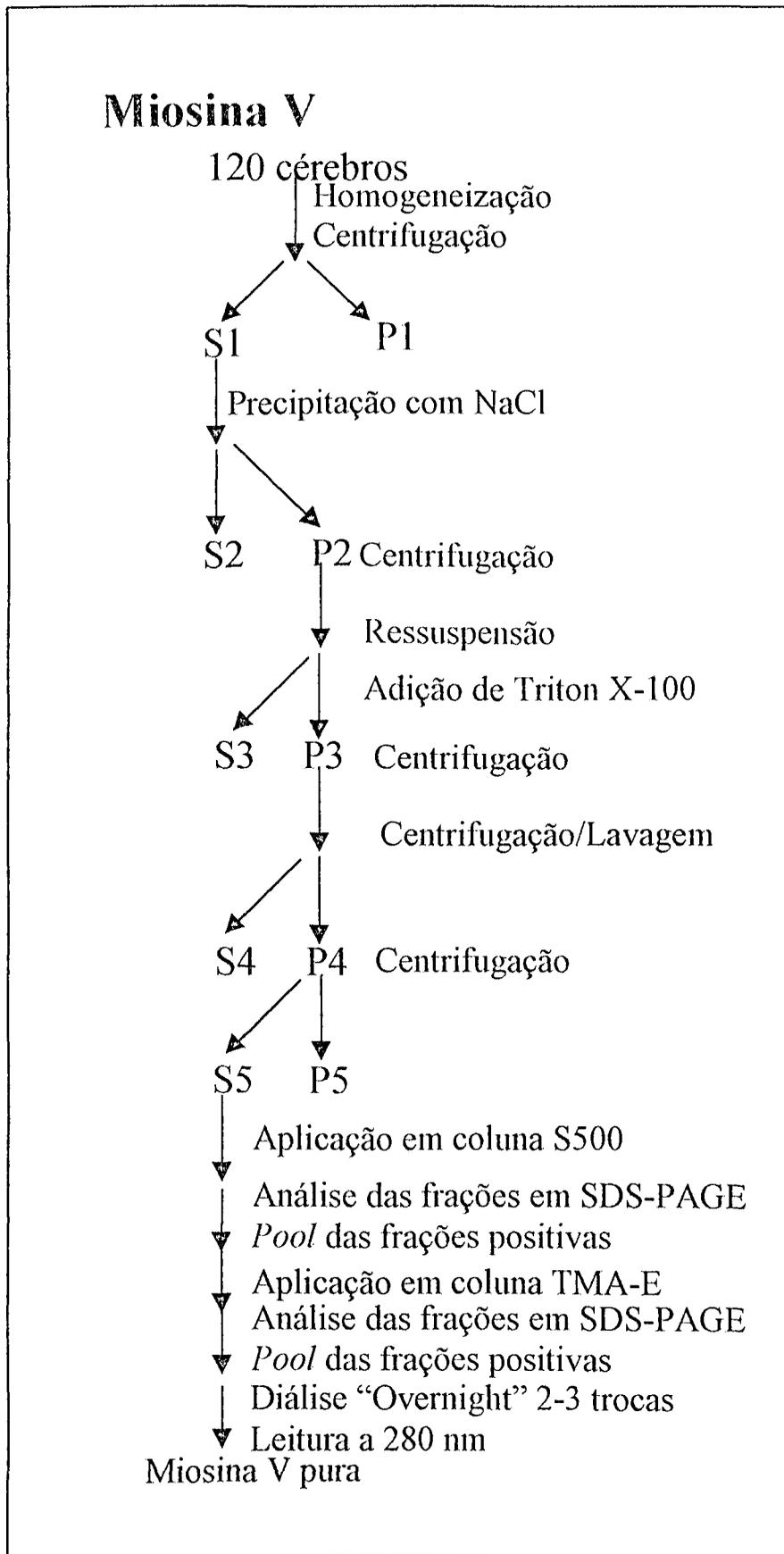


Figura 6 – Esquema da purificação da BM-V

Ao músculo moído foi adicionado 3 volumes de tampão de extração (Imidazol 20 mM, KCl 600 mM e DTT 0,5 mM) e a mistura foi então agitada vigorosamente por 10 minutos. O extraído foi centrifugado à 13.000 g por 15 minutos. O sobrenadante contendo miosina foi descartado e o precipitado extraído por mais duas vezes com o mesmo volume do tampão descrito acima, por mais 10 minutos sob agitação vigorosa, para dissociação da miosina restante. O precipitado obtido foi ressuspensão em 1,5 litros de água deionizada gelada e o pH reajustado para 8,2 a 8,5 usando 1 M de carbonato de sódio. Centrifugou-se a 13.000 g por 10 minutos e o precipitado foi ressuspensão novamente em água deionizada gelada, este procedimento foi repetido por mais 4 vezes, até que o precipitado se espalhasse no tubo da centrífuga. O precipitado foi então extraído duas vezes com acetona gelada por 10 minutos, sendo o solvente removido por filtração em gaze. O precipitado foi, então, removido da gaze, espalhado em papel de filtro e a seguir cortado em pedaços pequenos e secado à temperatura ambiente por 12 horas.

### **3.2.2. Preparação de G-Actina a partir do pó cetônico**

O pó cetônico foi agitado por 2 horas com tampão Tris-HCl 2 mM pH 8,0, ATP 0,2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,2 mM e DTT 0,5 mM (20 ml de tampão por grama de pó cetônico) contendo os seguintes inibidores de proteases: PMSF 0,3 mM, Aprotinina 2,0 µg/ml e Benzamidina 1 mM.

Após centrifugação a 70.000g por 30 minutos, adicionou-se ao sobrenadante KCl e MgCl<sub>2</sub> para concentrações finais de 50 e 2 mM, respectivamente. A seguir o sobrenadante foi deixado em repouso por 30 minutos à 37 °C e por 1 hora a 4 °C, para permitir a polimerização da actina. Visando a remoção de tropomiosina, foi adicionado à amostra KCl para uma concentração final de 0,8 M e procedeu-se a agitação por 1 hora em gelo. A F-actina foi sedimentada por centrifugação a 100.000g por 2 horas e o precipitado foi lavado com tampão de extração e, a seguir, ressuspensão no mesmo tampão utilizando-se um homogeneizador do tipo "Dounce". A amostra foi dialisada por 72 horas, com duas trocas diárias, em tampão de extração para permitir despolimerização da F-actina, sendo então clarificada por centrifugação a 100.000g por

15 minutos. Após dosagem da quantificação proteica por absorvância 280 nm, considerando o coeficiente de extinção molar de 1,09, a G-actina foi dividida em alíquotas, congelada diretamente em nitrogênio líquido e estocada à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.3. Preparação de F-actina e sua estabilização com faloidina**

Para obtenção de actina polimerizada (F-actina) diluiu-se o volume da alíquota de G-actina com o mesmo volume de tampão Imidazol-HCl 20 mM, pH 7,2, KCl 150 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, acrescentando-se DTT 2 mM. A incubação foi feita em 30 minutos à temperatura ambiente. A F-actina foi estabilizada com faloidina adicionando-se a mesma quantidade (mol/mol) de faloidina à partir de um estoque de 2 mg/ml em tampão Imidazol 10 mM pH 7,0.

### **3.3. Purificação de calmodulina de cérebro bovino**

Calmodulina foi purificada de cérebro bovino segundo o protocolo descrito por GOPALAKRISHNA, ANDERSON (1982). Para cada preparação, 300g de cérebro bovino fresco ou congelado foram homogeneizados com 2 volumes de tampão de extração (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM,  $\beta$ - mercaptoetanol 1 mM e PMSF 0,3 mM). Após centrifugação à 15.000g por 30 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$ , o precipitado foi novamente extraído com 1 volume de tampão de extração e centrifugado. Os sobrenadantes de ambas as extrações foram reunidos, filtrados em gaze e, a seguir, procedeu-se a precipitação isoelétrica adicionando-se ácido acético 6 N até atingir-se pH 4,3. A amostra foi agitada lentamente no gelo por uma hora e então centrifugada a 15.000g por 30 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$ . O precipitado foi ressuspense em tampão de extração (150 ml/300g de cérebro) e o pH ajustado para 7,5 com Tris 1 M. A amostra foi aquecida rapidamente até  $90^{\circ}\text{C}$  e deixada a esta temperatura por 5 minutos sendo, então, resfriada em gelo. Após centrifugação a 15.000g por 30 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$ , adicionou-se ao sobrenadante  $\text{CaCl}_2$  1 M para concentração final igual a 5 mM. A

amostra foi aplicada na coluna de Fenil-Sepharose CL-4B previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, β- mercaptoetanol 1mM e PMSF 0,3 mM. Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 10 volumes do mesmo tampão contendo 0,5 M de NaCl. A eluição foi feita com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EGTA 1 mM, β- mercaptoetanol 1 mM e PMSF 0,3 mM. As frações eluídas foram analisadas em SDS-PAGE e aquelas contendo calmodulina foram reunidas, dialisadas contra água deionizada e liofilizadas em alíquotas de 500 µg após dosagem de proteína.

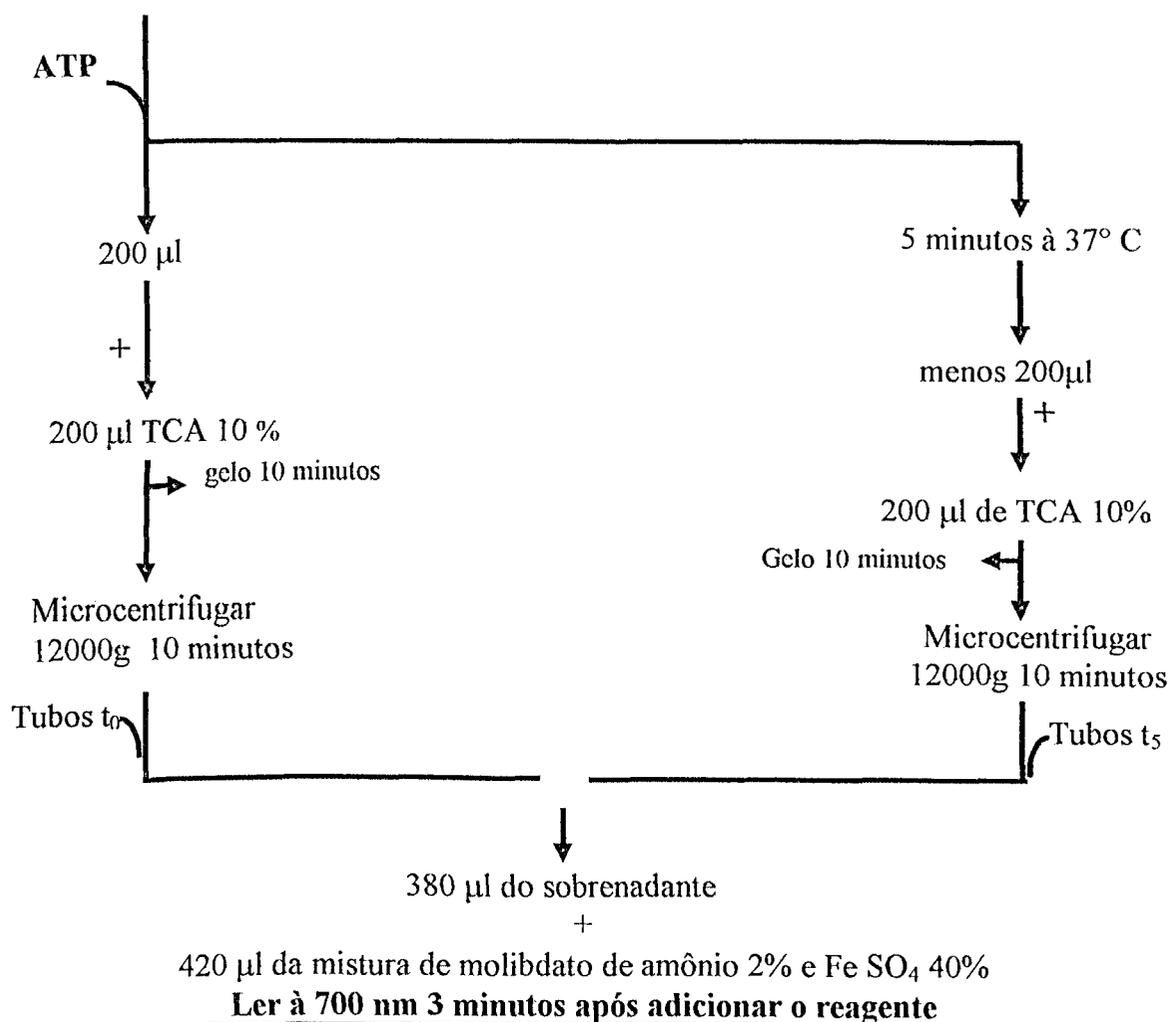
### **3.4. Ensaio de ATPase**

A atividade ATPásica foi ensaiada usando método colorimétrico de TAUSSKY, SHORR (1953). As reações foram realizadas no volume final de 430µl, por reação, e iniciadas pela adição de ATP 2 mM. Imediatamente após a adição de ATP, 200 µl foram retirados e adicionados imediatamente a um tubo contendo 200µl de ácido tricloroacético (TCA) 10% resfriado em gelo. O volume restante foi imediatamente incubado no tempo especificado da reação à temperatura de 37° C e a reação terminada pela remoção de 200 µl para outro tubo contendo 200µl de TCA 10% resfriado em gelo. A atividade Mg-ATPase de 10 nM de BM-V foi determinada após 5 minutos de incubação. A hidrólise de ATP foi expressa como ATP/s/ cabeça de miosina e calculada considerando a massa molecular relativa de dímero de BM-V nativo de 640 kDa (CHENEY *et al.*, 1993). Na Figura 7 encontra-se representado o esquema do ensaio de ATPase.

### **3.5. Ensaio de cossedimentação da BM-V com melitina**

Os ensaios de cossedimentação foram realizados em tampão Imidazol 10 mM pH 7,2, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, DTT 2 mM. Foram utilizados 100 nM de BM-V e 1 µM F-actina estabilizada com faloidina, na presença de melitina 2 µM e 0,5 µM, em um volume final de 200 µl.

**Volume 430  $\mu\text{l}$  (mistura de reação e BM-V)**



**Figura 7 – Representação esquemática do ensaio de ATPase**

As amostras foram previamente incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos, sendo posteriormente centrifugadas à 20.000 rpm por 1 hora a 4 °C. Os precipitados foram preparados para SDS-PAGE e aos sobrenadantes foram adicionados 0,10 volumes de deoxicolato de sódio (0,15% p/v) e 0,15 volumes TCA 50%, incubados 15 minutos à 4°C e a seguir centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, sendo os precipitados preparados para SDS-PAGE.

Os ensaios foram realizados na presença ou ausência de ATP 2,0 mM e Ca:EGTA 2,1 mM. Na presença de ATP foi fornecido 13  $\mu$ M de cálcio livre e na ausência 19  $\mu$ M de cálcio livre.

### **3.6. Ensaio de sedimentação da BM-V com melitina e W-7**

Os ensaios de sedimentação foram realizados em tampão Imidazol 10 mM pH 7,2, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM e DTT 2 mM. Foram utilizados 100 nM de BM-V, com concentrações crescentes de melitina ou de W-7 em um volume final de 200  $\mu$ l. As amostras foram previamente incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos, sendo posteriormente centrifugadas a 20.000 rpm por 1 hora a 4 °C. Os precipitados foram preparados para SDS-PAGE e aos sobrenadantes foram adicionados 0,10 volumes de deoxicolato de sódio (0,15% p/v) e 0,15 volumes TCA 50%, incubados 15 minutos à 4°C e a seguir centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, sendo os precipitados preparados para SDS-PAGE.

Os ensaios foram realizados na presença ou ausência de ATP 2,0 mM e Ca:EGTA 2,1 mM. Na presença de ATP foi fornecido 13  $\mu$ M de cálcio livre e na ausência 19  $\mu$ M de cálcio livre.

### **3.7. Proteólise por calpaína**

A proteólise da BM-V por calpaína foi realizada por 3 horas a 25° C usando-se uma proporção em massa de 1:30 de BM-V/calpaína, na presença de CaCl<sub>2</sub> 2 mM e DTT 2 mM e interrompida pela adição de tampão da amostra “TA 10 X”( item 3.10) ou EGTA 5 mM. As amostras resultantes do ensaio foram analisadas em SDS-PAGE 5 a 22%.

### 3.8. Proteólise por calpaína e ensaio com Q-Sepharose

A amostra de BM-V digerida com calpaína foi aplicada em uma coluna de cromatografia de troca aniônica Q-Sepharose e eluída com tampão Imidazol 10 mM, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, DTT 2 mM e EGTA 1mM com concentrações de NaCl de 0,15, 0,3 e 0,75 M.

### 3.9. Dosagem de Proteínas

A concentração de proteínas nas frações foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) tendo como padrão a soro albumina bovina (BSA). As determinações foram feitas em duplicatas e a absorbância foi medida a 595 nm.

Paralelamente à dosagem de proteína das frações foi feita a curva padrão de BSA em concentrações crescentes variando de 5 a 30 µg. A concentração de proteína em mg/ml foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos a partir da curva-padrão.

### 3.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

A análise eletroforética foi realizada utilizando-se o sistema de tampão descontínuo descrito por LAEMMLI, FAVRE (1973) e o sistema de placas de vidro descrito por STUDIER (1973).

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi feita em placas de vidro de dimensões 7,1 x 10 x 0,075 cm apresentando um empilhamento de 3 % e um gel de separação com gradiente de 5 a 22%. As amostras para SDS-PAGE foram preparadas na proporção de 10:1, em volume de fração e tampão "TA 10 X" (Tris- HCl 31,2 mM, SDS 8,75%, sacarose 20%, β-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,25%, EGTA

11 mM), respectivamente. Utilizou-se como tampão do eletrodo Tris 25mM, EDTA 1,95 mM, Glicina 192,5 mM, SDS 0,75%.

As separações eletroforéticas foram conduzidas com amperagem constante de 30 mA, por um tempo médio de 60 minutos. Após a corrida, os géis foram corados pelo método descrito por WEBER, OSBOURN (1969) - Coomassie brilliant blue R-0,25% dissolvido em solução de metanol 50% e ácido acético 10% por 30 minutos. Os géis foram descorados em solução de metanol a 30% e ácido acético a 10%, e armazenados em solução de ácido acético a 7%.

Os padrões de massa molecular adquiridos da Sigma foram SDS-6H - cadeia pesada da miosina II de músculo de coelho (205 kDa),  $\beta$ -galactosidase de *E. coli* (116 kDa), fosforilase b de músculo de coelho (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica de eritrócito bovino (29 kDa) e SDS 7B -  $\alpha$ 2 macroglobulina (180 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), frutose 6 fosfato (84 kDa), piruvato quinase (58 kDa), fumarase (48,5 kDa), lactato desidrogenase (36,5 kDa) e triosifosfato isomerase (26,6 kDa). No caso do padrão 6H, além dos polipeptídeos presentes por frasco do produto, foi adicionado calmodulina purificada.

### 3.11. Western Blot

As proteínas separadas eletroforéticamente conforme descrito no item 3.10 foram eletrotransferidas em corrente constante de 200 mA por 12 horas para membrana de nitrocelulose utilizando como tampão de transferência Tris-HCl 25mM, Glicina 190 mM, Metanol 20% (TOWBIN *et al.*, 1979). Após a transferência a membrana de nitrocelulose foi corada com solução de Ponceau 5% em ácido tricloroacético 0,3% por 5 minutos e, a seguir, lavada com água deionizada. Para bloqueio dos sítios inespecíficos a membrana foi incubada em leite desnatado (Molico-Nestlé) 5% preparado em TBS-T (Tri-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, TWEEN-20 0,05%) por um período mínimo de 1 hora. A seguir, as membranas foram lavadas (3 x 5 minutos cada) em tampão TBS-T para remoção da solução anterior. A seguir procedeu-se da seguinte forma:

1 - Incubação com anticorpo primário por 12 horas; 2 - lavagem com TBS-T durante 15 minutos por 3 vezes; 3 - incubação com o anticorpo secundário conjugado à

peroxidase por 1 hora; 4 – lavagem com TBS-T durante 10 minutos por 3 vezes. A revelação foi feita por quimioluminescência usando Kit ECL e o protocolo do fabricante (Amersham-Pharmacia-Biotech).

Anticorpos primários utilizados: Anti-cabeça e anti-cauda de miosina-V foram obtidos utilizando-se soro de animais imunizados contra proteínas de fusão desses domínios expressos em bactérias, de acordo com SUTER *et al.* (2000), anti-calmodulina – monoclonal (Boehringer Mannheim); anti-DLC8 - policlonal-coelho (Gentilmente cedido pelo Dr. Steven M. King – University of Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut).

Anticorpos Secundários utilizados: Anti-IgG coelho-POD e anti- IgG camundongo POD (Boehringer Mannheim; Amersham-Pharmacia-Biotech).

A retenção das cadeias leves de 10 kDa foram maximizadas pela incubação das membranas PVDF (0,2  $\mu$ M) com 0,2% de glutaraldeído em TBS-T por 40 minutos, seguido por duas lavagens com TBS antes do bloqueio dos sítios inespecíficos.

### 3.12. Aquisição e análise de imagens

Os géis úmidos foram acondicionados em películas de transparências (3 mm) e as imagens digitalizadas foram adquiridas por equipamento Micron *scannermaker* controlado por computador Micron 300 MHz e processadas em formato “TIF” (Tagged Image Format). As imagens (géis ou blots) foram quantificadas utilizando estação Video Document System (VDS) Pharmacia com software apropriado (“Image Master”). Para a construção dos gráficos, o valor relativo da BM-V nos precipitados (%) e sobrenadantes (%) foram calculados de acordo com a quantidade total de proteína (soma da BM-V presente nas frações sobrenadantes e precipitados).

### 3.13. Cálculo da concentração de cálcio livre

O cálculo da concentração de cálcio livre nas reações foi feito utilizando-se o programa Mcalc (FABIATO, 1988). Nos experimentos foi utilizado um tampão Cálcio/EGTA 50 mM preparado a partir de uma solução de  $\text{CaCl}_2$   $0,1 \pm 0,0005\text{M}$  (Orion).

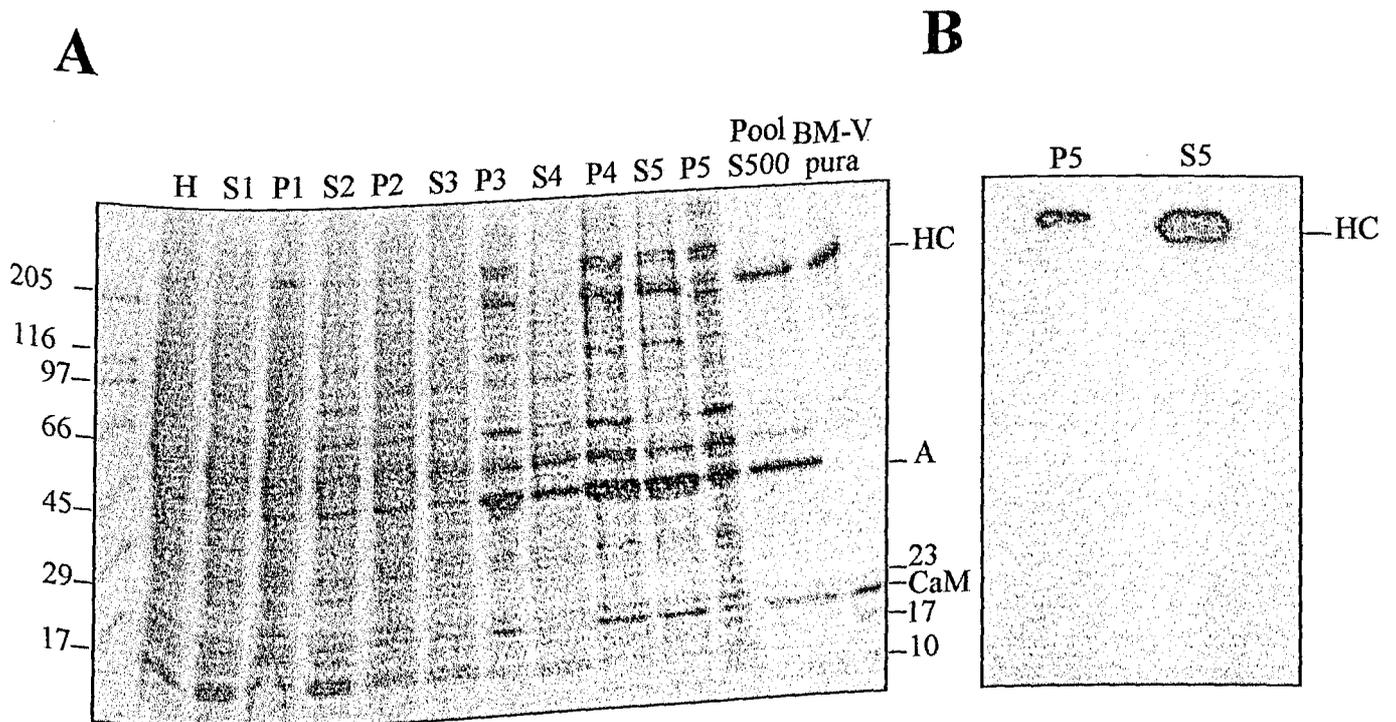
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo a BM-V foi purificada a partir de cérebros de pintainhos de 1 dia de idade e de nove dias de idade. As Figuras 7 e Figura 8 mostram o perfil eletroforético das amostras obtidas durante as etapas de purificação da BM-V. No painel B da Figura 7 observamos o *immunoblot* das frações P5 e S5.

Apesar de bem visível no gel, corado com *coomassie*, que grande parte da fração S5 da BM-V foi solubilizada à partir da fração P4 nas condições usadas no tampão da S-500, o resultado obtido no *immunoblot* ainda sugere que uma pequena parte da BM-V permanece insolúvel nestas mesmas condições (a intensidade da banda em P5 se deve em muito à sensibilidade do método de quimioluminescência). Isto também ocorreu em maior grau na solubilização da BM-V durante a homogeneização dos cérebros. Acredita-se que cerca de 40% da BM-V total do cérebro (CHENEY, 1998) permanece associada a fração particulada de membrana (P1) que não é solubilizada pelas condições de extração.

É importante ressaltar que nossa experiência com 36 preparações de BM-V, ao longo destes dois últimos anos, apontou que os pontos críticos para se obter uma preparação com sucesso foram:

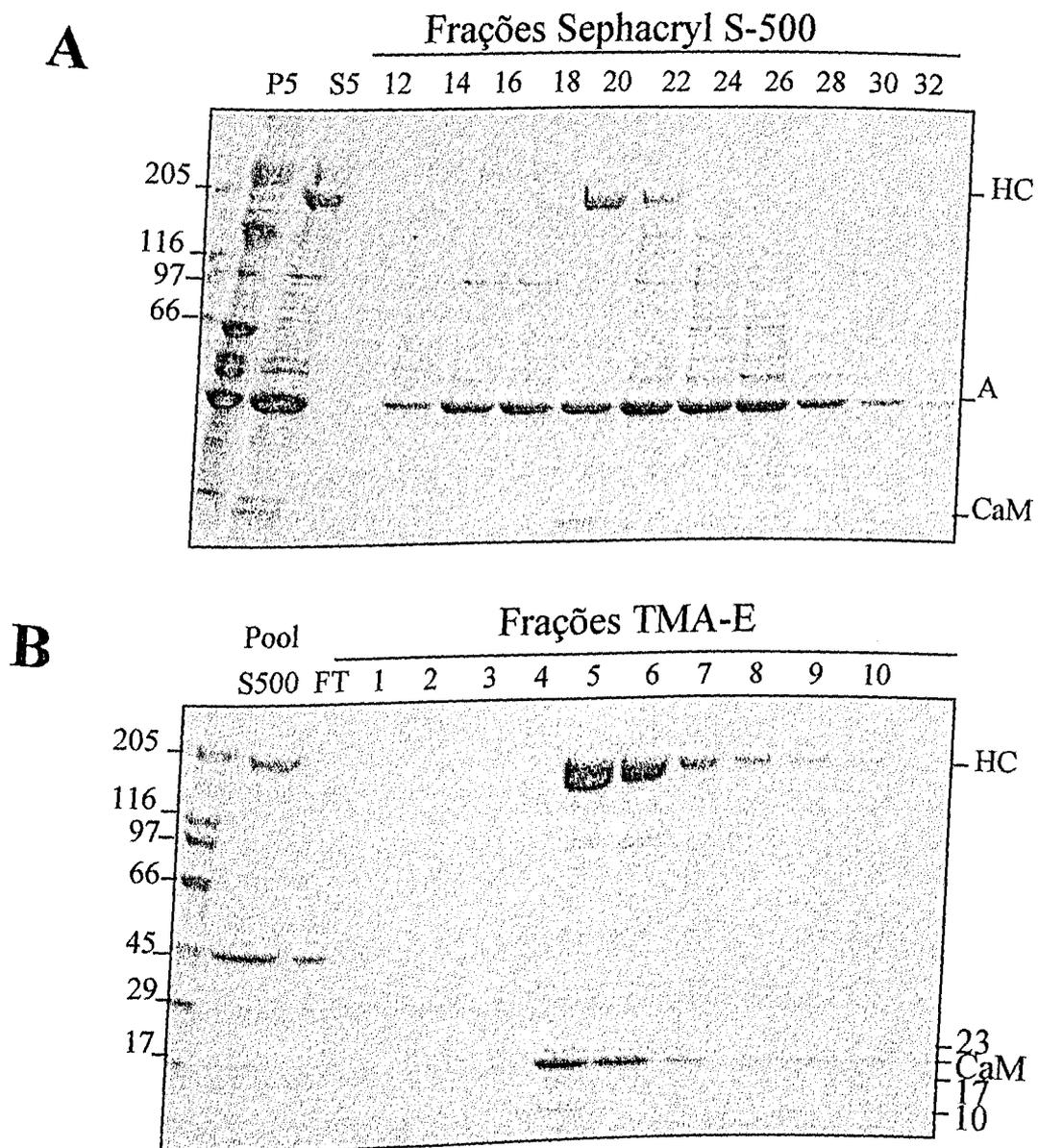
- O número de vezes em que se processa a homogeneização, para isto padronizamos em 4 vezes de 60 segundos cada, mantendo sempre o volume do copo de homogeneização completo.
- A potência do homogeneizador também afeta a composição final da fração purificada. Uma homogeneização mais intensa aumenta a composição de proteínas que acompanham a fração purificada. Padronizamos nossa homogeneização para o *Omnimacro Homogeneizer - OMNI*.
- Uso de tecido fresco *versus* tecido congelado em nitrogênio líquido e conservado à -70°C. Observou-se que a preparação do tecido congelado sempre está sujeita ao aparecimento no SDS-PAGE de bandas adicionais, principalmente a uma dupla banda que migra em ~50 kDa.



**Figura 7 - Preparação de BM-V à partir de cérebros de pintainhos**

A) SDS PAGE mostrando as etapas da purificação. H - Homogeneizado, S - sobrenadante, P- precipitado. À direita estão indicados HC - cadeia pesada da M5 (heavy chain), A - actina, CaM - calmodulina e cadeias leves de 23, 17 e 10 kDa. Os padrões de massa molecular relativa ( $Mr \times 10^3$ ) encontram-se indicados à esquerda.

B) *Imunoblot* das amostras de precipitado (P5) e sobrenadante (S5) de uma preparação de BM-V marcado com anti-cabeça de M5.



**Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações eluídas da coluna de Sephacryl 500 (S500) e TMA-E durante a purificação de BM-V de cérebros de pintainhos**

A) Frações eluídas da coluna de filtração em gel S-500.

B) Frações eluídas da coluna de troca iônica TMA-E.

À direita estão indicados HC - cadeia pesada (heavy chain), A -actina, CaM - calmodulina e cadeias leves de 23, 17 e 10 kDa. Os padrões de massa molecular relativa ( $M_r \times 10^3$ ) encontram-se indicados à esquerda.

Entre as diversas preparações que foram realizadas, o processo foi otimizado de acordo com sugestões de outros trabalhos (TAUHATA, 1999). Nessas preparações notamos que diminuindo o volume dos tampões utilizados ao longo dos passos da purificação o protocolo ficou otimizado em relação ao tempo de execução, economia de reagentes, e quantidade de proteína purificada.

- A qualidade dos reagentes também afetou a qualidade da miosina-V purificada. Isto aconteceu quando se substituiu o NaCl originalmente usado (SIGMA-S7653) por um NaCl adquirido da REAGEN Química. Neste caso a BM-V purificada quando submetida a ensaio de sedimentação, mesmo a 15.000 g já sedimentava-se na condição controle, indicando desnaturação da proteína causada por algum contaminante presente neste NaCl. Este problema desapareceu quando voltamos a utilizar um NaCl (SIGMA-S7653), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luís Cláudio Cameron da UNIRIO.

- A resina de troca iônica "TMAE", na presença de NaCl, liberou a BM-V mais facilmente que a resina de troca iônica "Q-Sepharose" e foi mais eficaz na eliminação de contaminantes indesejáveis como actina, tubulina, espectrina e debrina. A média das concentrações proteicas obtidas nas preparações foi de 250 µg/ml e as variações observadas foram decorrentes de vários fatores descritos a seguir:

- Com relação a integridade da BM-V aqui purificada podemos observar que ao longo dessas preparações as amostras de BM-V foram utilizadas em vários ensaios de *immunoblot* como controle de diversos experimentos do laboratório para identificação da BM-V em outros tecidos e organismos. Em adição, não observamos fragmentos de degradação da BM-V mesmo quando ocorreu o armazenamento em geladeira, sob condição do tampão de diálise por mais de duas semanas, tendo sempre o cuidado de adicionar 2 mM DTT a cada semana.

A purificação da miosina-V de cérebro de vertebrado tem possibilitado sua caracterização bioquímica. Em nosso laboratório foram utilizadas preparações de BM-V para controle experimental de estudos sobre a identificação de BM-V em glândulas endócrinas e outros tecidos de rato (ESPINDOLA *et al.* 2000b) e *Calomys calossus* (BARCELOS, 1999; BARCELOS *et al.*, 2000), em sistema nervoso de *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* (MENDES *et al.*, 2000, BARCELOS, 1999) e em experimentos com macrofagos de murinos J774 (REIS *et al.*, 2000).

A BM-V purificada em nosso laboratório apresenta um perfil de proteína em eletroforese de gel de poliacrilamida que indica a copurificação das cadeias leves de

CaM, cadeias leves do tipo essencial LC23 e LC17 e a cadeia leve homóloga a cadeia leve de dineína e a PIN. Preparações de BM-V em cérebro de pintainhos de um ou nove dias apresentaram o mesmo perfil de cadeias leves. As propriedades da BM-V avaliadas neste estudo sugerem que a proteína preserva suas condições nativas e é propícia aos experimentos aqui realizados. Neste caso, testamos os efeitos de antagonistas de CaM como W7 e melitina sobre algumas das propriedades nativas da BM-V. As implicações dos resultados encontrados para o conhecimento bioquímico, estrutural e funcional desta miosina serão aqui discutidos.

A *cabeça trabalhadora* de uma miosina inclui um domínio pescoço com funções de regulação e alavanca na transdução mecanoquímica do processo de motilidade (RAYMENT *et al.*, 1993a; XIE *et al.*, 1994). A BM-V está entre as miosinas conhecidas que possui o domínio pescoço mais longo, com seis motivos IQ. Esta é uma das razões em se caracterizar as propriedades estruturais e funcionais do domínio pescoço e as possíveis interações com outros domínios desta miosina.

As atividades enzimáticas e mecânicas da BM-V são parcialmente reguladas pela interação do  $\text{Ca}^{2+}$  com as cadeias leves de CaM. Esta interação provoca dramáticas mudanças estruturais na molécula da BM-V, com efeitos que variam desde a estimulação da atividade Mg-ATPásica até a diminuição da velocidade de translocação dos filamentos de actina em ensaios de motilidade "in vitro" (CHENEY *et al.*, 1993).

Segundo a revisão de RECK-PETERSON *et al.* (2000) a purificação de miosina Va resulta na purificação também de cadeias leves de CaM e cadeias leves de 23, 17 e 10 kDa. As cadeias leves de 17 e 23 kDa são as cadeias leves essenciais (ELC) codificadas pelos genes de *Gallus gallus* LC17 e 23, sendo estes também componentes da miosina II não muscular de cérebro (ESPINDOLA *et al.*, 1996, NABESHIMA *et al.*, 1987, KAWASHIMA *et al.*, 1987). Se consideramos que a ELC ocupa na BM-V a mesma posição que ocupa na miosina-II podemos supor que a ELC estaria ligada ao primeiro motivo IQ (RAYMENT *et al.*, 1993a). Em apoio a idéia de que IQ1 tem uma função específica de ligação à cadeia leve essencial, observa-se que IQ1 tem a seqüência mais conservada entre todas as miosinas da classe V (com exceção da miosina-V de *Drosophila*) do que os outros motivos IQ dentro de um mesmo tipo de miosina-V. Além do mais Myo2p de levedura liga-se à CaM e a Mlc1p, um membro da superfamília calmodulina das EF-hand e que provavelmente

funciona como uma cadeia leve essencial em levedura (BROCKERHOFF *et al.*, 1994, STEVENS, DAVIS, 1998).

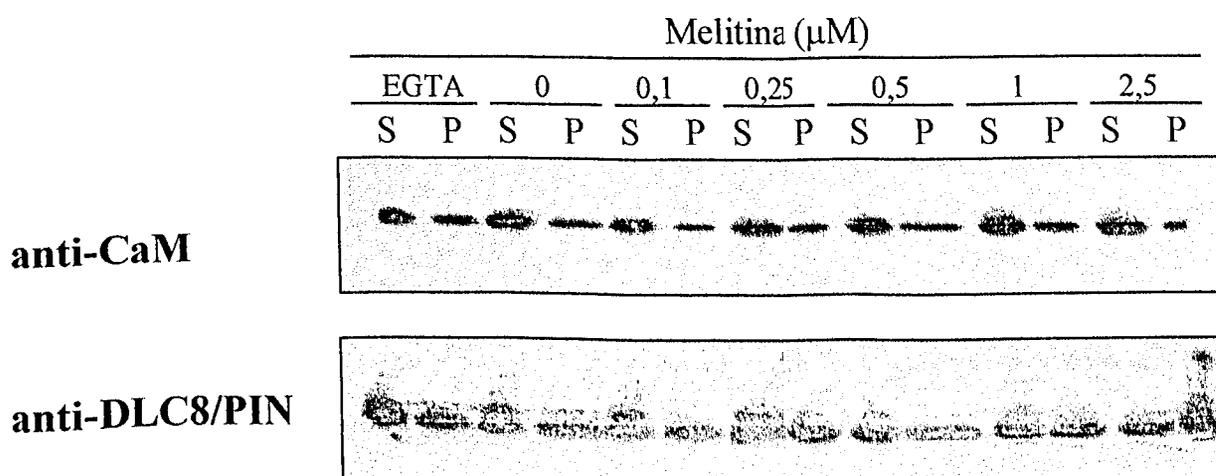
Observamos em nossos estudo que podem ocorrer alterações na estrutura da molécula de BM-V na presença de antagonistas de CaM (melitina e W-7). A BM-V e as cadeias leves de 17, 23 e 10 kDa perdem a solubilidade enquanto as cadeias leves de CaM permanecem solúveis. Utilizamos um peptídeo citoativo do veneno de abelha (*Apis mellifera*), que exhibe excepcionalmente alta afinidade por CaM, para investigar o nível destas alterações.

Os ensaios de solubilidade foram realizados com 100 nM de BM-V e concentrações crescentes de melitina. Os ensaios na presença de ATP foram realizados com 13  $\mu$ M de cálcio livre e na ausência de ATP com 19  $\mu$ M de cálcio livre.

Nestes ensaios, na presença e ausência de ATP e com concentrações crescentes de melitina, a BM-V sedimentou-se juntamente com a cadeia leve de 10 kDa, enquanto as cadeias leves de CaM e melitina permaneceram nos sobrenadantes (Figura 9). Estes resultados foram confirmados através de *immunoblot* (Figura 10). Assim, evidenciamos que possivelmente as interações de alta afinidade estabelecidas entre as CaM da BM-V e melitina induziram uma mudança de conformação que levou a uma liberação da CaM do domínio pescoço da BM-V com conseqüente alteração da estrutura e agregação observada nesta miosina.

Nas análises densitométricas, observamos que, na presença de ATP, em concentrações de melitina de 0,25 a 1  $\mu$ M ocorrem modificações na sedimentação da BM-V. Na concentração de 1  $\mu$ M de melitina, na ausência de ATP, foram observados 59% das amostras no precipitado (Figura 11B) contra 15% observados nos ensaios na presença deste nucleotídeo (Figura 11A). Na concentração de 2,5  $\mu$ M de melitina evidenciamos a perda mais acentuada da solubilidade da BM-V (92%), na ausência ou presença de ATP (Figura 11). As cadeias leves essenciais de 17 e 23 kDa e a cadeia leve de 10 kDa (LC8/PIN) tiveram sua solubilidade parcialmente alterada ficando, em média, 65% da LC8/PIN, ligada a BM-V (Figura 13), enquanto 90% das cadeias leves de CaM continuaram solúveis (Figura 12).

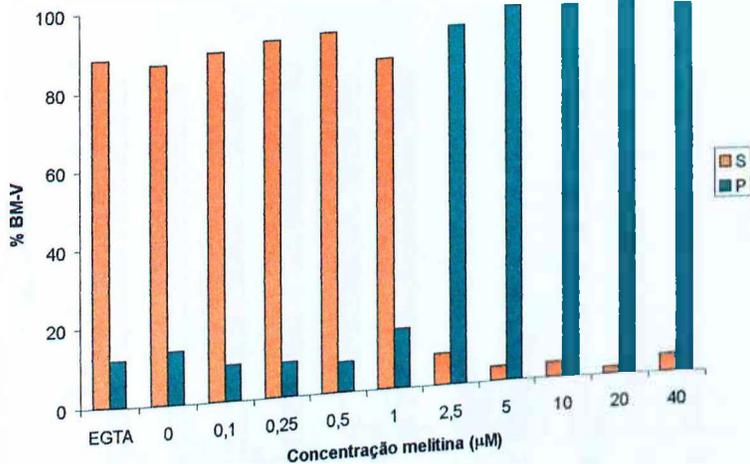




**Figura 10 - *Imunoblot* do ensaio de sedimentação da BM-V com melitina na ausência de ATP**

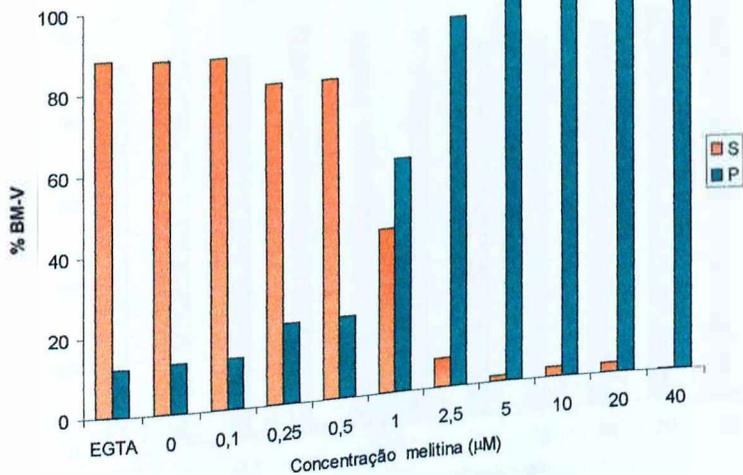
*Imunoblot* das frações S (sobrenadante) e P (precipitado) dos ensaios de sedimentação da BM-V com concentrações crescentes de melitina utilizando anticorpos anti-calmodulina e anti-dlc de *Clamydomonas*.

A



+ATP

B

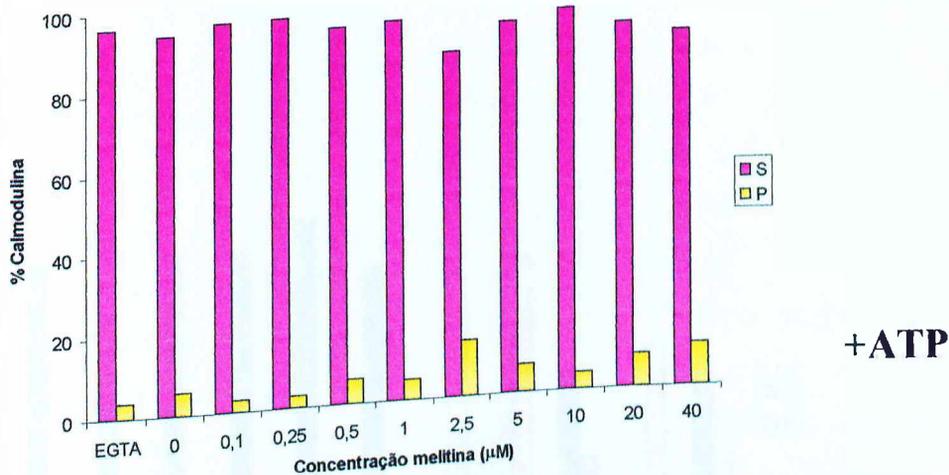


- ATP

Figura 11 - Densitometria dos ensaios de sedimentação da BM-V com melitina na presença e ausência de ATP

- A) Histograma correspondente a análise densitométrica das bandas de sobrenadante (S) e precipitado (P) da cadeia pesada da BM-V na presença de ATP.
- B) Histograma correspondente a análise densitométrica das bandas de sobrenadante (S) e precipitado (P) da cadeia pesada da BM-V na ausência de ATP.

A



B

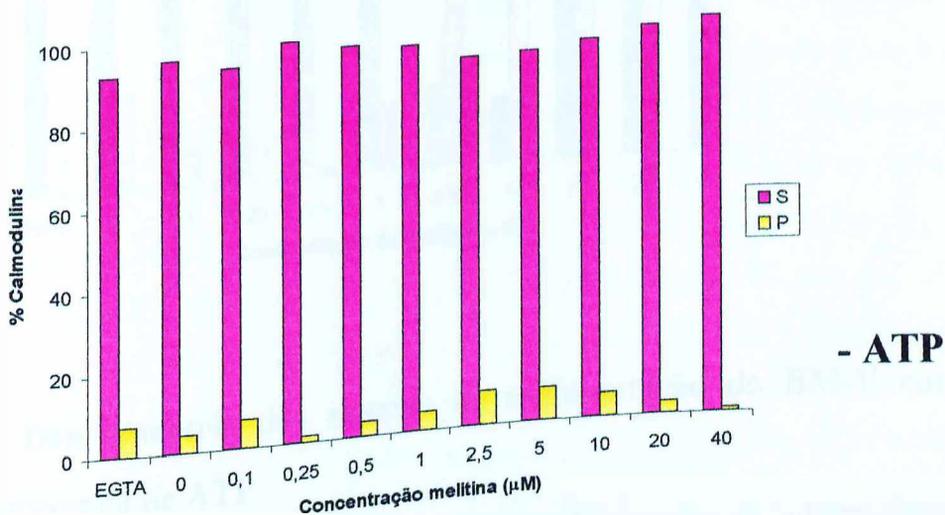
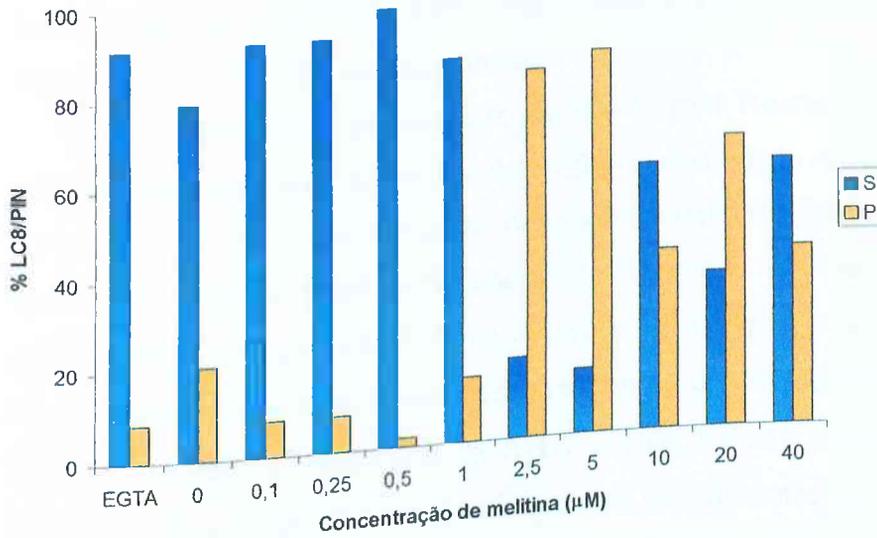


Figura 12 - Densitometria dos ensaios de sedimentação das cadeias leves de calmodulina da BM-V com melitina na presença e ausência de ATP

- A) Histograma correspondente a análise densitométrica das bandas de sobrenadante (S) e precipitado (P) da calmodulina na presença de ATP.
- B) Histograma correspondente a análise densitométrica das bandas de sobrenadante (S) e precipitado (P) da calmodulina na ausência de ATP.



**Figura 13 - Densitometria dos ensaios de sedimentação da BM-V com melitina na presença de ATP**

Histograma correspondente a análise densitométrica das bandas de sobrenadante (S) e precipitado (P) da cadeia leve de 10 kDa da BM-V (DLC8/PIN), n =2.

De acordo com RAYMENT *et al.* (1993a) no subfragmento S1 de miosina II a ligação do nucleotídeo provoca uma rotação na porção carboxi-terminal da cadeia pesada que é transmitida às cadeias leves possibilitando o movimento. Assim, parece que na miosina II a principal função destas cadeias leves é criar uma molécula maior amplificando as mudanças conformacionais propiciando a ligação do ATP no sítio ativo. Na interação melitina-BM-V este nucleotídeo poderia causar uma mudança de conformação que impediria a melitina de retirar as cadeias leves de CaM da BM-V. Desse modo, na presença de ATP, seria necessário concentrações mais altas de melitina para a insolubilização da proteína.

Os ensaios de cossedimentação de BM-V com F-actina na presença de melitina foram realizados na tentativa de verificar o efeito deste antagonista de CaM na interação da BM-V com a F-actina. A cossedimentação foi realizada na presença de 100 nM de BM-V, 1  $\mu$ M de F-actina e 2,0 e 0,5  $\mu$ M de melitina. Os ensaios na presença de ATP foram realizados com 13  $\mu$ M de cálcio livre e na ausência de ATP com 19  $\mu$ M de cálcio livre. Como encontramos que a concentração de melitina que causava alteração na solubilidade da BM-V era de 2,5  $\mu$ M procuramos utilizar valores de concentração que não interferissem na cossedimentação. No entanto, as concentrações de melitina utilizadas (2,0 e 0,5  $\mu$ M) ou foram insuficientes para verificar seu efeito na interação da BM-V/F-actina ou a melitina não influenciou esta interação. (Figura 14 e Figura 15, respectivamente). Estes achados nos indicam que a retirada das cadeias leves de CaM da BM-V e as conseqüentes alterações conformacionais que ocorrem nesta molécula não afetaram o sítio de ligação com a actina, visto que as cadeias leves de CaM não se cossedimentaram e não impediram a interação da cadeia pesada com a F-actina.

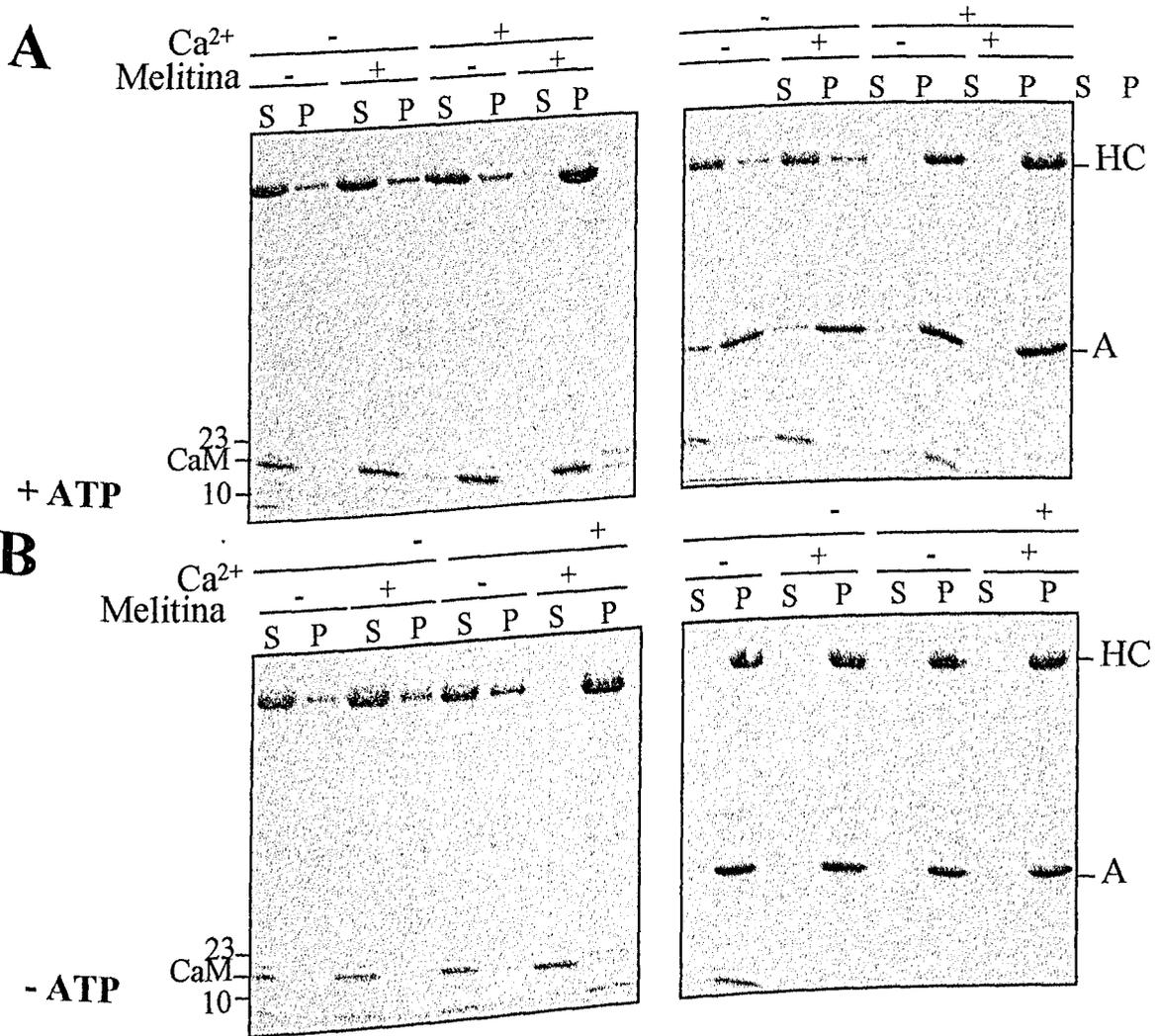
A concentração de melitina (10  $\mu$ M) utilizada no ensaio de clivagem da BM-V por calpaína não interferiu na proteólise. Os fragmentos obtidos na proteólise da amostra controle foram os mesmos obtidos na presença de melitina e na marcação do imunoblot (Figura 16). Assim, a melitina não interferiu na proteólise da BM-V pela calpaína.

Os ensaios de purificação dos fragmentos cabeça e cauda mostraram, através de imunoblot que o fragmento cauda de 65 kDa foi eluído com 0,15 M de NaCl e o fragmento cabeça com 0,75 M de NaCl. Através de análises de SDS-PAGE também foi verificado que as cadeias leves essenciais foram degradadas pela calpaína e as

cadeias leves de CaM permaneceram ligadas ao fragmento cabeça de 65 kDa. Dados de imunoblot revelaram que a cadeia leve de 10 kDa estava ligada ao fragmento cauda (Figura 17).

As preparações de BM-V feitas durante o curso deste trabalho não apresentaram um atividade ATPásica ao nível da relatada em MOOSEKER, CHENEY (1995) que mencionam uma atividade ATPásica de 45-60 ATP/segundo/cabeça de BM-V. O valor máximo de atividade ATPásica ativada por F-actina e estimulada por  $Ca^{2+}$ /calmodulina foi de 19 ATP/segundos. Em algumas preparações não se observou atividade ATPásica provavelmente devido a desnaturação da miosina-V. Suspeitou-se de vários fatores entre eles, água e pH que estariam afetando a não obtenção de uma BM-V ativa. Com relação a qualidade da F-actina utilizada para estes ensaios, foi padronizado ao longo desse trabalho um controle de qualidade para obtenção do pó-cetônico, utilizando somente acetona de qualidade (Merck). A preparação de G-Actina foi realizada no Laboratório do Dr. Roy Larson (Bioquímica-FMRP) de acordo com o protocolo descrito em Material e Métodos (item 2.2.2). A preparação de F-actina foi testada em vários ensaios de cossedimentação (Figura 14, Figura 15 e Figura 18) e demonstrada, de maneira adequada, sua qualidade funcional. Com relação a atividade ATPásica também foram obtidos dados de atividade de uma fração P2 tratada com 0,1% de Triton gelado obtida de acordo com EVANS *et al.* (1997). A fração P2 enriquecida em vesículas mostrou com sucesso uma atividade ATPásica ativada por F-actina e regulada por  $Ca^{2+}$ /CaM, inibida por trifluorperazina e não-inibida por 50mM de BDM (EVANGELISTA *et al.*, 1999). Estes dados foram importantes para confirmar a qualidade dos ensaios de ATPase realizados para BM-V pura tanto em relação à execução do método, qualidade da F-actina e CaM.

Um aspecto importante observado em todas as preparações de BM-V foi a homogeneidade da composição de suas cadeias leves. Um fato a observar é que diferente do que ocorreu nas preparações de BM-V realizadas no laboratório do Dr. Mooseker da Yale University (ESPINDOLA, comunicação pessoal), os pintainhos aqui utilizados são coletadas diretamente na Granja Planalto na mesma manhã de eclosão dos ovos e sacrificados na mesma tarde ou raramente na manhã seguinte, já no caso do laboratório acima referido os pintainhos são comprados por um setor específico da Universidade e geralmente não se tem o controle da idade dos pintainhos.



**Figura 14 – Sedimentação e cossedimentação da BM-V com 2,0 μM de melitina na presença e ausência de ATP**

A) SDS PAGE de amostras de sobrenadante (S) e precipitado (P) mostrando o efeito de melitina na sedimentação e cossedimentação da BM-V, na presença de 2,0 mM de ATP e com 13 μM de cálcio livre.

B) SDS PAGE das amostras de sobrenadante (S) e precipitado (P) mostrando o efeito de 2,0 μM de melitina na sedimentação e cossedimentação da BM-V na ausência de ATP e com 19 μM de cálcio livre. À direita estão indicados HC – cadeia pesada (heavy chain), A - actina, CaM - calmodulina, cadeias leves de 23 e 10 kDa.

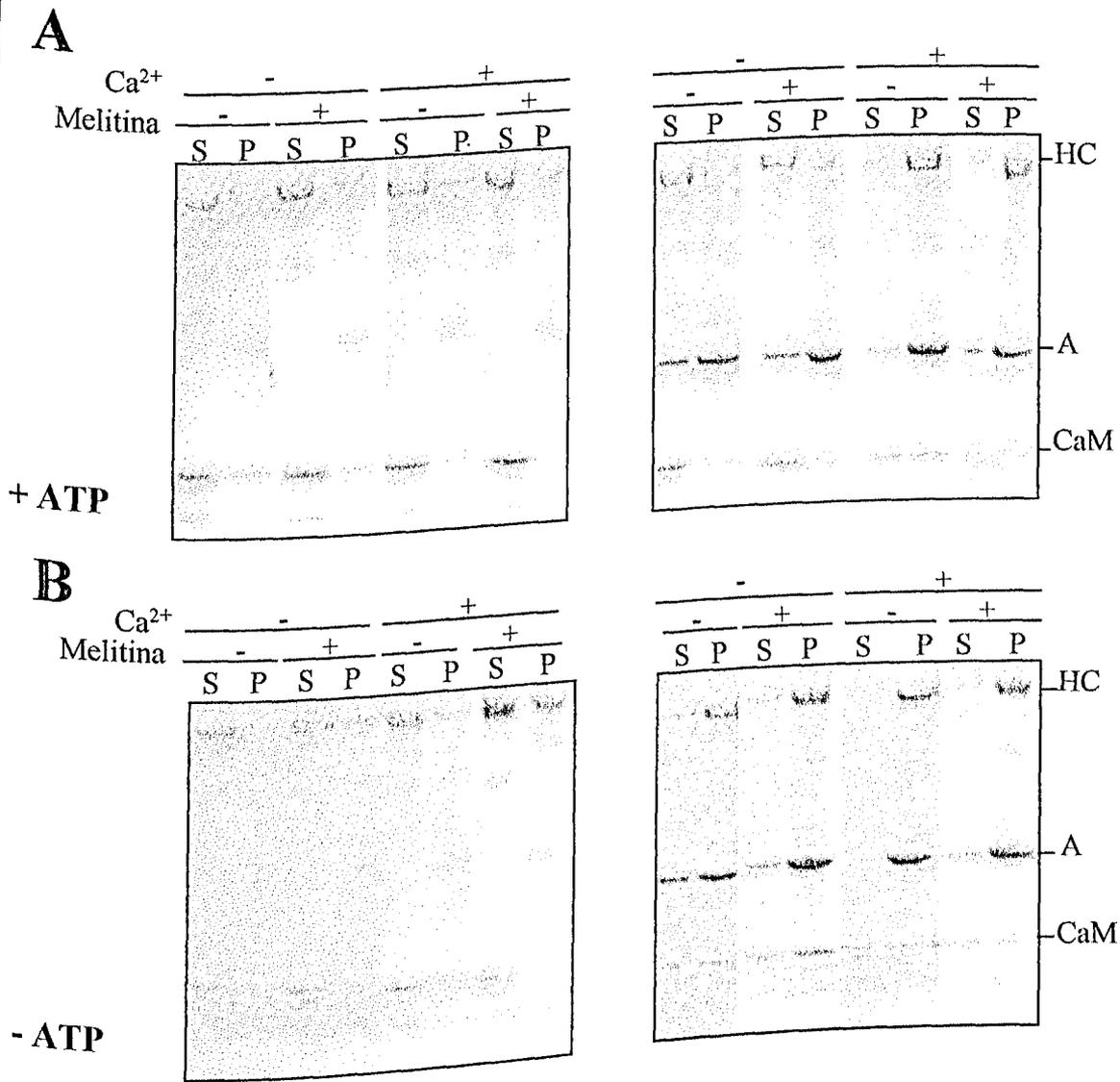
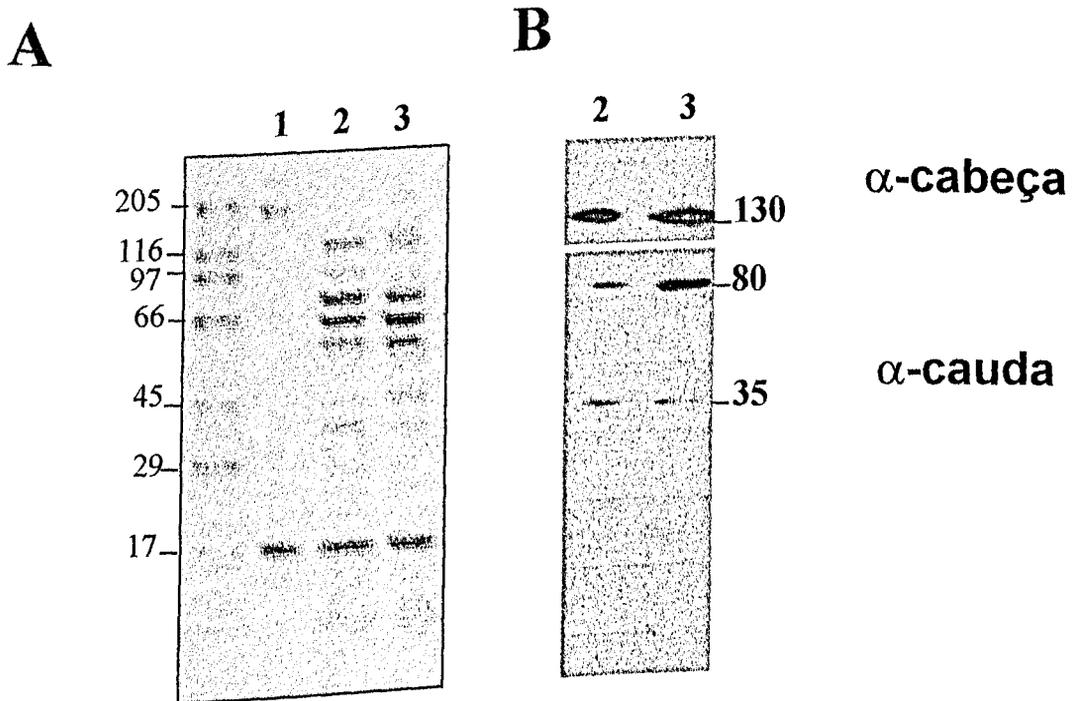


Figura 15 – Sedimentação e cossedimentação da BM-V com 0,5  $\mu$ M de melitina na

Presença e ausência de ATP

A) SDS PAGE das amostras de sobrenadante (S) e precipitado (P) mostrando o efeito de 0,5  $\mu$ M de melitina na sedimentação e cossedimentação da BM-V, na presença de 2 mM de ATP e com 13  $\mu$ M de cálcio livre.

B) SDS PAGE de amostras de sobrenadante (S) e precipitado (P) mostrando o efeito de 0,5  $\mu$ M de melitina na sedimentação e cossedimentação da BM-V na ausência de ATP com 19  $\mu$ M de cálcio livre. À direita estão indicados HC – cadeia pesada (heavy chain), A - actina e CaM - calmodulina, n =2.

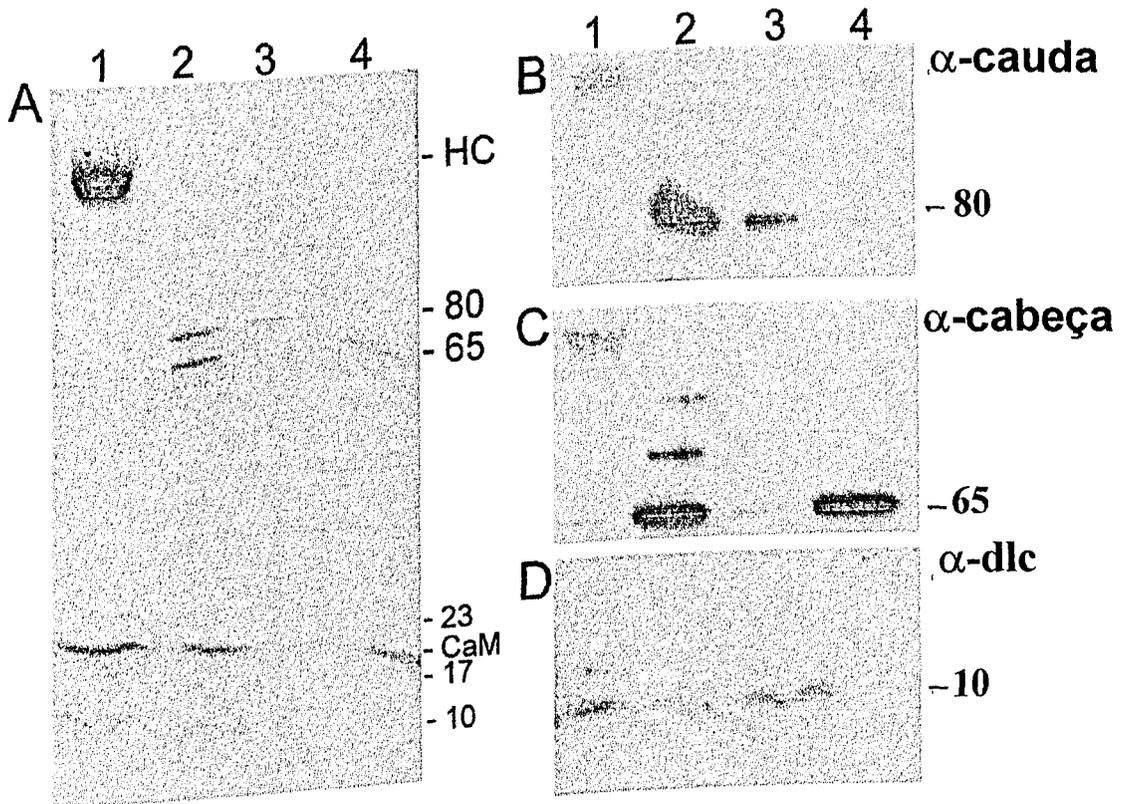


**Figura 16 - Proteólise da BM-V com calpaína na presença de melitina**

A) SDS-PAGE da BM-V intacta (1), clivada com a calpaína (2) e clivada com calpaína na presença de melitina (3).

B) Imunoblot das amostras 2 e 3 utilizando anticorpos contra os fragmentos cabeça e cauda.

À esquerda estão indicados os fragmentos cabeça de 130 kDa e cauda de 80 e 35 kDa. Os padrões de massa molecular relativa ( $M_r \times 10^3$ ) encontram-se indicados à direita.



**Figura 17 - Separação dos domínios cabeça e cauda da BM-V digerida com calpaína por cromatografia em Q-Sepharose**

A) SDS-PAGE da BM-V intacta (1), clivada com a calpaína (2) e frações eluídas da coluna com 0,15 M (3) e 0,75 M (4) de NaCl.

B, C e D: Imunoblots utilizando anticorpos para o domínio cauda globular (B), cabeça (C) e anti-dlc de *Clamydomonas* (D).

À esquerda estão indicados os fragmentos cauda de 80 kDa e cabeça de 65 kDa e cadeias leves de 23, 17 e 10 kDa.

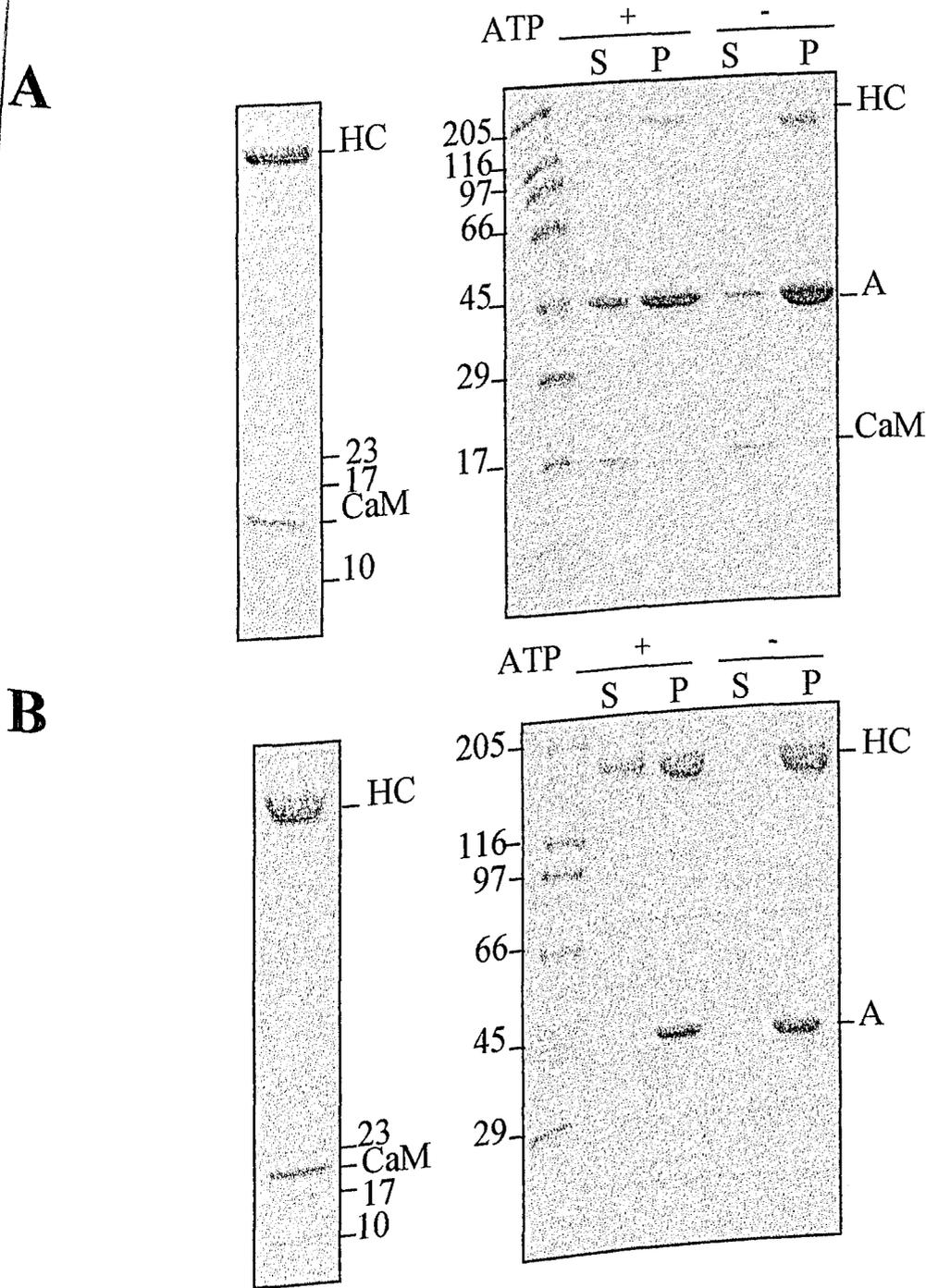
ESPINDOLA (comunicação pessoal) relatou que entre as diversas preparações de BM-V que realizou no Laboratório da Yale (EUA), foi notado que em alguns casos a cadeia leve de 23 kDa estava ausente. Levantou-se a hipótese de que esta variação poderia ser decorrente da diferença de idade dos pintainhos. Para evidenciar tal fato realizou-se um experimento controle patrocinado pelo Prof. Wilson Felipe Pereira (DEMOR- UFU) que gentilmente cedeu uma gaiola especial, seu laboratório e seus cuidados para a manutenção de 100 pintainhos até a idade de nove dias. O experimento realizado com estes pintainhos em comparação aos pintainhos de 1 dia de idade são mostrados na Figura 18. Observa-se que a cadeia leve de 23 kDa está presente nessa preparação sugerindo que não há variação aparente da presença desta cadeia leve.

A análise densitométrica da BM-V purificada de pintainho de nove dias revela a seguinte composição: para LC 23, CaM, LC 17 e 10 kDa foram respectivamente 1,0:4,0:2,0:3,0 subunidades por cadeia pesada de BM-V. Estes resultados diferem dos valores de 0,3:4,0:0,7:1,0 observados por CHENEY *et al.* (1993) e ESPINDOLA *et al.* (2000a) para BM-V normal.

Investigamos, também, o efeito do W-7 na molécula da BM-V. Os ensaios de interação foram realizados com 100 nM BM-V e concentrações crescentes de W-7. Os ensaios na presença de ATP foram realizados com 13  $\mu\text{M}$  de cálcio livre.

O efeito do W-7 na solubilidade da BM-V foi observado à partir de concentrações de 60  $\mu\text{M}$  onde observamos 89% da BM-V nas amostras dos sedimentos. Em concentrações de 80 e 100  $\mu\text{M}$  a alteração na solubilidade foi de 93% e 99% e as cadeias leves de CaM permaneceram no sobrenadante (Figura 19).

A estrutura em solução do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  com o antagonista W-7 consiste de uma molécula de W-7 ligando cada um dos dois domínios da CaM (OSAWA *et al.*, 1998). Ensaios de motilidade *in vitro*, mostraram que a ação de miosina-V no deslizamento de actina foi inteiramente inibida por W-7 e em análises de microscopia eletrônica pela técnica de sombreamento rotatório foram observadas alterações na estrutura da BM-V submetida a bombardeamento de W-7 na presença de cálcio, possivelmente devido a dissociação das moléculas desta miosina (ESPINDOLA *et al.*, 2000c).

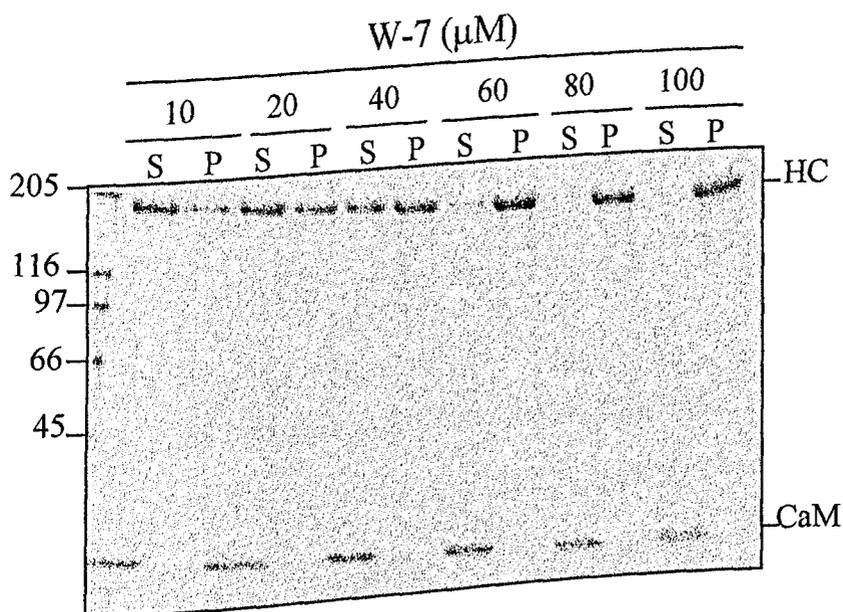


**Figura 18 - Comparação entre a cossedimentação de BM-V obtida de cérebros de pintainhos de diferente idades**

A) SDS-PAGE da purificação e cossedimentação de BM-V purificada de pintainhos de 1 dia de idade.

B) SDS-PAGE da purificação e cossedimentação de BM-V purificada de pintainhos de 9 dias de idade.

À direita estão indicados HC - cadeia pesada (heavy chain), A - actina, CaM - calmodulina e cadeias leves de 23, 17 e 10 kDa. Os padrões de massa molecular relativa ( $M_r \times 10^3$ ) encontram-se indicados à esquerda.



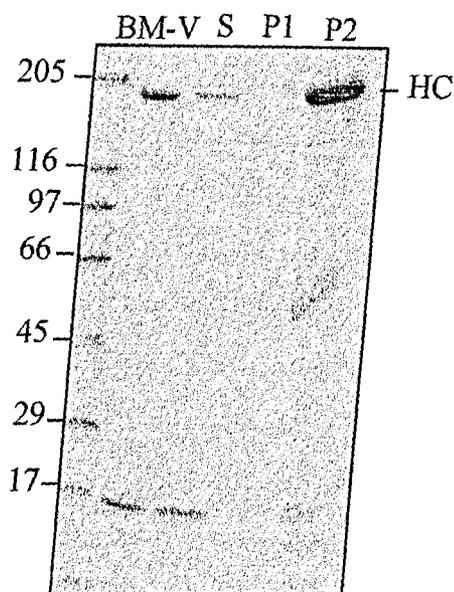
**Figura 19 - Efeito do W-7 na sedimentação de BM-V**  
 SDS-PAGE mostrando o efeito de concentrações crescentes de W-7 na solubilidade da BM-V, na presença de ATP e com  $13\mu\text{M}$  de cálcio livre. À direita estão indicados HC - cadeia pesada da BM-V (heavy chain) e CaM - calmodulina. Os padrões de massa molecular relativa ( $\text{Mr} \times 10^3$ ) encontram-se indicados à esquerda.

CHENEY *et al.* (1993) mostraram por visualização em microscopia eletrônica da BM-V purificada um espessamento uniforme da molécula estendendo para trás cerca de 20 nm da cabeça globular da miosina. Esta estrutura pode representar a cadeia pesada e as cadeias leves associadas ao domínio pescoço. Ensaio de *overlay* realizados por ESPREAFICO *et al.* (1992) mostraram que o domínio pescoço contém os sítios pra ligação de calmodulina. Sequenciamento peptídico das cadeias leves demonstrou que de fato tratava-se de calmodulina (ESPINDOLA *et al.*, 2000a). A estequiometria dessa associação cadeia leve-calmodulina para a BM-V de cérebro de pintainho de um dia (4-5 calmodulinas para cada cadeia pesada e 1-2 cadeias leves do tipo essencial) concorda com os dados para a BM-V de cérebro de pintainho de nove dias descartando um possível efeito desenvolvimental na relação da composição destas cadeias leves. Dados obtidos com trifluorperazina, um antagonista hidrofóbico de calmodulina (VEIGAL *et al.*, 1989), mostraram uma inibição da ativação da BM-V pelo  $Ca^{2+}$  na presença de actina (LARSON *et al.*, 1990; ESPINDOLA *et al.*, 1992).

Para NASCIMENTO *et al.* (1996) a natureza cooperativa da ativação por  $Ca^{2+}$  observada no limite de 1-3  $\mu M$  é reminescente da de outras enzimas reguladas por CaM, confirmando as hipótese de que o  $Ca^{2+}$  atua sobre BM-V via cadeias leves de calmodulina.

Foi mostrado em experimentos de sedimentação que a BM-V incubada com 100  $\mu M$  de W-7, na presença de cálcio, perdia sua solubilidade. Na tentativa de verificar a possibilidade de recuperação desta solubilidade, o precipitado obtido foi ressuspenso em tampão contendo Imidazol 10 mM, KCl 75 mM,  $MgCl_2$  2,5 mM, DTT 2 mM e EGTA 1 mM e incubado com calmodulina exógena.

Após a retirada das cadeias leves de CaM pelo W-7 a integridade estrutural da BM-V foi alterada de forma que a ressolubilização não foi possível mesmo com a adição de CaM exógena (Figura 20) (a amostra P2 representa a BM-V insolúvel que permaneceu na parede do tubo insolubilizada). Já nos ensaios de motilidade "in vitro" a BM-V tratada com o antagonista teve sua solubilidade recuperada após a adição de CaM (ESPINDOLA *et al.*, 2000c) possivelmente devido a diferenças estruturais de conformação entre as moléculas de BM-V em solução e a imobilizada na câmara de motilidade.



**Figura 20 – Ensaio de solubilidade da BM-V com W-7**  
SDS-PAGE das amostras de sobrenadante (S), precipitado 1 (P1) e precipitado 2 (P2) obtidas quando a BM-V foi incubada com 100  $\mu\text{M}$  de W-7, na presença de 19  $\mu\text{M}$  de cálcio livre, e centrifugada a 50.000 g por uma hora. À direita estão indicados HC – cadeia pesada (heavy chain). Os padrões de massa molecular relativa ( $\text{Mr} \times 10^3$ ) encontram-se indicados à esquerda.

OSAWA *et al.* (1999) investigando as mudanças estruturais na ligação  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  na presença de W-7 encontraram que a ligação de duas moléculas de W-7 induziram mudanças estruturais drásticas para o complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  que passou de uma estrutura alongada para uma estrutura globular compacta provavelmente pela dobra do ligante flexível. A ligação do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , nas moléculas de BM-V e na presença de W-7 pode provocar também estas mudanças estruturais comprometendo a atividade fisiológica da proteína.

Entre as questões levantadas em NASCIMENTO *et al.* (1996) podemos afirmar que algumas delas já foram respondidas e outras ainda não são conhecidas. Isto é a natureza das cadeias leves distintas de calmodulina encontradas por CHENEY *et al.* (1993) foram reveladas como cadeias leves essenciais por ESPINDOLA *et al.* (2000a). As questões se o  $\text{Ca}^{2+}$  é capaz de dissociar calmodulina? Em que condições? Qual o papel da ligação do  $\text{Ca}^{2+}$ ? O que as calmodulinas distantes causariam na regulação do *turnover* do ATP na cabeça da BM-V?

CAMERON *et al.* (1998) discutem estas questões. Um dos aspectos é sobre as mudanças conformacionais que ocorrem somente ao nível das cadeias leves para a miosina-II. No caso da BM-V, que tem a CaM como principal componente de cadeia leve, falta o triptofano e a fluorescência da CaM não contribui de maneira significativa para os efeitos que foram observado pelos autores. De acordo com a seqüência de aminoácido deduzida do primeiro e quinto motivos IQ de cada cadeia pesada inclui-se um triptofano. Daí a liberação da calmodulina destes sítios IQ poderia potencialmente expor os resíduos de triptofano ao meio aquoso causando decréscimo da fluorescência. Entretanto, eles não observaram nenhuma mudança do espectro quando  $\text{Ca}^{2+}$  foi adicionado, indicando que a exposição desses resíduos de triptofano não é a causa primária do *quenching* da fluorescência. CAMERON *et al.* (1998) especularam que as mudanças na fluorescência podem ser devido às alterações nas conformações da cadeia pesada que afetam esses e outros resíduos de triptofano. Também foi observado que o  $\text{Ca}^{2+}$  induz a um decréscimo da absorbância a 280 nm do pico que contém a cadeia pesada da BM-V. Dados de outras miosinas revelam que a dissociação das cadeias leves de miosina-II de molusco pode levar a um colapso parcial da região pescoço, de tal modo que se encurta a distância entre a cauda e a cabeça da miosina. Um colapso da região pescoço quando a calmodulina

dissocia-se pode correr por analogia com as outras miosinas e pelos dados aqui demonstrados e comentados.

Citando ainda CAMERON *et al.* (1998) que por comparação com as outras miosinas comentam que os sítios IQ da região pescoço da BM-V são parte de um alfa-hélice longa que é estabilizada pela ligação da calmodulina e de outras cadeias leves, pode se estimar a partir dos dados estruturais que o último sítio IQ em sua extremidade C-terminal está a uma distância de 0.25 nm da região de ligação de actina do domínio cabeça, isto é, cerca de duas vezes mais distantes que na miosina-II de músculo esquelético. Uma mudança conformacional na região pescoço com subsequente repercussão na região ligante de actina seria consistente com um mecanismo no qual a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  a uma ou mais cadeias leves regularia de algum modo a atividade de um sítio catalítico distante. Desde que a clivagem da BM-V pela calpaína mimetiza a junção cabeça-pescoço, o efeito do  $\text{Ca}^{2+}$  em ativar a acto-BM-V ATPase, a continuidade da cadeia pesada nesta região deve ser essencial para a regulação.

Um das características básicas da miosina da classe-V é que elas não formam filamentos como a miosina-II. Neste caso a miosina-II possui dois tipos de conformação referidas como formas 6 e 10 S de acordo com seus coeficientes de sedimentação. A forma 6 S forma filamentos sob condições iônicas fisiológicas o que não é observado na forma 10 S. A falta das cadeias leves de 17 e 20 kDa impede o enovelamento na forma 10 S, resultando na formação de filamentos na presença de ATP. Esta menor habilidade do enovelamento na forma 10 S para as miosina sem as cadeias leves de 20 kDa ou ambas cadeias leves pode ocorrer devido a coesão destas duas cabeças (KATOH, MORITA, 1996).

O modo de ligação das cadeias leves regulatórias são mostrados no fragmento S1 da estrutura em cristal da miosina-II e possuem características que assemelham-se às estruturas de ligação do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . A estrutura quaternária do pescoço da miosina muscular envolve não somente interações específicas das cadeias leves com as cadeias pesadas mas também estabilizam o contato do domínio N-terminal da cadeia leve essencial (ELC) com o domínio C-terminal da cadeia leve regulatória (RLC) (RAYMENT *et al.*, 1993a).

Poderia a calmodulina exercer na BM-V o mesmo papel que as cadeias leves regulatórias da miosina II? Sua liberação da BM-V poderia causar a exemplo das

RLC na miosina II, perda de conformação nativa e função? Isso seria possível se considerarmos que os motivos IQ da região pescoço sofreriam um possível colapso pela ausência das cadeias leves de CaM, o que propiciaria novas interações com outras regiões da molécula ou com outras moléculas de BM-V. Estas modificações conformacionais iniciadas no domínio pescoço poderiam ser amplificadas para toda a região da cabeça da BM-V causando sua desnaturação.

Existem várias sugestões de diversas funções para a cadeias leves de CaM e outras cadeias leves pertencentes a superfamília das proteínas *EF-hand*. Tem sido proposto que a ligação das cadeias leves estabiliza o *braço em alavanca* que é necessário para gerar o *tamanho de passo* requerido para a velocidade de deslizamento (RAYMENT *et al.*, 1993a, UYEDA *et al.*, 1996, HOWARD, SPUDICH, 1996, METHA *et al.*, 1999). Em cepas de leveduras em que estão ausentes os seis motivos IQ da Myo2p, as leveduras crescem quase tão bem quanto as cepas selvagem, sugerindo que a falta do domínio pescoço não é essencial para a função da Myo2p. Por outro lado, leveduras que super-expressam Myo2p crescem muito pouco, mas se super-expressam também a Mlc1p, que é equivalente a cadeia leve essencial da BM-V, elas crescem normalmente (STEVENS, DAVIS, 1998).

Segundo RECK-PETERSON *et al.* (2000) a função primária das cadeias leves na miosina-V de levedura poderia ser a de fornecer um suporte estrutural para o domínio pescoço da Myo2p. Todavia, se o comprimento do domínio pescoço correlaciona com o *tamanho do passo*, a Myo2p sem pescoço pode não ser capaz de movimento processivo ao longo do microfilamento. Portanto se a Myo2p é um motor processivo como a BM-V, a viabilidade da Myo2p sem pescoço levanta a possibilidade que sua função seja essencial mas não requeira movimento processivo.

Em eucariontes superiores as cadeias leves teriam papéis regulatórios adicionais aos observados para Myo2p, visto que a miosina-V de cérebro é regulada por  $Ca^{2+}$  *in vitro*. RECK-PETERSON *et al.* (2000) sugerem que provavelmente um modo de regulação da miosina-V seja por meio de alteração da rigidez flexional do domínio pescoço tanto pela dissociação da cadeia leve de CaM ou alteração da afinidade de ligação da cadeia leve. Entretanto, pelo fato da motilidade *in vitro* da miosina-Va ser inibida por  $Ca^{2+}$ , consideramos que o papel do cálcio na função da miosina-V seja ainda desconhecido (CHENEY *et al.*, 1993, WOLENSKI *et al.*, 1993). As funções essenciais da Myo2p de levedura não devem ser regulada por  $Ca^{2+}$

uma vez que as cepas mutantes de calmodulina que falham em se ligar ao  $\text{Ca}^{2+}$  *in vitro* são viáveis (GEISER *et al.*, 1991).

Através do uso de inibidores intracelulares da CaM procuramos, com nosso estudo contribuir para a elucidação da complexidade dos detalhes moleculares que envolvem a regulação da BM-V e suas cadeias leves.

## 5. CONCLUSÃO

As cadeias leves de CaM ligam-se aos motivos IQ por interações hidrofóbicas, e como na miosina muscular; estas cadeias leves estariam fazendo interações específicas com as cadeias pesadas. A retirada destas cadeias leves pela melitina e W-7 levariam a molécula de BM-V a perder sua integridade física e estrutural, causando na BM-V uma mudança de conformação com perda de solubilidade e conseqüente desnaturação.

Como não foram observados efeitos significativos da melitina nas cadeias leves de 17, 23 e 10 kDa, a perda de solubilidade observada parece ter sido decorrente da ausência das cadeias leves de CaM.

Portanto, consideramos que o uso dos antagonistas de CaM constitui uma ferramenta útil para indicar que a BM-V requer as cadeias leves de CaM associadas ao domínio pescoço para manter sua integridade física e funcional.

## 6. RESUMO

A miosina-Va de pintainhos (BM-V) possui duas cabeças motoras com múltiplas cadeias leves de calmodulina (CaM) associadas com o domínio pescoço ou regulatório de cada cadeia pesada, um fato consistente com os efeitos regulatórios do cálcio nesta miosina. As cadeias leves estão relacionadas à regulação motora e manutenção da estrutura íntegra do domínio pescoço, o qual conecta o domínio motor e o domínio cauda. Nós investigamos os efeitos específicos do cálcio e dos antagonistas de calmodulina (W-7 e Melitina) na desnaturação da BM-V. Para retirar as cadeias leves de CaM a BM-V foi incubada com os antagonistas de CaM na presença de 1 a 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  livre e suas propriedades bioquímicas foram avaliadas por sedimentação e interação com F-actina. Demonstramos que a melitina e o W-7 removem as cadeias leves de calmodulina em concentrações acima de 2,5  $\mu\text{M}$  e 80  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Basicamente, quando as cadeias leves de calmodulina são removidas por seus antagonistas a BM-V torna-se insolúvel. Na presença de ATP, em concentrações de melitina de 0,25 a 1  $\mu\text{M}$  ocorrem modificações na sedimentação da BM-V. Na concentração de 1  $\mu\text{M}$  de melitina, na ausência de ATP, foram observados 59% das amostras no precipitado contra 15% observados nos ensaios na presença deste nucleotídeo, sugerindo seu possível efeito protetor na insolubilidade da BM-V quando a CaM é removida. A habilidade da BM-V na interação com a F-actina não foi significativamente afetada pela melitina. Portanto, consideramos que o uso de antagonistas de CaM constitui uma ferramenta útil para indicar que a BM-V requer as cadeias leves de CaM associadas ao domínio pescoço para manter sua integridade física e funcional.

## 7. SUMMARY

Myosin-Va from chick brain (BM-V) is a two headed motor with multiple calmodulin (CaM) light chains associated with the regulatory or neck domain of each heavy chain, a feature consistent with the regulatory effects of  $\text{Ca}^{2+}$  on this myosin. The light chains are implicated in motor regulation and in maintaining structure integrity of neck domain, which connects motor and tail domains. We investigated the specific effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and calmodulin antagonists (W-7 or Melittin) in myosin-Va denaturation. To strip CaM light chains we incubated BM-V with calmodulin antagonists in the presence of 1-20  $\mu\text{M}$  free  $\text{Ca}^{2+}$  and evaluated its properties by sedimentation and F-actin binding. Myosin-Va loses all of its calmodulin light chains when incubated with  $\text{Ca}^{2+}$  plus W-7 or melittin at concentrations of 80 and 2,5  $\mu\text{M}$  respectively. Basically when its antagonist removes calmodulin, myosin-Va becomes insoluble. Experimental conditions in the presence of ATP showed the protector effect of this nucleotide in BM-V insolubility when CaM is removed. The ability of BM-V in F-actin interaction is not significantly affect by melittin. Therefore, we reported here a specific effect of calcium plus calmodulin antagonist on causing myosin-Va denaturation and the role of the calmodulin-neck domain interaction on structural integrity and myosin-Va function.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- BABIYCHUK, E. B.; SOBIESZEK, A. Oligomerization of smooth muscle myosin light chain kinase and its modifications by melittin and calmodulin *Biopolymers* v. 42, p. 673-686, 1997.
- BABU Y. S., BUGG C. E., COOK, W. J. Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol.* v.20 n. 4 p. 191-204, 1988.
- BAHLER, M.; KROSCHEWSKI, R.; STOFFLER, H-E.; BEHRMANN, T. Rat myr4 defines a novel subclass of myosin I: Identification, distribution, localization, and mapping of calmodulin binding sites with differential calcium sensitivity *J.Cell Biol.* v. 126, n. 2, p. 375-389, 1994.
- BAKER, J. P. ;TITUS, M. A. A family of unconventional myosins from the nematode *Caenorhabditis elegans* *J.Mol. Biol.* , v. 272, p. 523-535, 1997.
- BAKER, J. P., TITUS, M. A. Myosins: matching functions with motors *Curr. Op. Cell Biol.* v. 10, p. 80-86, 1998.
- BARCELOS, A. P. L.; COLETTTO, A. S.; KERR, W. E.; ESPINDOLA, F. S. O gânglio neural de larvas das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* expressa miosina-V e dineína citoplasmática. *Anais 45<sup>o</sup> Congresso Nacional de Genética.*, Gramado, RS, Brasil, 1999.
- BARCELOS, A. P. L.; GONÇALVES, S. M. C. ; SANTOS, A. A. D.;; ESPINDOLA, F. S. Presença de Miosinas e DLC8/PIN em tecidos de *Calomys callosus*. *Anais XV – FeSBE*, 2000.

- BEMENT, W. M.; HASSON, T.; WIRTH, J. A., CHENEY, R. E.; MOOSEKER, M. S.  
Identification and overlapping expression of multiple unconventional myosin genes  
in vertebrate cell types. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 91, p. 6549-6553, 1994.
- BENASHSKI, S. E., HARRISON, A., PATEL-KING, R.S., KING, S. M.  
Dimerization of the highly conserved light chain shared by dynein and myosin V.  
*J. Biol. Chem.* v. 272, n° 33, p. 20929-20935, 1997.
- BONAFÉ, N., SELLERS, J. Molecular characterization of myosin V from *Drosophila*  
*melanogaster* *J. Mus. Res. Cell Motil.* v. 19, n° 2, p. 129-141, 1998.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram  
quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v.  
72, p. 248-254, 1976.
- BRIDMAN, P. C. Myosin Va movements in normal and dilute-lethal axons provide  
support for dual filament motor complex *J. Cell Biol.* V. 146, n. 5, p. 1045-1060,  
1999.
- BROCKERHOFF, S. E.; STEVENS, R. C.; DAVIS, T. N. The unconventional myosin, Myo2p,  
is a calmodulin target at sites of cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* v. 124  
p. 315-323., 1994.
- CAMEROM, L. C., CARVALHO, R. N., ARAUJO, J. R. V., SANTOS, A. C.,  
TAUHATA, S. B. F., LARSON, R. E., SORENSON, M. Calcium induced  
quenching of intrinsic fluorescence in brain myosin V is linked to dissociation of  
calmodulin light chains *Arch. Biochem Bioph.* v. 355, n° 1, p. 35-42, 1998.
- CELIO, M. R.; PAULS, T.; SCHWALLER B. (Eds): Guidebook to the calcium-  
binding proteins *Oxford University Press*, 1996.

- CHENEY, R. E. , O'SHEA, M. K., HEUSER, J. E. , COELHO, M.V., WOLENSKI, J.S. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* , v. 75, p. 13-23, 1993.
- CHENEY, R. E. Purification and assay of myosin V. *Methods Enzymol.* v.298 p. 3-18; 1998.
- COELHO, M. V. , LARSON, R. E.  $Ca^{2+}$ -dependent phosphorylation of the tail domain of myosin-V, a calmodulin-binding myosin in vertebrate brain. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 26, p. 465-472., 1993.
- COMTE, M.; MAULET, Y.; COX, J. A.  $Ca^{2+}$ -dependent high-affinity complex formation between calmodulin and melittin *Biochem. J.* v. 209, p. 269-272, 1983.
- COSTA, M. C. R., MANI, F.; SANTORO, Jr. W., ESPREAFICO, E. M. , LARSON, R. E. Brain myosin-V, a calmodulin-carrying myosin, binds to calmodulin-dependent protein kinase-II and activates its phosphorylating activity. *J. Biol. Chem.* v. 274, n. 22, p. 15811-15819, 1999.
- CREPIEUX, P.; KWON, H.; LECLERC, N.; SPENCER, W.; RICHARD, S.; LIN, R.; HISCOTT, J. *Mol. Cell Biol.* v. 17, p. 7375-7385, 1997.
- DE LA CRUZ, E.; WELLS, A. L., ROSENFELD, S. S.; OSTAP, E. M.; LEE SWEENEY, H. The kinetic mechanism of myosin V *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 96, n. 24, p. 13726-13731, 1999.
- DOTIMAS, E. M.; HIDER, R. C. Honeybee venom *University of Essex, UK: Ph. D. thesis*, 1987.
- ENGLE, L., KENNETT, R. H. Cloning, analysis and chromosomal localization of myoxin (MYH12), the human homolog to the mouse dilute gene. *Genomics* v. 19, p. 407-416, 1994.

- EPSTEIN, E., SELA-BROWN, A., RINGEL, I., KILAV, R., KING, S. M., BENASHKI, S. E., YISRAELI, J. K., SILVER, J., NAVEH-MANY, T. Dynein light chain binding to a 3'-untranslated sequence mediates parathyroid hormone mRNA association with microtubules *The Journal of Clinic Investigation* v. 105, n. 4, p. 505-512, 2000.
- ESPINDOLA, F. S., ESPREAFICO, E. M., COELHO, M. V., MARTINS, A., COSTA, F. R. C. Biochemical and immunological characterization of p-190-calmodulin complex from vertebrate brain: A novel calmodulin binding myosin. *J. Cell Biol.* v. 118, p.359-68., 1992.
- ESPINDOLA, F. S.; CHENEY, R. E.; KING, S. M.; SUTER, D. M.; MOOSEKER, M. S. Myosin- V and dynein share a similar light chain. *Mol. Biol. Cell* (suplement), v 7, p. 372a., 1996.
- ESPINDOLA, F. S.; SUTER, D.; PARTATA, L. B. E.; CAO, T.; WOLENSKY, J. S.; CHENEY, R. E.; KING, S. M.; MOOSEKER, M. S. The light chain composition of chick brain myosin-Va: calmodulin, myosin-II essential light chain, and 8 KDa dynein light chain/PIN (submetido), 2000a.
- ESPINDOLA, F. S., OLIVEIRA, R. A., PROCÓPIO, L. D., BARCELOS, A. P. L., CUNHA-JÚNIOR, J. P., CUSTÓDIO, R. S., COELHO, M. V., LARSON, R. E., ESPREAFICO, E. M. Immunolocalization of myosin Va in endocrine rat tissues (submetido), 2000b.
- ESPINDOLA, F. S., PARTATA, L. B. E., CUNHA-JÚNIOR, J. P., HEUSER, J., WOLENSKI, J., MOOSEKER, M. Effect of antagonist in brain myosin-Va (manuscrito), 2000c.
- ESPREAFICO, E. M.; CHENEY, R. E.; MATTEOLI, M.; NASCIMENTO, A. A.C.; DE CAMILLI, P. V. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-v (p-190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J. Cell Biol.*, v. 119, p. 1541-57., 1992.

- ESPREADICO, E. M.; COLING, D. E.; TSAKRAKLIDES, V.; KROGH, K., WOLENSKI, J. S.; KALINEC, G.; KACHAR, B. Localization of myosin-V in the centrosome *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 95, p. 8636-8641, 1998.
- EVANGELISTA, L. M.; PARTATA, L. B. E.; COELHO, M.V.; CAMERON, L.C.; ESPINDOLA, F.S.; Efeito do alumínio sobre a atividade ATPásica em preparação de miosina-V associada a vesículas. *Anais XIV IêSBE*, 1999.
- EVANS, L. L., HAMMER, J., BRIDGIMAN, P.C. Subcellular localization of myosin V in nerve growth cones and outgrowth from dilute-lethal *neurons* *J. Cell Sci.* v. 110, p. 439-449., 1997.
- EVANS, L. L., LEE, A.J., BRIDGMAN, P. C., MOOSEKER, M. S. Vesicle-associated brain myosin V can be activated to catalyse actin-based transport *J. Cell Sci.* v. 111, p. 2055-2066, 1998.
- FABIATO, A. Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metal and ligands. *Methods Enzimol.* v. 157, p. 378-417, 1988.
- FISCHER, P. J.; PRENDERGAST, F. G.; EHRHARDT, M. R.; URBAUER, J. L. ; WAND, A. J.; SEDAROUS, S. S.; McCORMICK, D. J.; BUCKLEY, P. J. Calmodulin interacts with amphiphilic peptides composed of all d-amino acids *Nature* v. 368, p. 651-653, 1994.
- GEISER, J. R., VAN-TUINEM, D., BROCKERHOFF, S. E., NEFT, M. M, DAVIS, T. N. Can calmodulin function without binding calcium? *Cell* v. 65, p. 949-959, 1991.
- GELL, M. I.; WESP, A., RIEZMAN, H. Distinct functions of calmodulin are required for the uptake step of receptor-mediated endocytosis in yeast: the type I myosin Myo5p is one of the calmodulin targets *The EMBO J.* v. 17, n. 3, p.1 635-647, 1998.

- GOODSON, H. V.; WARRICK, H. M.; SPUDICH, J. A. Specialized conservation of surface loops of myosin: evidence that loops are involved in determining functional characteristics *J. Mol. Biol.* v. 287 p. 173-185, 1999.
- GOPALAKRISHNA, R., ANDERSON, B. Calcium induced hydrophobic site on calmodulin: application for purification by phenyl-sepharose affinity chromatography. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* v. 104, n° 2, p. 830-836, 1982.
- GRISCELLI, C.; DURAND, A.; GUY-GRAND, D.; DAGUILLARD, F.; HERZOG, C.; PRUNIERAS, M. A syndrome associating partial albinism and immunodeficiency *Am. J. Med.* v. 65, p. 691-702, 1978.
- HARRER, B. K., PETZOLD, A S., LILLIE, S. H., BROWN, S. S. Identification of MYO4, a second classV myosin gene in yeast. *J. Cell Sci.* v. 107, p. 1055-1064, 1994.
- HIROKAWA, N.. Kinesin and dinein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science.* , v. 279, p. 519-526., 1998.
- HODGE, T., COPE, M. S. T. V. A myosin family tree. *Journal of Cell Science* v. 113, p. 3353-3354, 2000.
- HOWARD, J. , SPUDICH, J. A. Is the lever arm of myosin a molecular elastic element ? *Proc Natl Acad Sci* v. 93, n. 9, p. 4462-4, 1996.
- HUANG, W. M.; REED-FOURQUET, L.; WU, J. Y. Molecular cloning and amino acid sequence of brain L-glutamate decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 87, p.8491-5, 1990.
- HUANG, J. D.; BRADY, S. T.; RICHARDS, B. W.; STENOIEN, D.; RESAU, J. H., COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A. Direct interaction of microtubule and actin based transport motors *Nature* v. 397, p. 267-270, 1999.

- IKURA, M.; CLORE, G. M.; GRONENBORN, A. M.; ZHU, G.; KLEE, C. B.; BAX, A. Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science* v. 256, p. 632-638, 1992.
- INAGAKI, M., TANAKA, T., HIDAKA, H. Calmodulin antagonists enhance calcium binding to calmodulin. *J. Neurochem.* v. 66, n° 5, p. 1933-1942, 1996.
- ITAKURA, M.; IIO, T. Static and kinetic studies of calmodulin and melittin complex. *J. Biochem.* v. 112, n. 2, p. 183-191, 1992.
- JAFFREY, S. M., SNYDER, S. H. Pin: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science.* , v. 274, p. 774-777, 1996.
- JAMES, P., VORHERR, T., CARAFOLI, E. Calmodulin-binding domains: just two faced or multi faceted? *Tibs* v. 20, p. 38-44, 1995.
- JOHNSTON, G. C., PRENDERGAST, SINGER, R. A. The *Saccharomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes a essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J. Cell Biol.* , v. 113, p.539-551., 1991.
- KATOH, T.; MORITA, F. Roles of light chains in the activity and conformation of smooth muscle myosin. *The Journal of Biological Chemistry* v. 271, n. 17, p. 9992-9996, 1996.
- KAWASHIMA, M.; NABESHIMA, Y; OBINATA, T.; FUJII-KURYAMA, Y. A common myosin light chain is expressed in chicken embrionic skeletal, cardiac, and smooth muscles and in brain continuously from embryo to adult. *J. Biol. Chem.* v. 262, n. 30, , p. 14406-14414, 1987.
- KING, S. M., PATEL-KING, R. S. The Mr=8,000 and 11,000 outer arm dynein light chains from clamydomonas flagella have cytoplasmic homologues. *J. Cell Biol.* v. 270, p. 11445-11452, 1995.

- KING, S. M.; BARNARESE, E.; DILLMAN, J. F.; PATEL-KING, R. S.; CARSON, J. H.; PFISTER, K. K. *J. Biol. Chem.* v. 271, p. 19358-19366, 1996.
- KLEIN, C.; PHILIPPE, N.; LE DEIST, F.; FRAITAG, S.; PROST, C.; DURANDY, A.; FISCHER, A.; GRISCELLI, C. *J. Pediatr.* v. 125, p. 886-895, 1994.
- LAEMMLI, U. K, FAVRE, M. . Maturation of the head of bacteriophage T4 *J. Mol. Biol.* v. 80, p. 575-599, 1973.
- LANGFORD, G. M, MOLYNEAUX, B. J. Myosin V in the brain: mutations lead to neurological defects. *Brain Res. Reviews* v. 28, p. 1-8, 1998.
- LANGFORD, G. M. ER transport on actin filaments in squid giant axon: implications for signal transduction at synapse. *FASEB J. Suppl* 2, p. 248-250, 1999.
- LARSON, R. E., PITTA, D. E., FERRO, J. A. A novel 190 kDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 21, p. 213-217, 1988.
- LARSON, R. E., ESPINDOLA, F. S., ESPREAFICO, E. M. Calmodulin-binding proteins and calcium/calmodulin-regulated enzyme activities with brain actomyosin. *J. Neurochem.* v. 54, p.1288-1294, 1990.
- LARSON, R. E. Myosin-V: a class of unconventional molecular motors. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 29, p. 309-318., 1996.
- LIU, L.; YAN, H.; NI, A.; CHENG, X., HE, B. Interaction of calmodulin with synthetic deletion peptides of melittin *Int. J. Pept. Res.* v. 43, n. 1, p. 107-112, 1994.
- MANI, F., ESPREAFICO, E. M., LARSON, R. E. Myosin V is present in synaptossomes from rat cerebral cortex *Braz. J. Med Biol. Res.* v. 27, p. 2639-2643, 1998.

- MEADOR, W. E.; MEANS, A. R.; QUIOCHO, F. A. Target enzyme recognition by calmodulin: 2,4 Å structure of a calmodulin-peptide complex *Science* v. 257, p. 1251-1254, 1992.
- MEADOR, W. E.; MEANS, A. R.; QUIOCHO, F. A. Modulation of calmodulin plasticity in molecular recognition on the basis of X-ray structures *Science* v. 262, p. 1718-1721, 1993.
- MEHTA, A. D.; ROCK, R. S.; RIEF, M.; SPUDICH, J. A.; MOOSEKER, M. S.; CHENEY, R. E. Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* v. 400, p. 590-593, 1999.
- MENDES, C. T.; PEIXOTO, P. M. V.; ESPINDOLA, F. S. Identificação de miosina-Va, miosina-VI, dineína e DLC8/PIN em cérebro de operárias de abelhas *Apis mellifera*. *Anais XVI FeSBE*, 2000.
- MERCER, J. A.; SEPERACK, P. K.; STROBEL, M. C.; COPELAND, N. G.; JENKIS, N. A. Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat color locus. *Nature* v. 349, p. 709-713., 1991.
- MERMALL, V., POST, P. L., MOOSEKER, M. S. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* v. 279, p. 527-33., 1998.
- MIYAMOTO, H.; NIHONMATSU, I.; KONDO, S.; UEDA, R.; TOGASHI, S.; HIRATA, K.; IKEGAMI, Y.; YAMAMOTO, D. *Genes Dev.* v. 9, p. 612-625, 1995.
- MOLYNEAUX, B. J., LANGFORD, G. M. Characterization of antibodies to the head and tail domains of squid brain myosin V *Biol. Bull.* V. 193, p. 22-223, 1997.
- MOOSEKER, M. S.; CHENEY, R. E. Unconventional myosins. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, v. 11, p. 633-675, 1995.

- MOREAU, V.; WAY, M. In vitro approaches to study actin and microtubule dependent cell process *Curr. Op. Cell Biol.* v. 11, p. 152-158, 1999.
- NABESHIMA, Y., NONOMURA, Y., FUJII-KURIYAMA, Y. *J. Biol. Chem.* v. 262, p. 10608-10612, 1987.
- 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. *J. Biol. Chem.*, v. 132, p. 1053-1060., 1996.
- OSAWA, M.; SWINDELLS, M. B.; TANIKAWA, J.; TANAKA, T.; MASE, T.; FURUYA, T. AND IKURA, M. Solution structure of calmodulin-W-7 complex: the basis of diversity in molecular recognition *J. Mol. Biol.* v. 276, p. 165-176, 1998.
- OSAWA, M. K. S., IZUMI, Y., YAP, K. L., IKURA, M., SHIBANUMA, T., YOKOKURA, H., HIDAKA, H., MATSUSHIMA, N. Evidence for calmodulin inter-domain compactation in solution induced by W7 binding *FEBS Lett.* v. 442, p. 173-177, 1999.
- PASTURAL, E., BARRAT, J., DUFOURCD-LAGELOUSE, R., CERTAIN, S., SANAL, O, JABADO, N., SEGER, R., FISCHER, A, BASILE, G. S. Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene *Nat. Genet.* v. 16, n° 3, p. 289-292, 1997.
- PETERSON, M. D., URIOSTE, A. S., TITUS, M. A *Dictiostelium discoideum* MyoJ: a member of a broadly defined myosin V class or a class XI unconventional myosin? *J. Mus. Res. Cell Motil.* v. 17, p. 411-424., 1996.
- PONTING, C. P. AF-6/canoe: neither a kinesin nor a myosin, but a bit of both. *Trends Biochem. Sci.* v. 20, p.265-266, 1995.

- PRASAD, R.; GU, Y.; ALDER, H.; NAKAMURA, T.; CANAANI, O.; SAITO, H., HUEBNER, K.; GALE, R. P.; NOWELL, P. C.; KURIYAMA, K. Cloning of the ALL-1 fusion partner, the AF-6 gene, involved in acute myeloid leukemias with the t(6;11) chromosome translocation. *Can. Res.* v. 53, p. 5624-5628, 1993.
- PREKERRIS, R., TERRIAN, D. M. Brain Myosin-V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a  $Ca^{12}$ -dependent interaction with the synaptobrevin-sinaptophysin complex. *J. Cell Biol.* v. 137, p. 1589-1601., 1997.
- PROVANCE, D. W. Jr., MERCER, J. A. Association of dilute with melanosomes in melanocytes. *Mol. Biol. Cell* (6° suplemento) v.146, 1996.
- RAYMENT, I.; RYPNIEWSKI, W. R.; SCHMIDT-BÄSE, K.; SMITH, R.; TOMCHICK, D. R.; BENNING, M. M.; WINKELMANN, D. A.; WESENBERG, G.; HOLDEN, H. M. Three dimensional structure of myosin subfragment-1: A molecular motor. *Science.*, v. 261, p. 50-58., 1993a.
- RECK-PETERSON, S. L., PROVANCE, D. W. Jr., MOOSEKER, M. S., MERCER, J. A. Class V myosins. *Biochem. Biophys. Acta* v. 1, n. 1496, p. 36-51, 2000.
- REIS, D. S.; SOUZA, M. A.; MINEO, J. R.; ESPINDOLA, F. S.; The effect of gamma interferon on myosin and NOS expression en J774 murine macrophages (submetido Brazilian Journal), 2000.
- RODIONOV, V. I.; HOPE, A. J.; SVITKINA, T. M.; BORISY, G. G. *Curr. Biol.* V. 8, p. 165-168, 1998.
- RODRIGUES, O. C.; CHENEY, R. E. *Mol. Biol. Cell*, v.9, 20<sup>a</sup> (abstr), 1998.
- ROGERS, S. L.; GELFAND, V. I. Myosin cooperates with microtubule motors during organelle transport in melanophores. *Curr. Biol.* v. 8, n. 3, p. 161-164, 1998.

- ROUFOGALIS, B. D.; MINOCHERHOMJEE, A. M. ; AL-JOBORE, A.  
Pharmacological antagonism of calmodulin *Can. J. Biochem. Cell Biol.* v. 61,  
1982.
- SALMON, E.D., WAY, M. Cytoskeleton *Curr. Op. Cell Biol.* v. 11, p. 15-17,  
1999.
- SANDERS, G., LICHTER, B., MEYER, H. E., KILMANN, M. W. cDNA encoding the  
chicken ortholog of the mouse dilute gene product. Sequence comparison reveals a  
myosin I subfamily with conserved C-terminal domains. *FEBS Lett.* v. 311, p. 295-  
298, 1992.
- SCALONI, A.; MIRAGLIA, N.; ORRU, S.; AMODEO, P.; MOTTA, A.; MARINO,  
G.; PUCCI, P. Topology of the calmodulin-melittin complex *J. Mol. Biol.* v. 277,  
p. 945-958, 1998.
- SHCOTT, D.; HO, J.; PRUYNE, D.; BRETSCHER, A. The COOH-terminal domain  
of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting *J. Cell  
Biol.* v. 147, n. 4, p. 791-807, 1999.
- SEEHOLSER, S. H.; COHN, M.; PUTKEY, J. A.; MEANS, A. R.; CRESPI, H. L.;  
NMR studies of a complex of deuterated calmodulin with melitin. *Biochem.* v.  
83, p. 3634-3638, 1986.
- SIROTKIN, V., BONDER, E. M. Cloning and characterization of expression of sea  
urchin egg myosin V *Mol. Biol. Cell.*, v. 8, p. 372<sup>a</sup>, 1997.
- SMALL, J. V., ROTTNER, K., KAVERINA, I. Function design in the actin  
cytoskeleton *Curr Op. Cell Biol.* v. 11, p. 54-60, 1999.
- SPUDICH, J., WATT, S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I.  
Biochemical studies of interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin

and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.*, v. 246, p. 4866-4871., 1971.

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

SUTER, D. M.; ESPINDOLA, F. S.; LIN, C. H.; FORSCHER, P.; MOOSEKER, M. S. Localization of unconventional myosins V and VI in neuronal growth cones. *J. Neurobiol.* v. 275, n. 4, p. 2598-2606, 2000.

STEVENS, R. C.; DAVIS, T. N. Mic1p is a light chain for the unconventional myosin Myo2p in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* v. 142, n. 3, p. 711-722, 1998.

SVOBODA, K., BLOCK, S. M. Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell* v. 77, p. 773-784, 1994.

SWANLJUNG-COLLINS, H.; COLLINS, J.H.  $Ca^{2+}$  stimulates the  $Mg^{2+}$ -ATPase activity of brush border myosin I with three or four calmodulin light chains but inhibits with less than two bound. *J. Biol. Chem.* v. 266, n. 2, p. 1312-1319, 1991.

TAUHATA, S. B. F. Estudo das propriedades mecanoquímicas da miosina V de cérebro. *Tese de Doutorado*, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1999.

TAUSSKY, H.H., SHORR, E. A microcalorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.* v. 202, p. 675-685, 1953.

TOWBIN, H., STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

- TRYBUS, K. M.; KREMENTSOVA, E.; FREYZON, Y. Kinetic characterization of a monomeric unconventional myosin V construct *J. Biol. Chem.* v. 274, n. 39, p. 27448-27456, 1999.
- TSAKRAKLIDES V., KROGH, K.; WANG, L., BIZARIO, J.C.; LARSON, R. E.; ESPREAFICO, E.M.; WOLENSKI, J.S. Subcellular localization of GFP-myosin-V in live mouse melanocytes *J Cell Sci.* v.112, p.2853-65, 1999.
- UYEDA, T. Q. P., ABRANSON, P. D., SPUDICH, J. A. The neck region of the myosin motor acts as a lever arm to generate movement *Proc. Natl. Acad. Sci.* V. 93, p. 4459-4464, 1996.
- VALE, D. R., MILLIGAN, R. A. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* v. 288, p.88-95, 2000.
- VEIGEL, C., COLUCCIO, L. M., JONTES, J. D., SPARROW, J. C., MILLIGAN, R. A., MOLLOY, J. E. The motor protein myosin-I produces its working stroke in two steps v. 398, p. 530-533, 1989.
- WANG, F.; CHEN, L.; ARCUCCI, O.; HARVEY, E. V.; BOWERS, B.; XU, YUHUI; HAMMER III, J. A.; SELLERS, J. R. Effect of ADP and ionic strength on the kinetic and motile properties of recombinant mouse myosin V *J. Biol. Chem.* v. 275, n. 6, p. 4329-4335, 2000.
- WEBER, K., OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* v. 244, p. 4406-4412, 1969.
- WEI, Q., WU, X., HAMMER, J. A. 3rd The predominant defect in dilute melanocytes is in melanosome distribution not cell shape, supporting a role for myosin V in melanosome transport *J. Mus. Res. Cell Motil.* v. 18, n. 5, p. 517-527, 1997.

- WOLENSKI, J. S.; HAYDEN, S. M.; FORSCHE, R. P.; MOOSEKER, M. S. Calcium-calmodulin and regulation of brush-border myosin-I Mg-ATPase and mechanochemistry. *J. Cell Biol.* v. 122, p. 613-621, 1993.
- WOLENSKI, J. S. Regulation of calmodulin-binding myosins. *Trends in Cell Biol.* v.5, p.319-316, 1995.
- XIE, X., HARRISON, D. H., SCHLICHTING, I., SWEET, R. M., SZENT-GYORGYI, A. G., COHEN, C. Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2.8 Å resolution *Nature* v. 368, p. 306-312, 1994.
- ZHAO, L. P., KOSLOVSKY, J. S., REINHARD, J., BAHLER, M., WITT, A. E., PROVANCE, D. W. Jr. Cloning and characterization of myr 6, an unconventional myosin of the dilute-myosin V family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 93, n° 20, p. 10826-10831, 1996.