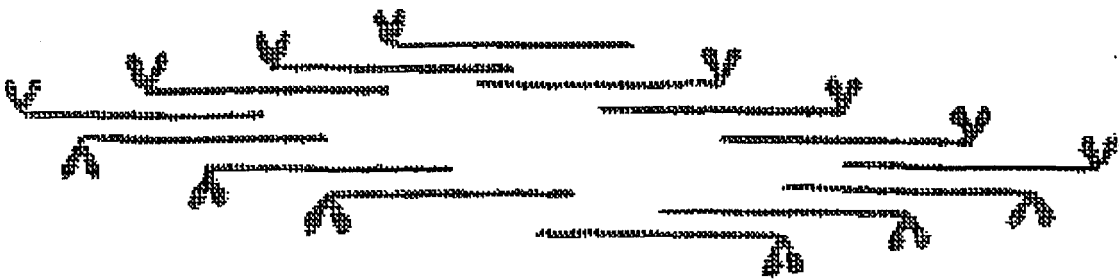




UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO DE ATIVIDADE ATPÁSICA DE
MIOSINA V DE CÉREBRO DE RATO
OBTIDA POR CONGELAMENTO**



Aluno: Hugo Christiano Soares Melo

Orientador: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

SISBI/UFU



1000210966

UBERLÂNDIA - MG
MAIO - 2003



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

MON
577.112
M528C
TES/MEM

**CARACTERIZAÇÃO DE ATIVIDADE ATPÁSICA DE
MIOSINA V DE CÉREBRO DE RATO
OBTIDA POR CONGELAMENTO**

Aluno: Hugo Christiano Soares Melo

Orientador: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

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

UBERLÂNDIA - MG
MAIO - 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
BIBLIOTECA

SISBI/UFU

210966

D

FU 000277553

FICHA CATALOGRÁFICA

M528c Melo, Hugo Christiano Soares, 1979 -
Caracterização de atividade ATPásica de miosina V de cérebro
de rato obtida por congelamento – Uberlândia, 2003
67f. : il.
Orientador: Milton Vieira Coelho
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui Bibliografia
1. Miosina V - Teses. 2. Cérebro - Teses. 3. Miosina V -
purificação - Teses. I. Coelho, Milton Vieira. II. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-graduação Genética e
Bioquímica.

CDU: 577.112 (043.3)



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

**CARACTERIZAÇÃO DE ATIVIDADE ATPÁSICA DE
MIOSINA V DE CÉREBRO DE RATO
OBTIDA POR CONGELAMENTO**

Hugo Christiano Soares Melo

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Milton Vieira Coelho (Orientador)

Examinadores:

Foued Salmen Espindola (Titular)

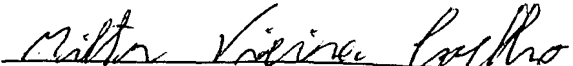
Fabio Oliveira (Titular)

Amélia Hamaguchi

Veridiana de Melo Rodrigues

Data da Defesa: 27 / 05 / 2003

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas


Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

Uberlândia, 16 / 05 / 03

"Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem 'Por quê?'. Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo 'Por que não?'."

(George Bernard Shaw)

*Aos meus pais, Eva e
Délío, meu eterno
agradecimento por tudo
que me foi oferecido. Ao
meu mestre, Milton Vieira
Coelho, minha sincera
gratidão pela paciência e
confiança.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos companheiros de laboratório: Decivaldo (Vicentin), Ademilton (Papi), Rogério (Rogê), Gabriel (Docinho) e Vinicius (Vivi) pelas eventuais ajudas e pelo apoio durante grande parte deste trabalho. À estes mesmos indivíduos pela amizade, momentos de distração, “lanpartys”, noites no “Quinca’s bar”, enfim, tudo que possibilitou a normalidade mesmo em momentos de reclusão no laboratório.

À minha namorada, Priscila, por estar ao meu lado. Obrigado por existir.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, seus funcionários e docentes que se dedicam heroicamente para manutenção de um instituto de ótima qualidade.

À secretária do Instituto de Genética e Bioquímica, Marlene, pela cooperação e esforço para obtenção de materiais de suma importância para este trabalho.

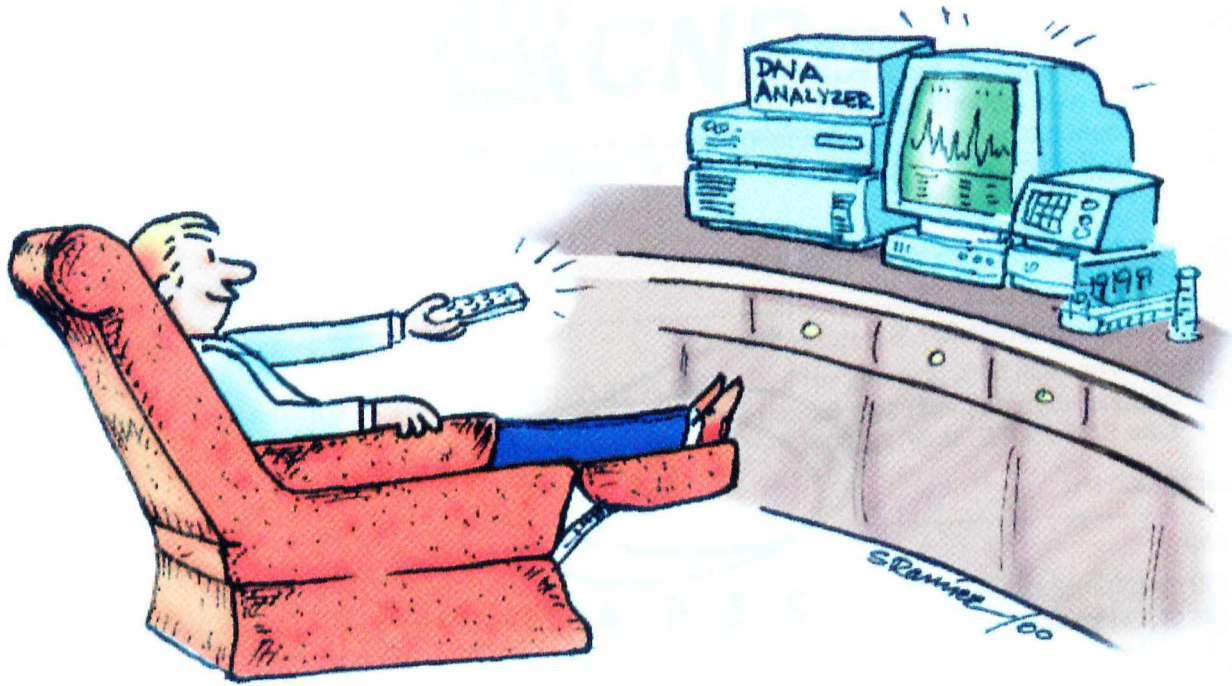
Ao professor Foued que sempre me atendeu prontamente quando solicitado, pelos anticorpos fornecidos e pela ajuda ao longo do mestrado.

À dona Maura pela assistência, amizade e conselhos durante todo mestrado.

Aos professores do Instituto de Genética e Bioquímica, especial aos que se dedicaram a fornecer seus conhecimentos aos alunos em forma de disciplina: Amélia Hamaguchi, Maria Inês Brandeburgo, Foued Salmen Espíndola, Nilson Penha, Ana Maria Bonneti, Malcom Brandeburgo, Luiz Ricardo.

Aos amigos que não consigo esquecer: Flávia, Luciana, Leonardo, Jean, Tiago, Luiz, Sybelli, Lourenço, Lilian, Dinho, e a todos que aqui esqueço de colocar o nome, mas que em meu coração vivem para sempre.

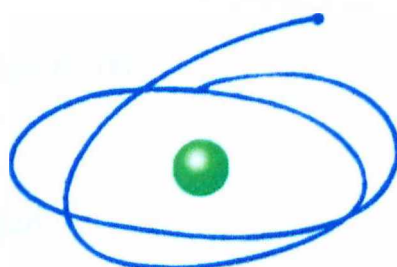
HUMOR?!



ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO COM O APOIO DAS SEGUINTE
INSTITUIÇÕES:



*Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico*



C A P E S



FAPEMIG

Fundação de Amparo à Pesquisa do
Estado de Minas Gerais

ÍNDICE

1. RESUMO GERAL	1.
2. INTRODUÇÃO GERAL	3.
1. Citoesqueleto e Motores Moleculares	4.
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12.
4. CAPÍTULO 1	16.
Precipitação de miosina V de citosol de cérebro de rato por congelamento	
1. Introdução	17.
2. Material e Métodos	18.
2.1 Determinação de Atividade ATPásica	18.
2.2 Dosagem de proteínas	18.
2.3 Análise em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS - PAGE) e Western Blotting	19.
3. RESULTADOS	19.
3.1 Tratamento de P2 com Triton X-100	27.
4. Discussão	31.
5. Resumo	34.
6. Abstract	34.
7. Referências Bibliográficas	35.
5. CAPÍTULO 2	38.
Caracterização parcial de miosina obtida por congelamento de citosol de cérebro de rato	
1. Introdução	39.
2. Material e Métodos	40.
2.1 Determinação de atividade ATPásica	40.
2.2 Dosagem de Proteínas	41.
2.3 Análise em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS - PAGE) e Western Blotting	41.
2.4 Ensaio de digestão proteolítica com tripsina	41.
2.5 Obtenção de miosina de cérebro de rato	41.
3. Resultados	42.
3.1 Atividade Mg^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ATPásica de P3	42.
3.2 Efeito de Ca^{2+} e Calmodulina na atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3	42.
3.3 Atividade K^+ -EDTA-ATPásica de P3	44.
3.4 Efeito de fluoreto de alumínio sobre a atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3	44.
3.5 Efeito de vanadato de sódio sobre a atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3	45.
3.6 Efeito de azida sobre a atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3	46.
3.7 Atividade enzimática de P3 frente a outros substratos	47.
3.8 Efeito de cátions divalentes na atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3	48.
3.9 Ensaio de digestão proteolítica de P3	50.
3.10 Estabilidade da atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3 quanto ao tempo	51.
4. Discussão	52.
5. Resumo	54.
6. Abstract	54.
7. Referencias Bibliográficas	55.

6.CONCLUSÃO GERAL 58.

7.ANEXOS 60.

Anexo 1 - Determinação de Atividade ATPásica 61.

Anexo 2 - Dosagem de proteínas 62.

Anexo 3 - SDS-PAGE / Western Blotting 63.

Anexo 4 - Determinação da Massa molecular de Polipeptídeos 65.

Anexo 4 - Ensaio de digestão proteolítica com Tripsina 66.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: Três diferentes tipos de proteínas que compõem o citoesqueleto.

Figura 2: Esquema estrutural da cinesina citoplasmática.

Figura 3: (a) Micrografia eletrônica de uma secção transversal de cílio. (b) Esquema estrutural de um axonema.

Figura 4: Representação esquemática da dineína citoplasmática e complexo com dinactina.

Figura 5: Estrutura esquemática das moléculas de miosina I, II e V. Os domínios motores

Figura 6: Modelo da estrutura de uma miosina V.

CAPÍTULO 1

Fluxograma 1: Preparação da fração ATPásica.

Figura 1: Atividade Mg^{2+} -ATPásica do sobrenadante 45000xg 40 minutos obtido de cérebro fresco ou congelado.

Figura 2: Atividade Mg^{2+} -ATPásica de S1 antes e após congelamento.

Figura 3: SDS-PAGE da fração S1 antes e após congelamento.

Figura 4: Atividade Mg^{2+} -ATPásica de S1 e S2.

Tabela I: Purificação da ATPase.

Figura 5: SDS-PAGE da preparação da fração ATPásica.

Figura 6: Immunoblotting de S1 e P3.

Figura 7: Tratamento de P2 com Triton X-100.

Figura 8: Atividade Mg^{2+} -ATPásica da fração P3 obtida com e sem Triton X-100.

Figura 9: Efeito da diálise da fração S3 em sua atividade Mg^{2+} -ATPásica.

Figura 10: Efeito de Triton X-100 sobre a atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3.

Figura 11: Comparação da atividade específica das frações P2 e P3 preparadas a partir de cérebros frescos e congelados.

CAPÍTULO 2

Figura 1: Atividade Mg^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ATPásica de P3.

Figura 2: Efeito de Ca^{2+} e Calmodulina na atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3.

Figura 3: Atividade K^+ -EDTA-ATPásica de P3.

Figura 4: Efeito de Fluoreto de Alumínio sobre a atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3.

Figura 5: Efeito de Vanadato de sódio sobre a atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3.

Figura 6: Efeito de Azida sobre a atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3.

Figura 7: Atividade enzimática de P3 frente a outros substratos.

Figura 8: Efeito de nucleotídeos e PPI na atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3.

Figura 9: Efeito de cátions divalentes na atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3.

Figura 10: Efeito da concentração de Fe^{2+} na atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3.

Figura 11: Efeito de tripsina na atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3.

Figura 12: SDS-PAGE do ensaio de digestão proteolítica de P3.

Figura 13: Estabilidade da atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3.

ANEXOS

Figura 1: Curva padrão de fosfato (Pi).

Figura 2: Curva padrão de proteína (BSA).

Figura 3: Curva padrão de determinação de peso molecular.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAM – Solução composta por Acetona, Ácido Sulfúrico e Molibdato de amônio
- ADP – Adenosina 5'-difosfato
- ADP_{2,5,3,5} – Adenosina 2',5'-3',5'-difosfato
- AMP – Adenosina 5'-monofosfato
- AMP-PNP – 5'-adenililimidodifosfato
- ATP – Adenosina 5'-trifosfato
- ATPase – Adenosina trifosfatase
- BSA – Soro Albumina Bovino
- CaM – Calmodulina
- CTP – Citosina 5'-trifosfato
- DTT – Ditioneitol
- EDTA – Ácido etileno diamino tetra acético
- EGTA – Etileno glicol-bis(β-aminoetil éter)
- EM – Microscopia eletrônica
- GTP – Guanosina 5'-trifosfato
- KHC – *Kinesin Heavy Chain* (Cadeia pesada de cinesina)
- KLC – *Kinesin Light Chain* (Cadeia leve de cinesina)
- MAP – *Microtubule Associated Protein* (Proteína associada a microtúbulos)
- Pi – Ortofosfato Inorgânico
- PPi – Pirofosfato
- SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
- SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
- TTP – Timina 5'-trifosfato

1. RESUMO GERAL

Recentemente obtivemos uma fração enriquecida em atividade Mg^{2+} -ATPásica a partir de citosol congelado de cérebro de rato. Nosso objetivo neste trabalho foi analisar esta ATPase e caracterizá-la. Nossos procedimentos foram extração de cérebro de rato, homogeneização imediata em tampão Imidazol-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM; DTT 1,0 mM e inibidores de proteases (Aprotinina 1% e Benzamidina 1 mM), centrifugação a $45000\times g$ por 40 minutos a $4\text{ }^{\circ}C$ e congelamento da fração solúvel a $-20\text{ }^{\circ}C$. Após um mínimo de 48 horas descongelou-se essa fração e seguiu-se uma nova centrifugação a $45000\times g$ por 40 minutos a $4\text{ }^{\circ}C$. Ressuspendeu-se a fração precipitada e realizou-se uma nova centrifugação, sob as mesmas condições supracitadas. A fração precipitada é enriquecida em atividade Mg^{2+} -ATPásica e análise em SDS-PAGE mostrou três principais polipeptídeos, um com alta massa molecular similar a cadeia pesada de miosina e outros dois com massa molecular correspondente a 57 e 45 kDa. O polipeptídeo de alta massa molecular foi marcado com anticorpo específico para miosina V. O polipeptídeo de 57 kDa foi solubilizado com Triton X-100 0,2%, encontrando-se no precipitado os polipeptídeos de alta massa molecular e o polipeptídeo de 45 kDa. A atividade Mg^{2+} -ATPásica desse precipitado é três vezes menor que o precipitado obtido sem triton X-100. Nossa fração não mostrou estimulação da atividade Mg^{2+} -ATPásica por Ca^{2+} e Calmodulina, tendo apenas uma baixa atividade K^+ /EDTA-ATPásica, quando comparada com a atividade Mg^{2+} -ATPásica. A atividade Ca^{2+} -ATPásica foi cerca de 80% da atividade Mg^{2+} -ATPásica. Também não ocorreu alteração da atividade Mg^{2+} -ATPásica por cloreto de alumínio, fluoreto de sódio ou fluoreto de alumínio. Vanadato (50, 200 e 1000 μM) ou azida (1 mM) também não inibiu essa atividade. Essa fração apresentou preferência de hidrólise para ATP, entretanto hidrolisou também ADP (40%) e GTP (60%), mas não AMP, AMP-PNP, PP_i , $ADP^{2,5,3,5}$. AMP-PNP inibiu a atividade Mg^{2+} -ATPásica. A atividade Mg^{2+} -ATPásica foi inibida cerca de 50% por Fe^{2+} numa concentração menor que 1 mM, mas não pelos cátions cobre, cobalto ou zinco. A digestão protéica por tripsina causou uma perda da atividade e uma degradação do polipeptídeo de alta massa molecular, mantendo intacto o polipeptídeo de 45 kDa em nossa fração. Nesse trabalho descrevemos um método simples para obter miosina V a partir de uma fração solúvel de cérebro de rato, no entanto não foi estimulada por Ca^{2+} /Calmodulina e não expressou atividade K^+ /EDTA-ATPásica.

2. INTRODUÇÃO GERAL

2.1 CITOESQUELETO E MOTORES MOLECULARES

As ATPases são enzimas que hidrolisam ATP em ADP e ortofosfato (P_i), utilizando a energia liberada para processos metabólicos, transporte de íons, movimento e transporte intracelular (KOMOSZYNSKI & WOJTCZAK, 1996). As ATPases responsáveis pela motilidade celular são conhecidas como motores moleculares. Um exemplo pode ser dado a partir dos neurônios, células especializadas em propagação do impulso nervoso, formadas pelo corpo celular, dendritos e um longo axônio. A falta de maquinaria para síntese de proteínas no axônio, e também toda a proteína requerida no terminal sináptico precisa ser transportado através do axônio depois de terem sido sintetizadas no corpo celular. Este transporte é uma das funções dos motores moleculares, que se encarregam de levar vesículas cheias de proteínas até o terminal sináptico, através de trilhos, que chamamos de citoesqueleto (HIROKAWA, 1998).

O citoesqueleto está presente em todo o interior da célula, formando uma rede tridimensional de proteínas filamentosas visíveis ao microscópio eletrônico. Este citoesqueleto é dividido em três classes de filamentos: os microtúbulos (formados por α e β -tubulina), os filamentos de actina e os filamentos intermediários (figura 1). Estes diferem entre si em espessura, composição e função, mas são responsáveis basicamente pela estrutura e organização do citoplasma e da célula em si (FAWCETT & JENSH, 1998). Os microtúbulos e os filamentos de actina dão suporte para o movimento de organelas ou do conteúdo celular (HURTLEY, 1998).

A actina globular em alto número se une entre si em longos polímeros em forma de hélice, na presença de ATP, com 6-7 nm de diâmetro, sendo chamada então de actina filamentar ou filamentos de actina. A actina filamentar por sua vez se liga a uma família específica de proteínas, chamadas miosinas, que são motores moleculares que convertem a energia química da quebra do ATP em trabalho mecânico, aproveitado para modificação estrutural da mesma, que faz com que esta se mova ao longo dos filamentos de actina (HALL, 1998).

Os microtúbulos, como os filamentos de actina, também se formam a partir de unidades monoméricas, de forma regulada, formando porém estruturas um pouco mais complexas. Heterodímeros de α e β -tubulina formam o microtúbulo, que tem cerca de 22nm de diâmetro. Essa ação de polimerização é seguida por uma ação de despolimerização, em ambas extremidades, sendo que em uma delas prevalece a polimerização e em outra a despolimerização, sendo a primeira denominada como extremidade mais (+), e a outra como extremidade menos (-). É importante lembrar que essas ações são contínuas. Duas classes de motores moleculares estão relacionadas com os microtúbulos, sendo elas as cinesinas e dineínas, que também utilizam a energia do ATP para se moverem ao longo dos microtúbulos (HIROKAWA, 1998).

Os filamentos intermediários compreendem uma família de estruturas com dimensões intermediárias entre actina e microtúbulos (8-10 nm de diâmetro). Diversos tipos de unidades monoméricas formam os filamentos intermediários, cuja função principal é dar suporte mecânico à célula, e posição a suas organelas. Um exemplo é a vimentina, subunidade monomérica de um filamento intermediário presente em células endoteliais que circundam vasos sanguíneos e em adipócitos, apresentando, portanto forte estrutura mecânica (FUCHS & CLEVELAND, 1998).

As cinesinas foram encontradas primeiramente em estudos de microscopia eletrônica (EM), que indicaram a presença de estruturas curtas que agiam como pontes estruturais entre organelas e microtúbulos. Ensaios de motilidade e análises bioquímicas destas estruturas revelaram a presença de uma proteína motora direcionada a extremidade + dos microtúbulos, uma adenosina trifosfatase (ATPase) de 380 kDa regulada por microtúbulos (HIROKAWA, 1982; BRADY & LASEK, 1982; VALE et al, 1985).

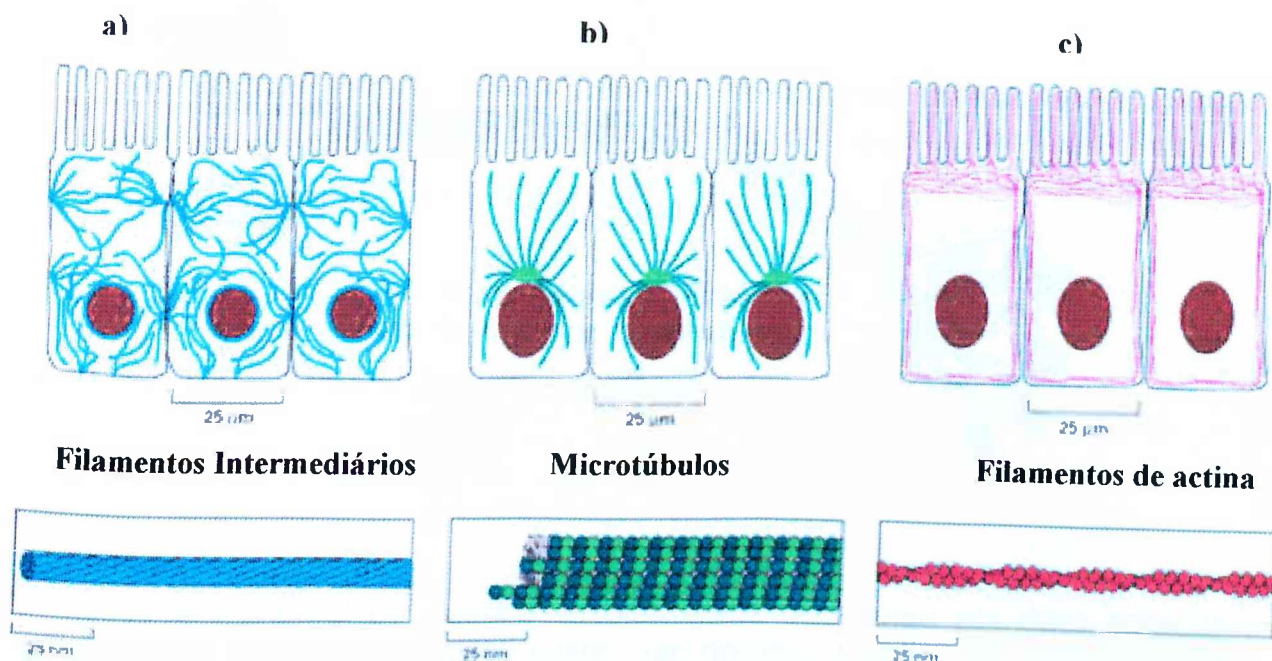


FIGURA 1: TRÊS DIFERENTES TIPOS DE PROTEÍNAS QUE COMPÕEM O CITOESQUELETO.

As fotos superiores mostram células epiteliais fotografadas após tratamento com anticorpos que se ligam e coram especificamente. As fotos inferiores mostram cada tipo de filamento visualizado por transmissão (a, b) ou varredura (c). (a) filamentos de actina agregados para formar "stress fibers", (b) microtúbulos radiando do centro celular, (c) filamentos intermediários através de todo citoplasma (<http://www.terravista.pt/bilene/5547/biologia/Celula/Citoes13.htm>).

A estrutura da primeira cinesina identificada é composta de duas cabeças globulares (10nm de diâmetro), uma haste, e uma extremidade em forma de ventilador, possuindo um comprimento total de 80nm (figura 2). As cabeças globulares, e a haste, são chamadas de KHCs (**K**inesin **H**eavy **C**hains), enquanto que a cauda em forma de ventilador de KLCs (**K**inesin **L**ight **C**hains). A cabeça é a região de interação com os microtúbulos, ou domínio motor (HIROKAWA, 1989; SCHOLEY et al, 1989). As principais funções desempenhadas pelas cinesinas constituem transporte de vesículas ao longo de microtúbulos e a segregação de cromossomos na mitose (MANDELKOW & HOEGER, 1999).

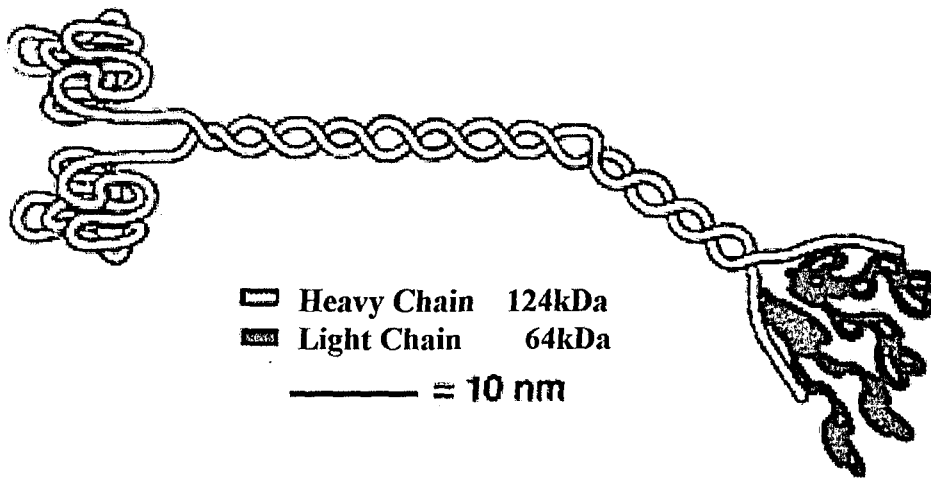


FIGURA 2

Esquema estrutural da cinesina citoplasmática, constituído por duas cabeças globulares (domínio cabeça ou motor), um domínio pescoço (ou haste), e dois domínios cauda. (<http://www.blocks.fhcrc.org/~kinesin/KinesinStructure.html>)

Diversas subclasses de cinesinas foram formadas com base nas diferenças de direcionalidade, posição do domínio motor (próximo ao domínio aminoterminal, ao carboxiterminal ou intermediário) e pela composição das subunidades (monômeros, homodímeros, heterodímeros, heterotrímeros, e assim por diante). No entanto a maioria das cinesinas tem um domínio pescoço em α -hélice que atua como um transdutor de força, e um domínio cauda que liga as cadeias leves e conecta o complexo a carga a ser transportada (MANDELKOW & HOEGER, 1999).

A dineína axonemal foi primeiramente descoberta como uma ATPase que tem um papel essencial no batimento de cílios e flagelos. São na verdade ATPases que executam o movimento de deslizamento entre microtúbulos que são fundamentais para a motilidade ciliar e flagelar (GIBBONS & ROWE, 1965). Nove microtúbulos duplos externos suportam os braços da dineína que são presos em um anel por ligações entre os pares de ligações chamados nexina. Na maioria dos casos este anel está ao redor de um núcleo de dois microtúbulos formando a estrutura axonemal conhecida de 9 + 2 (figura 3).

A classe das dineínas citoplasmáticas foi descoberta em 1987. Esta dineína possui duas cadeias pesadas de 530 kDa, três cadeias intermediárias de 74 kDa cada, e quatro cadeias intermediárias leves de 50 a 60 kDa cada (figura

4), movendo-se ao longo de microtúbulos da extremidade + para a -, sendo assim chamado de motor para transporte axonal retrógrado (PASCHAL et al 1987; LYE et al, 1987; SCHNAPP & REESE, 1989).

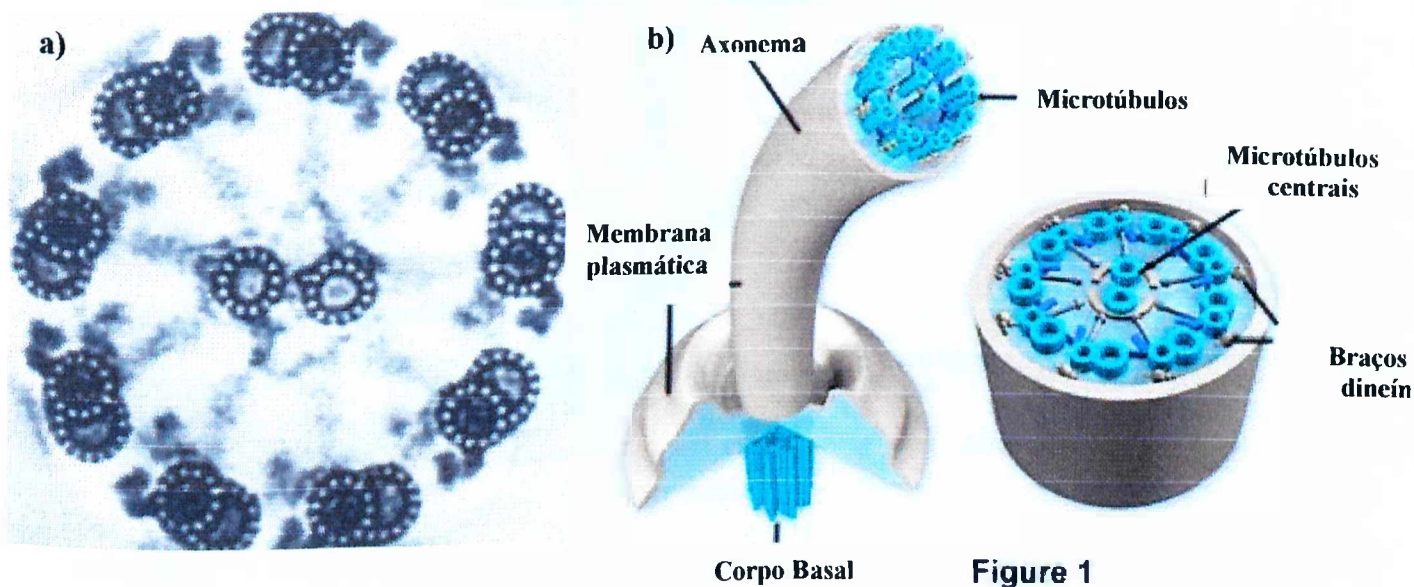


FIGURA 3

(a) Micrografia eletrônica de uma seção transversal de cílio. Note que pode ser visto os braços de dineína e as ligações de nexina. (b) Esquema da estrutura de um axonema. (a - <http://anatomy.utmb.edu/cellbio/Cilia.htm> | b - <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/animals/ciliaflagella.html>)

A dineína é um largo complexo de subunidades consistindo de no mínimo sete polipeptídeos distintos variando em tamanho de 22 a 150 kDa (HOLLERAN et al, 1998). Esta foi primeiramente demonstrada ser requerida para transporte *in vitro* mediado por dineína, e apenas agora acredita-se que ela é requerida para a maioria, ou todas atividades celulares mediadas por dineína citoplasmática.

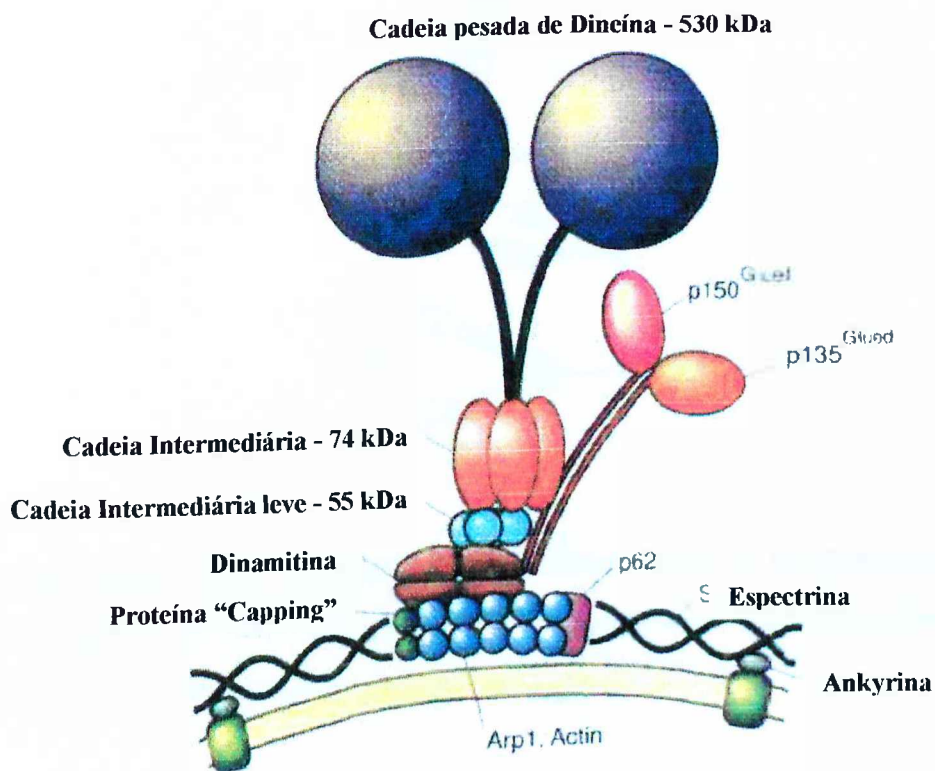


FIGURA 4

Representação esquemática da dineína citoplasmática e complexo com dinactina. A dineína citoplasmática está ligada com cargas membranas indiretamente através de interações com receptores de membrana, "ankyrin", "spectrin", filamento Arp-1-actina, dinactina, p150. (HIROKAWA, 1998).

As miosinas constituem uma enorme classe de proteínas responsáveis por funções dependentes do citoesqueleto de actina, como por exemplo citocinese, tráfego intracelular e produção de extensões citoplasmáticas requeridas para movimento. As miosinas foram descobertas como uma única proteína de músculo, porém estudos genéticos e de biologia molecular tem revelado uma diversa família de miosinas que possuem um domínio motor comum (figura 5). As miosinas do tipo II foram definidas como convencionais (miosina de classe II), enquanto que os outros tipos são coletivamente referidos como miosinas não-convencionais (TITUS, 1997). Todas as classes identificadas são empiricamente definidas com base na comparação da seqüência de seus domínios motores, mas nada é conhecido sobre as propriedades mecanoquímicas da maioria destas miosinas (MERMALL et al, 1998).

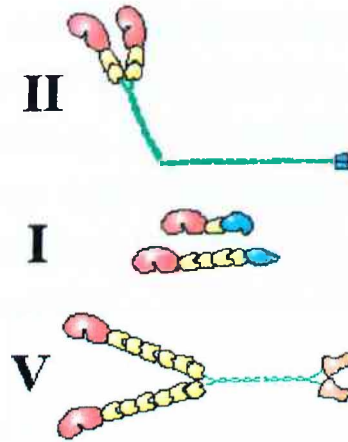


FIGURA 5

Estrutura esquemática das moléculas de miosina I, II e V. Os domínios motores são mostrados em vermelho, as cadeias leves em amarelo e as α -helices (coiled coil) em verde. (<http://motility.york.ac.uk/chimaera.sht> mL)

As miosinas estão atualmente divididas em 18 classes, tendo apenas a seqüência primária que corresponde ao domínio cabeça altamente conservada (THOMPSON & LANGFORD, 2002). Todas miosinas conhecidas têm no domínio motor, uma ou mais cópias de uma seqüência consenso chamada "IQ-motif", que tem o padrão $IqxxxRGxxxRxxY$ e é um sítio potencial para a ligação de calmodulina e/ou cadeias leves de miosina específicas, que geralmente são pequenas, ácidas e membros da família de proteínas ligantes de Ca^{2+} (LARSON, 1996). A dimerização, como no caso das miosinas convencionais, é dependente da propriedade que alguns domínios cauda possuem em formar uma estrutura coiled-coil.

As miosinas de classe I são altamente conservadas e possuem um domínio SH3 (Src homology domain 3), que interage com proteínas sinalizadoras e com a montagem de actina (EVANGELISTA et al, 2000).

Nas miosinas de classe V o domínio cabeça ou domínio motor contém os sítios para ligação de ATP e actina, localizados na região N-terminal da molécula. A região do pescoço possui 6 "IQ-motifs", cada qual é um potencial sítio para ligação de uma cadeia leve (LARSON, 1996). Dados bioquímicos têm mostrado

que na ausência de Ca^{2+} , calmodulina co-purifica (LARSON et al, 1992) e co-
 imunoprecipita (BROCKERHOFF et al, 1994) com miosina V. A região da cauda
 também possui uma estrutura em "coiled-coil", intercalada com regiões
 globulares. A primeira destas regiões globulares contém uma seqüência PEST
 (uma seqüência rica em resíduos P, E, S e T) que é associada com alvos
 protéicos de proteólise por calpaína.

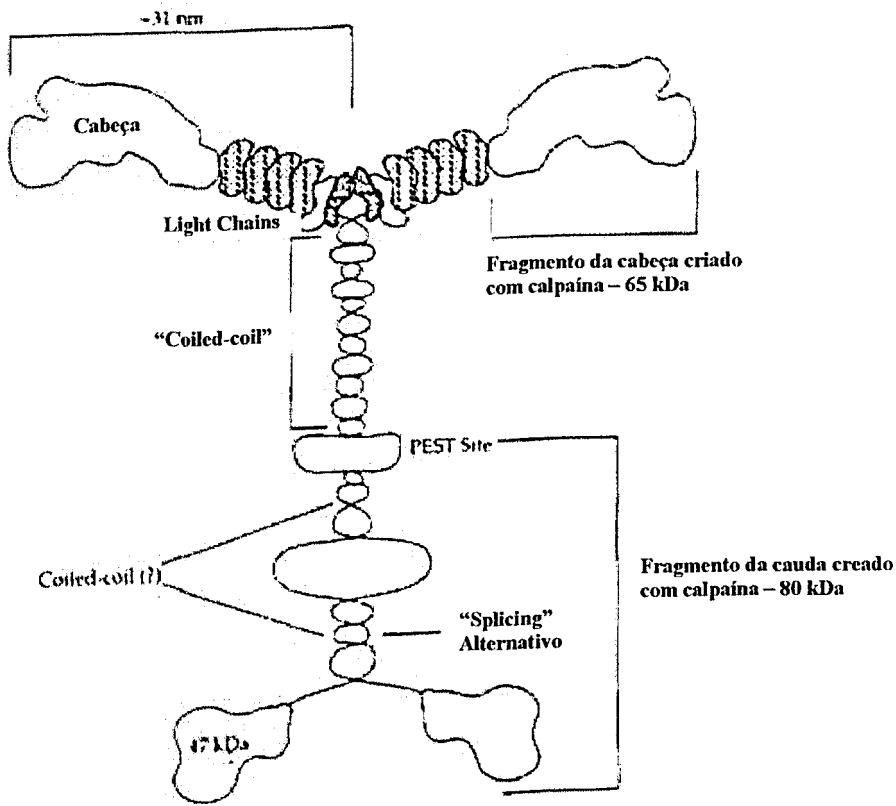


FIGURA 6

Modelo da estrutura de uma miosina V com seis cadeias leves ligadas ao domínio
 pescoço do lado de cada cadeia pesada.

http://www.bio.umass.edu/vidali/web/cell_motil/myosin_v_1.jpg

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADY, S.T. & LASEK, R.J. – Axonal transport: a cell-biological method for studying proteins that associate with the cytoskeleton. **Methods Cell Biol.** 25, p. 365-398. 1982.
- 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.** 124, p. 315-323. 1994.
- COELHO, M.V. & LARSON, R.E. – Ca²⁺-dependent phosphorylation of the tail domain of myosin-V, a calmodulin-binding myosin in vertebrate brain. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 26, p. 465-472. 1993.
- ESPINDOLA, F.S.; ESPREAFICO, E.M.; COELHO, M.V.; MARTINS, A.R.; COSTA, F.R.C.; MOOSEKER, M.S. & LARSON R.E. – Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: A novel calmodulin-binding myosin. **The journal of cell biology.** 118, p. 359-368. 1992.
- EVANGELISTA, M.; KLEBL, B.M.; TONG, A.H.; WEBB, B.A.; LEEUW, T.; LEBERER, E.; WHITEWAY, M.; THOMAS, D.Y.; BOONE, C.; – A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex. **J. Cell Biol.** 148, p. 353-362. 2000.
- FUCHS, E. & CLEVELAND, D. W. – A Structural Scaffolding of Intermediate Filaments in Health and Disease. **Science.** 279, p. 514-519. 1998.
- GIBBONS, I. R. & ROWE, A. – Dynein: a protein with adenosinetriphosphatase activity from cilia. **Science.** 149, p. 423. 1965.
- HALL, A. – Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. **Science.** 279, p. 509-514. 1998.
- HIROKAWA, N. – Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method. **J. Cell Biol.** 94, p. 129-142. 1982.
- HIROKAWA, N., PFISTER K.K., YORIFUJI H., WAGNER M.C., BRADY S.T., BLOOM G.S. – Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. **Cell** 56, p. 867-878. 1989.

- HIROKAWA, N. – Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. **Science** 279, p. 519-526. 1998.
- HOLLERAN, E. A.; KARKI, S.; HOLZBAUR, E. L. F. – The role of dynactin complex in intracellular motility. **Int. Ver. Cytol.** 182, p. 69-109. 1998.
- HURTLEY, S. M. – Cell Biology of the Cytoskeleton. **Science.** 279, p. 459. 1998.
- KOMOSZYNSKI, M. & WOJTCZAK, A. – Apyrases (ATP diphosphohydrolases, E.C. 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. **Biochim. Biophys. Acta** 1310, p. 233-241. 1996.
- LARSON R.E. – Myosin-V: a class of unconventional molecular motors. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29, p. 309-318. 1996.
- LYE, J.; PORTER, M. E.; SCHOLEY, J. M.; MCINTOSH, J. R. – Identification of a microtubule-based cytoplasmic motor in the nematode *C. elegans*. **Cell** 51, p. 309. 1987.
- MANDELKOW, E. & HOEGER, A. – Structures of kinesin and kinesin-microtubule interactions. **Current opinion in cell biology** 11, p. 34-44. 1999.
- MERMALL, V.; POST, P. L.; MOOSEKER, M. S. – Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. **Science**, 279, p.527-533. 1998.
- NELSON, D. L. & COX, M. M. – Lehninger principles of biochemistry. 3^a ed.. Ed. Worth Publishers. 2000.
- PASCHAL, B. M.; SHPETNER, H. S.; VALLEE, R. B. – Retrograde transport by the microtubule associated protein MAP-1C. **J. Cell. Biol.** 105, p. 1273. 1987.
- SCHOLEY, J. M.; HEUSER, J.; YANG, J. T.; GOLDSTEIN, L. S. B. – Identification of globular mechanochemical heads of kinesin. **Nature** 338:6213, p. 355-357. 1989.
- SCHNAPP, B. J. & REESE, T. S. – Dynein is the motor for retrograde axonal transport of organelles. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 86:5, p. 1548. 1989.
- STRYER, L. – Bioquímica. 4^a Ed.. Ed. Guanabara Koogan S.A. 1995.
- THOMPSON R.F. & LANGFORD G.M. – Myosin superfamily evolutionary history. **Anat. Rec.**, 268, p. 276-289. 2002.
- TITUS, M. A. – Motor proteins: myosin V – the multi-purpose transport motor. **Current Biology**, 7, p. 301-304. 1997.

VALE R.D., REESE T.S., SHEETZ M.P. – Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. **Cell.** 42:1, p. 39-50. 1985.

4. CAPÍTULO 1:

PRECIPITAÇÃO DE MIOSINA V DE CITOSOL DE CÉREBRO DE RATO POR CONGELAMENTO

1. INTRODUÇÃO

São definidas como ATPases as enzimas que catalisam a quebra de ATP em ADP e Pi (KOMOSZYNSKI & WOJTCZAK, 1996). As ATPases podem ser divididas em duas classes, as ATPases de membrana e as ATPases solúveis. Dentre as ATPases de membrana temos as transportadoras de íons como as Ca^{2+} -ATPases que estão envolvidas na regulação da concentração de Ca^{2+} intracelular e são constituídas por uma única cadeia polipeptídica de 134 kDa com sítio de ligação à calmodulina (CARAFOLI, 1997), e as Na^+/K^+ -ATPases que são responsáveis pelo transporte ativo de sódio e potássio pela membrana e constituídas por subunidades α de 113 kDa e β de 35 kDa, ou 54 kDa quando glicosiladas (LINGREL & KUNTZWEILER, 1994). A ATPase F_1F_0 -ATPase, que sintetiza ATP na fosforilação oxidativa, quebra ATP em situações *in vitro* onde as subunidades estão separadas (WEBER & SENIOR, 1997). As ATPases solúveis compreendem algumas ecto-ATPases que podem quebrar tanto nucleotídeos tri como difosfato (PLESNER, 1995), e os chamados motores moleculares, que utilizam a energia da quebra do ATP para trabalho mecânico.

Dentre os motores moleculares destacamos a família das miosinas que constituem proteínas motoras dependentes do citoesqueleto de actina. Descobertas como uma proteína motora de músculo, sabemos hoje que das 18 classes de miosina identificadas 3 já foram isoladas de cérebro e caracterizadas, sendo elas as miosinas de classe I, II e V. As miosinas do tipo I são constituídas por uma cadeia pesada única de 110-140 kDa (CONZELMAN & MOOSEKER, 1987), as do tipo II possuem 240 kDa (MARUTA e KORN, 1977), e as do tipo V tem a cadeia pesada de 190 kDa ligante de calmodulina (LARSON et al 1988).

Recentemente em nosso laboratório obtivemos uma fração enriquecida em atividade Mg^{2+} -ATPásica que tinha como principais polipeptídeos um de 160 kDa e um de 54 kDa. PINHEIRO (2001) homogeneizava cérebros, previamente congelados em freezer -80°C , em tampão contendo inibidores de proteases usando potter de vidro. Em seguida centrifugava o homogeneizado a 50000g por 40 minutos, descartando o precipitado e aplicando o sobrenadante em coluna de SP-Sepharose. Após fracionamento do "flow trough" com sulfato de amônio, a

fração solúvel era aplicada em coluna de Q-Sepharose. Este procedimento inicial nos dava uma fração ATPásica no "Flow trough" da última coluna, indicando que a mesma não se ligava a resinas catiônicas e aniônicas.

Uma vez que o congelamento dos cérebros causa a formação de cristais de gelo que rompem os lisossomos liberando proteases (DIGNAM, 1990), alteramos nosso protocolo, no intuito de minimizar a degradação protéica de nosso material por proteases, homogeneizando os cérebros frescos, logo após a extração dos mesmos, centrifugando a 45000g por 40 minutos e congelando a fração solúvel em freezer -20°C. Este trabalho teve como objetivo isolar ATPases a partir da fração solúvel 45.000xg (40 minutos) congelada obtida de cérebros frescos de rato e comparar com a ATPase isolada por PINHEIRO (2001) e com outras ATPases descritas na literatura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ATPÁSICA

A atividade ATPásica foi determinada pela quantificação do fosfato inorgânico (Pi) liberado pela hidrólise de ATP, usando o método colorimétrico de HEINONEN & LAHTTI (1981). Os ensaios foram feitos a 37°C em duplicatas com volume final de 200 µL, e quantificado no comprimento de onda de 355 nm. O meio de reação para atividade Mg²⁺-ATPásica foi: Imidazol HCl 25mM pH 7,5, DTT 1mM, EDTA 1mM, KCl 60mM e MgCl₂ 4mM.

3.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As concentrações de proteínas nas frações de interesse foram determinadas segundo o método descrito por BRADFORD (1976), usando como padrão a albumina de soro bovino (BSA). Alíquotas das respectivas frações foram previamente diluídas para 100 µL com água deionizada e posteriormente,

finalizando com a adição de 3 mL de Reagente de Bradford. As determinações foram realizadas em duplicatas, lendo-se em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

3.3 ANÁLISE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS - PAGE) E WESTERN BLOTTING

O perfil eletroforético de polipeptídeos das frações foi analisado em gel de poliacrilamida 10 e 12% com SDS utilizando o método de tampão descontínuo de LAEMMLI & FAVRE (1973) e o sistema de placas empregado por STUDIER (1973).

O método de imunoblotting baseado no método descrito por TOWBIN et al (1979), com alterações de voltagem e concentrações de reagentes para ajuste às marcas de materiais e equipamentos usados neste trabalho. Os anticorpos primários utilizados foram contra: cabeça de miosina V de cérebro de galinha (400 µg/ mL) e miosina II de plaqueta humana (400 µg/ mL). Ambos estão em diluição de 1:2000. O anticorpo secundário utilizado foi anti-coelho, conjugado com fosfatase alcalina (AP) e em diluição de 1:7500.

3. RESULTADOS

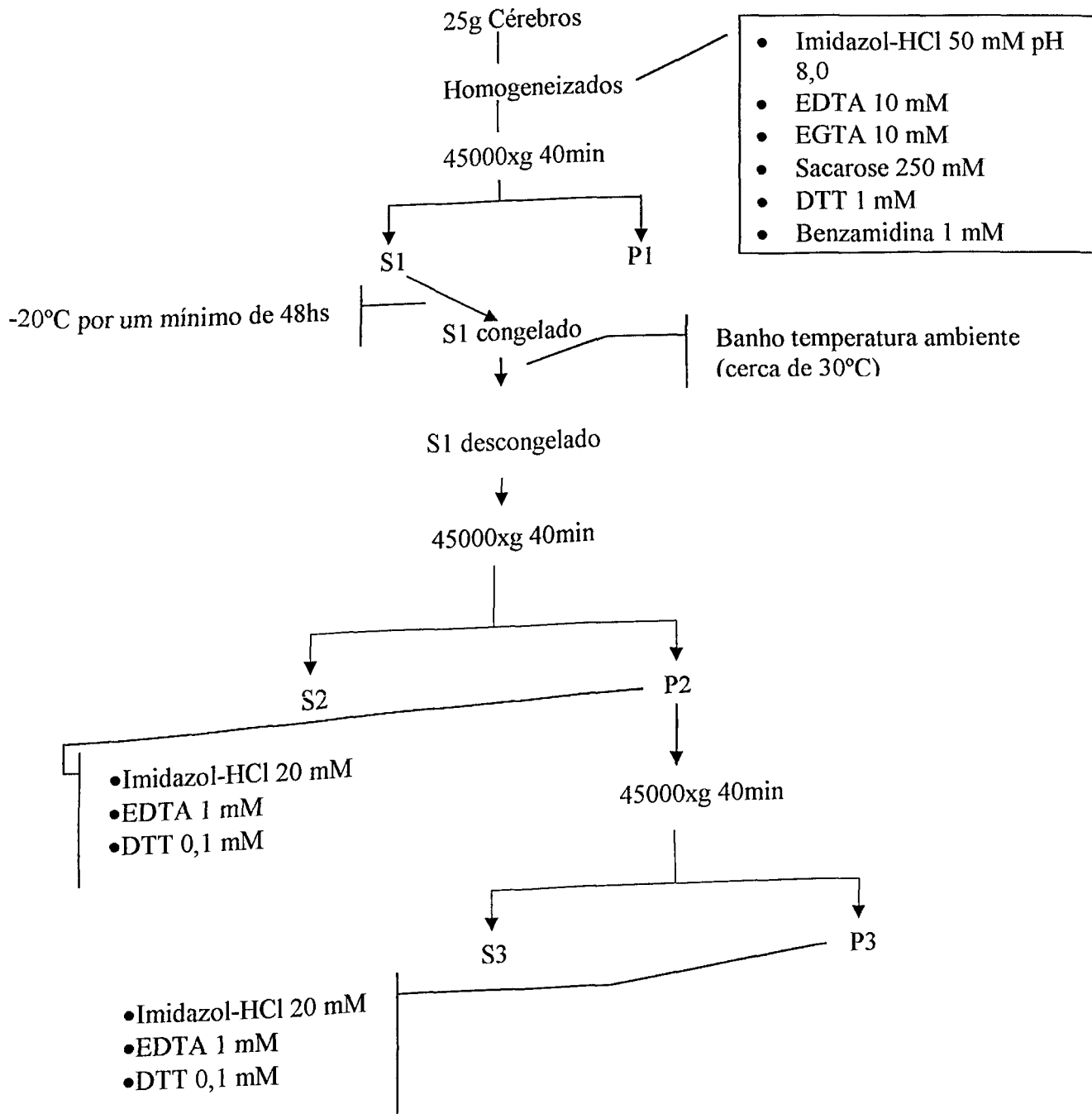
Ratos adultos foram anestesiados com éter comercial e sacrificados por decapitação, sendo seus cérebros extraídos imediatamente, lavados em solução salina gelada e colocados no tampão de homogeneização (Imidazol-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, Sacarose 250 mM, DTT 1 mM, benzamidina 1 mM, aprotinina 1% e calpastatina 1µl/ mL). Cerca de 25g de cérebros foram homogeneizados em 30 mL deste tampão, usando Potter (Pyrex), em gelo a fim de se evitar degradação de proteínas. A fração homogeneizada era centrifugada a

45.000g por 40 minutos (centrífuga Sigma modelo 3K30), sendo a fração solúvel (S1) congelada em freezer a -20°C, e a fração precipitada descartada.

A fração S1 foi descongelada após um mínimo de 48 horas, no momento de começar um novo experimento. Esse descongelamento foi realizado com banho em água na temperatura ambiente (cerca de 10 minutos). Após descongelamento, S1 foi centrifugado a 45.000g por 40 minutos, resultando em duas frações, S2 e P2. A fração P2 foi ressuspensa em tampão I (Imidazol 20 mM, EDTA 1 mM e DTT 0,1 mM) num volume 3 vezes menor que S1, em seguida novamente centrifugado a 45.000g por 40 minutos. Resultando novamente em duas frações, S3 e P3. P3 foi ressuspensa em tampão I no mesmo volume de P2 (fluxograma 1).

Na figura 4 podemos comparar atividade Mg^{2+} -ATPásica específica da fração S1' que era obtida anteriormente com cérebros congelados e da recente fração S1 que era obtida imediatamente após extração dos cérebros. Nota-se que a nova fração S1 apresenta atividade Mg^{2+} -ATPásica específica maior que a fração S1' obtida a partir de cérebros congelados.

Fluxograma 1: Preparação da fração ATPásica



Comparando a fração S1 antes e após congelamento (figura 5), notamos que não há queda aparente da atividade Mg^{2+} -ATPásica de S1 após ser congelado. Analisando o SDS-PAGE de S1 antes e após congelamento também não notamos nenhuma mudança no perfil eletroforético da fração congelada (figura 6). Em seguida centrifugamos S1 para retirar algum material precipitado devido ao congelamento. Assim obtivemos S2 e P2. Na figura 7 podemos comparar a fração S1, e a segunda fração solúvel obtida S2. Quando comparamos as frações S2 e P2, notamos que P2 era altamente enriquecida em atividade Mg^{2+} -ATPásica e com poucas bandas polipeptídicas em SDS-PAGE corado com coomassie blue (figura 8). A Tabela I mostra que S2 possui 10 vezes mais proteína do que P2, mas sua atividade total é apenas cerca de 2 vezes maior que em P2. A fração P2 foi então ressuspensa em tampão e novamente centrifugada, gerando S3 e P3. Na terceira e última centrifugação, aproximadamente 24% da atividade total segue para S3, e os 76% restantes ficam em P3. A fração P3 apresenta purificação da atividade específica de cerca de 20 vezes, e aproximadamente 2,3% da proteína total.

Analisando o SDS-PAGE das frações notamos que em P3 temos, 3 bandas principais: Uma de aproximadamente 205 kDa, outra de 57 kDa e uma outra de 45 kDa (figura 8). Notamos também que a banda de 205 kDa está presente em P3, mas quase não é perceptível em S3, onde a atividade é cerca de 5 vezes menor. Os polipeptídeos de 57 e 45 kDa estão distribuídos entre S3 e P3, indicando não serem estes os responsáveis pela atividade ATPásica. Uma observação importante a ser feita é que o polipeptídeo de 205 kDa tem um Mr similar a da cadeia pesada de miosina II e V e que o polipeptídeo de 45 kDa tem um Mr similar a actina, uma proteína do citoesqueleto que coopurifica com miosinas.

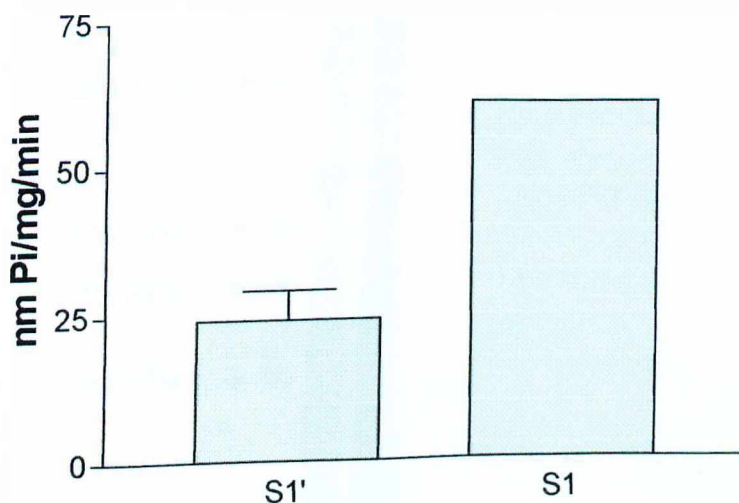


FIGURA 4: Atividade Mg^{2+} -ATPásica do sobrenadante 45000xg 40 minutos obtido de cérebro fresco ou congelado

5 μ L das frações foram incubados a 37°C, por 10 minutos, em meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM, $MgCl_2$ 4 mM). A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. S1' indica a fração obtida a partir de cérebros congelados e S1 a fração obtida a partir de cérebro fresco, ambas obtidas por centrifugação a 45000xg por 40 minutos.

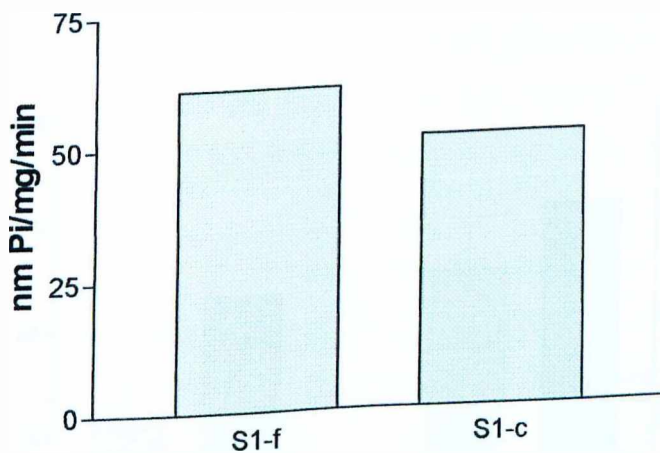


FIGURA 5: Atividade Mg^{2+} -ATPásica de S1 antes e após congelamento

5 μ L das frações foram incubados a 37°C, por 10 minutos, em meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM, $MgCl_2$ 4 mM). A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. S1-f indica a fração S1 antes de congelar e S1-c indica a fração S1 após congelamento.

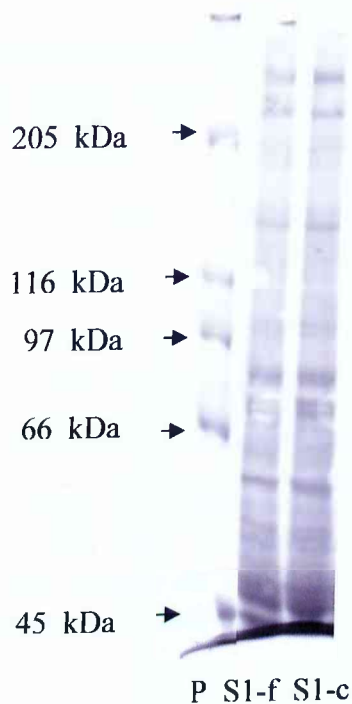


FIGURA 6: SDS-PAGE da fração S1 antes e após congelamento

Foram aplicados em gel 10% aproximadamente 15 µg de S1-f e S1-c. "P" se refere ao padrão SDS-6H SIGMA, S1-f indica a fração S1 fresca, S1-c indica a fração S1 após congelamento, e a esquerda estão indicados as massas moleculares correspondentes (miosina, β-galactosidase, fosforilase b, albumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica respectivamente). O gel foi corado com coomassie blue R-250.

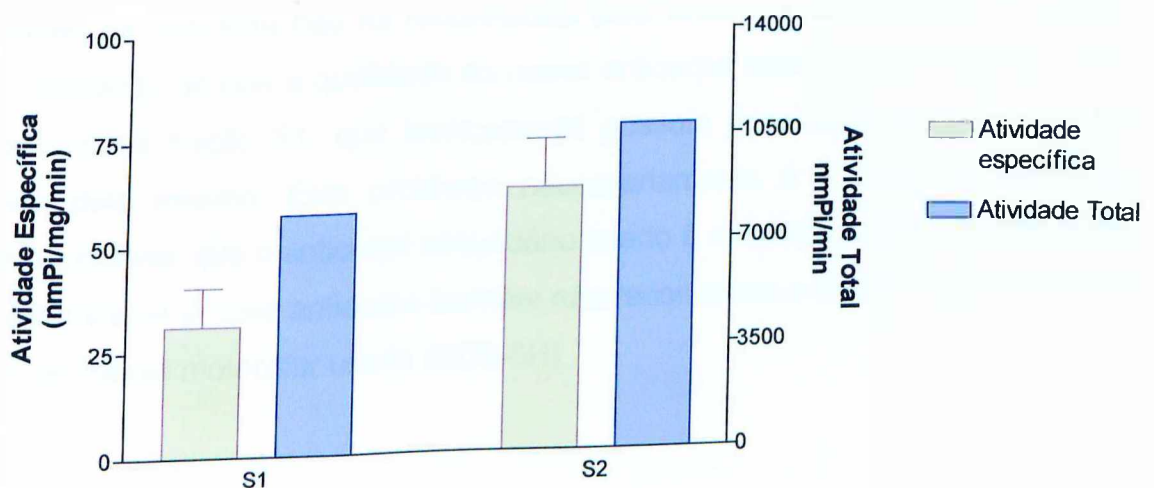


FIGURA 7: Atividade Mg²⁺-ATPásica de S1 e S2

10 µL das frações foram incubados a 37°C, por 10 minutos, em meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM, MgCl₂ 4 mM). A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

TABELA I – Purificação da ATPase

	<i>Proteína total</i>	<i>Ativid. Total</i>	<i>Ativid. Espec.</i>	<i>Rendimento</i>	<i>Purificação</i>
S1	250,90	3487,51	13,90	100,00	1,00
S2	141,79	5276,38	37,21	56,51	2,68
P2	13,85	2242,46	161,87	5,52	11,65
S3	9,76	502,51	51,46	3,89	3,70
P3	5,82	1601,76	275,31	2,32	19,81
	mg	nmPi/min	nmPi/mg/min	%	vezes (x)

20 μ L das frações foram incubados a 37°C, por 10 minutos, em meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM, MgCl₂ 4 mM). A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. Proteínas foram dosadas pelo Método de BRADFORD (1976).

Observando os resultados obtidos com SDS-PAGE e salientando a presença de uma banda com Mr similar a miosina, nosso próximo passo foi analisar a presença desta proteína (miosina II e V) na fração P3, através de “Western Blotting”. Assim, testamos dois anticorpos, anti-miosina V (cabeça) e anti-miosina II.

O ensaio com o anti-miosina V mostrou a marcação de uma banda polipeptídica com Mr similar a da miosina V e algumas bandas inferiores (figura 9). O polipetídeo de 205 kDa não foi reconhecido pelo anticorpo anti-miosina II, porém temos indicação de que a qualidade do nosso anticorpo estava comprometida, uma vez que nossa fração S1, que teoricamente possuía miosina II, também não foi marcada pelo mesmo. Este problema necessariamente é a nível de anticorpo primário, uma vez que o anticorpo secundário usado é o mesmo usado na marcação com anti-miosina V. Este anticorpo também não reconheceu a miosina II presente no padrão de massa molecular usado (SDS-6H).

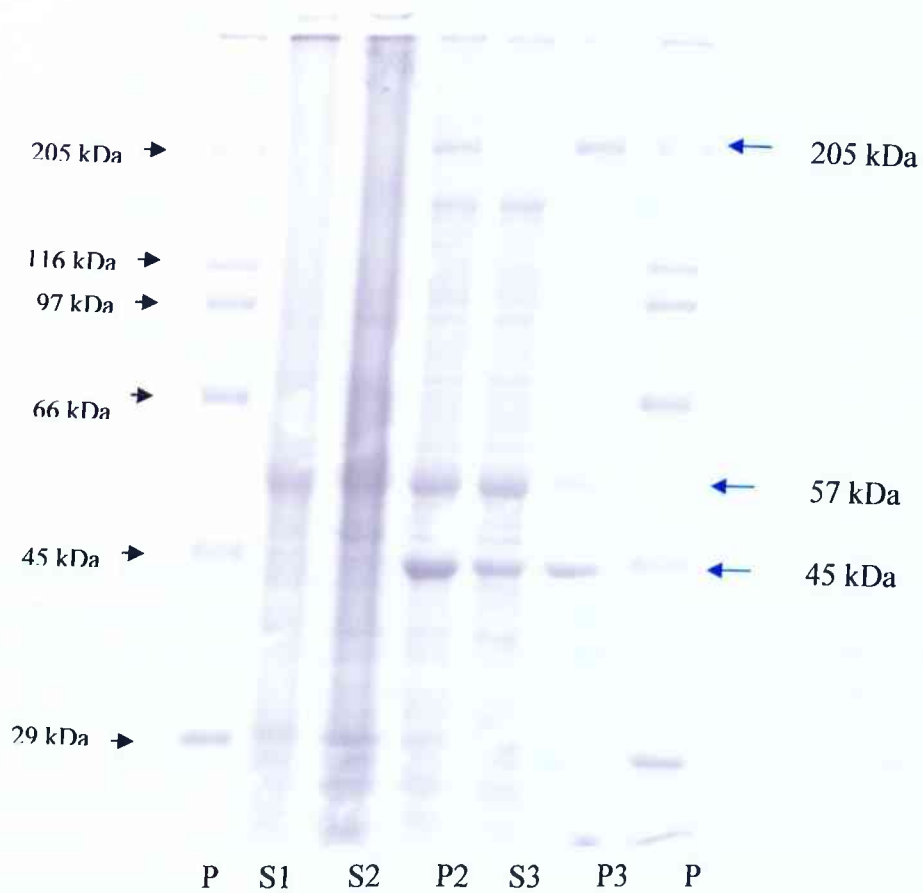


FIGURA 8: SDS-PAGE da preparação da fração ATPásica

Foram aplicados em gel 12% aproximadamente 15 μ g de S1, 17 μ g de S2, 13 μ g de P2, 9 μ g de S3 e 5 μ g de P3. As setas azuis indicam os principais polipeptídios da fração P3. "P" se refere ao padrão SDS-6H SIGMA, e a esquerda estão indicados as massas moleculares correspondentes (miosina, β -galactosidase, fosforilase b, albumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica respectivamente). O gel foi corado com coomassie blue R-250.

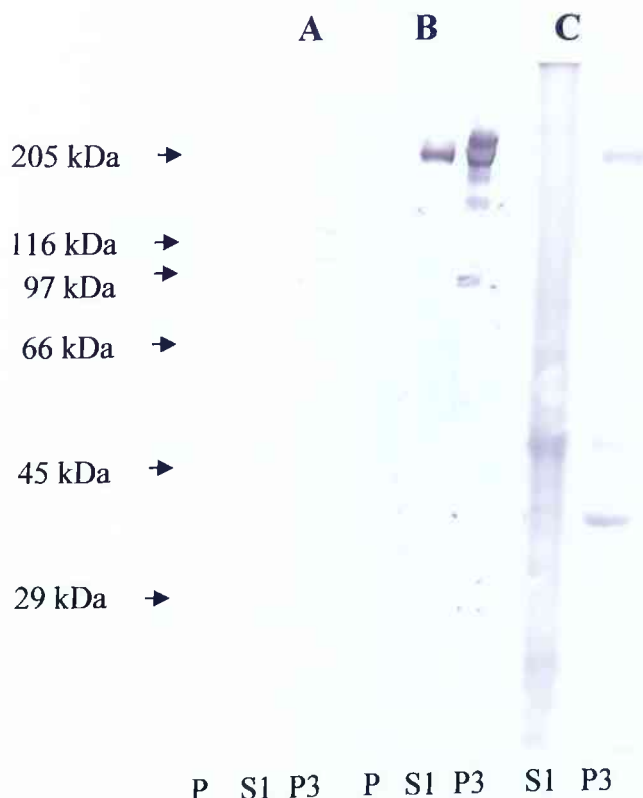


FIGURA 9: Imunoblotting de S1 e P3

Foram aplicados em gel 12% aproximadamente 15 μ g de S1 e 5 μ g de P3. O gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose, sob uma amperagem de 400mA, por aproximadamente 12 horas. "A" se refere ao ensaio com anti-miosina II, "B" ao ensaio com anti-miosina V e "C" ao gel transferido para blot. "P" se refere ao padrão SDS-6H SIGMA e a esquerda estão indicados as massas moleculares correspondentes (miosina, β -galactosidase, fosforilase b, albumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica respectivamente). O blotting foi revelado com fosfatase alcalina.

4.1 Tratamento de P2 com Triton X-100

A fração P2 foi obtida conforme descrito anteriormente, sendo tratada com 0,2% de Triton X-100 (Sigma). Após esse tratamento, a mesma era centrifugada a 45.000g por 40 minutos, resultando também em duas frações, S3 e P3.

Analisando o SDS-PAGE das frações submetidas ao ensaio com Triton X-100 (figura 10), observamos que o perfil eletroforético é semelhante ao obtido com o experimento normal (figura 8), porém notamos que a fração S3 possui mais bandas, que antes se distribuíam entre S3 e P3. A fração P3 apresenta-se mais límpida e com definição de bandas que incluem os polipeptídeos de 205 kDa e 45 kDa, salientando-se que o polipeptídeo de 57 kDa solubiliza-se quase que inteiramente, passando então a S3.

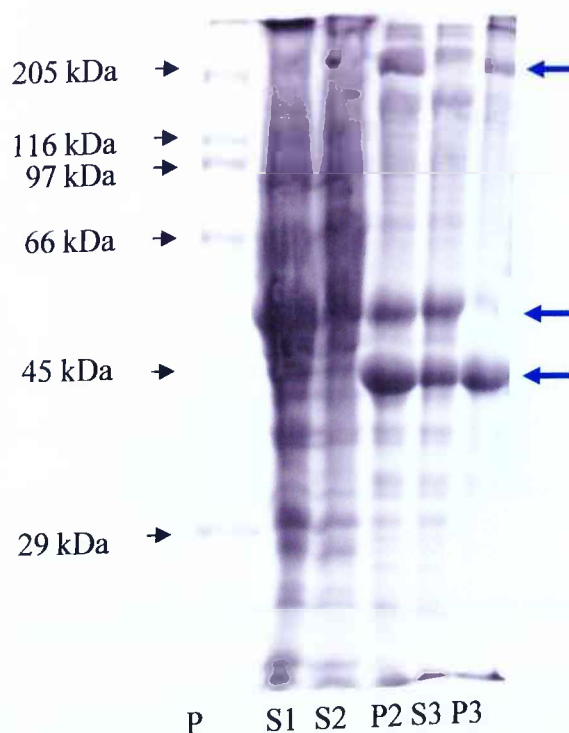


FIGURA 10: Tratamento de P2 com Triton X-100

Foram aplicados em gel 12% aproximadamente 15 μg de S1, 17 μg de S2, 13 μg de P2, 9 μg de S3 e 5 μg de P3. As setas azuis indicam os principais polipeptídios da fração P3. "P" se refere ao padrão SDS-6H SIGMA, e a esquerda estão indicados as massas moleculares correspondentes (miosina, β -galactosidase, fosforilase b, albumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica respectivamente). O gel foi corado com coomassie blue R-250.

A figura 11 mostra a atividade de P2, S3 e P3. Notamos que a atividade de S3 e P3 praticamente se equivalem à atividade de P2 no experimento controle, indicando que a atividade é dividida entre as duas frações. Podemos comparar também as atividades específicas de P3 obtido com e sem Triton X-100 para ressolubilizar P2. Notamos que a fração P3 sofre um decréscimo de sua atividade Mg^{2+} -ATPásica específica de mais de 4 vezes em relação ao experimento controle. Uma possibilidade deste decréscimo pode ser a própria adição de Triton X-100 ao experimento. Para verificar essa hipótese ensaiamos a atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3 na presença de Triton X-100, notando que o mesmo é um forte inibidor da atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3 (figura 12). Supondo que parte da atividade Mg^{2+} -ATPásica de P2 possa ter solubilizado em S3, dialisamos a fração S3 para retirada do excesso de Triton X-100. Porém a fração S3, após submetida a diálise de 4 horas, não recupera sua atividade ATPásica (figura 13).

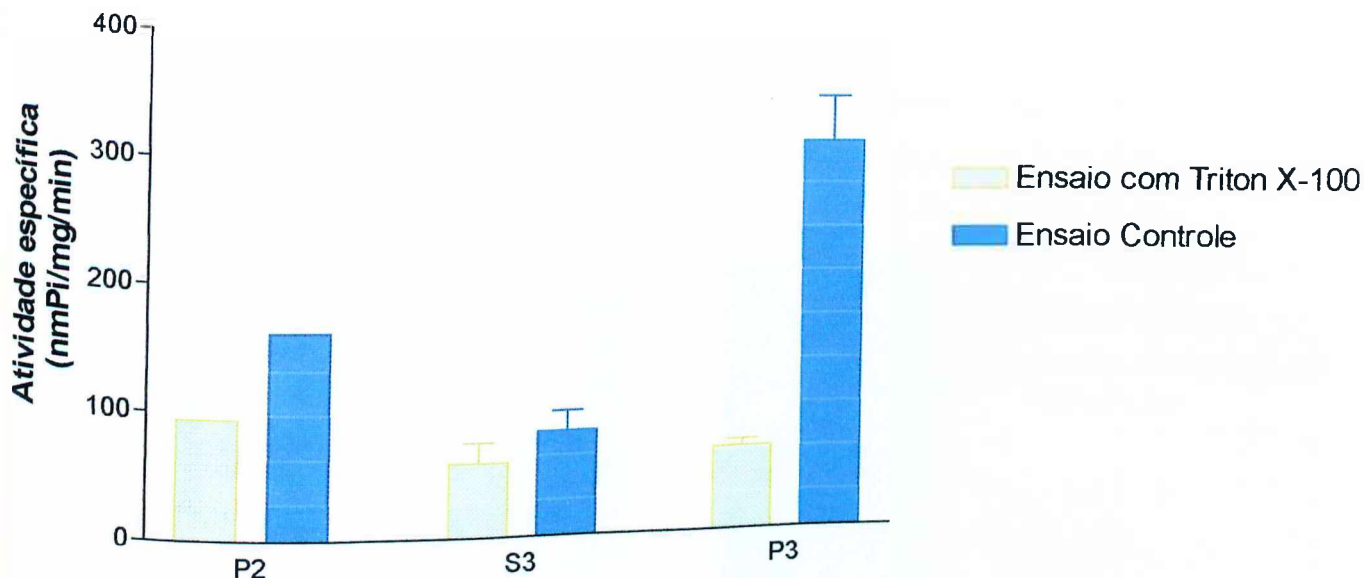


FIGURA 11: Atividade Mg²⁺-ATPásica da fração P3 obtida com e sem Triton X-100

20 µL das frações foram incubados a 37°C, por 10 minutos, em meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM, MgCl₂ 4 mM). A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. As barras de erro indicam erro padrão calculado com n de 3 para ensaio com Triton X-100.

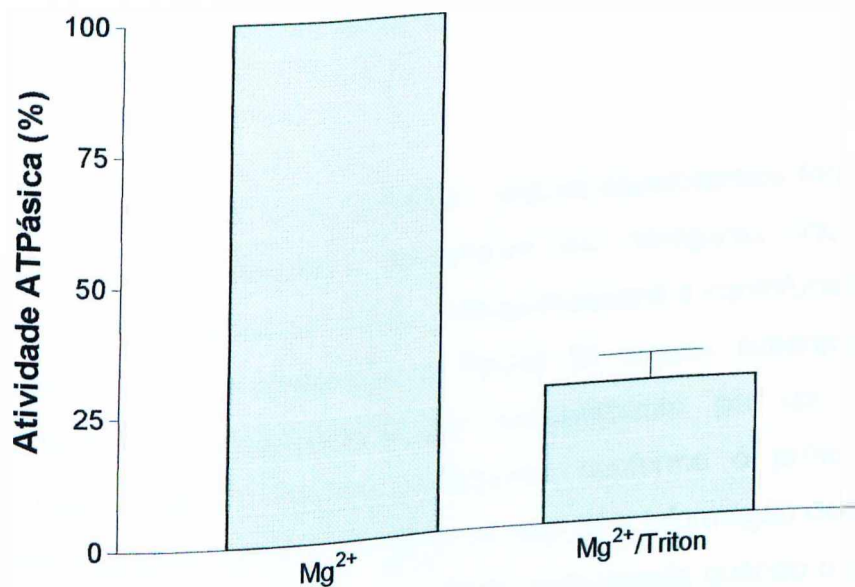


FIGURA 12: Efeito de Triton X-100 sobre a atividade Mg²⁺-ATPásica de P3

15 µg (±4) de P3 foram incubados a 37°C, por 20 minutos, em meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM e MgCl₂ 4 mM), adicionando-se Triton X-100 0,2% onde indicado. A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. As barras de erro indicam erro padrão calculado com n de 3.

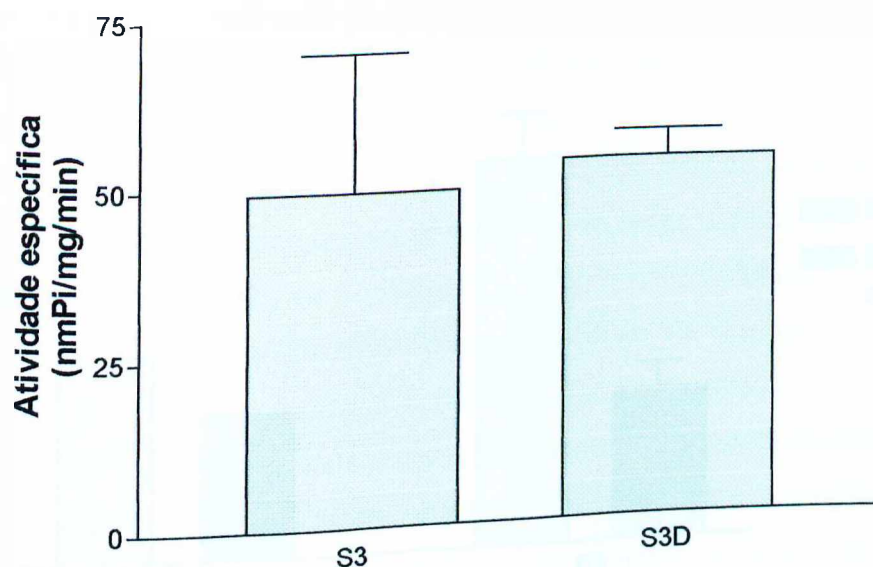


FIGURA 13: Efeito da diálise da fração S3 em sua atividade Mg^{2+} -ATPásica
 15 μg (± 4) de S3, com ou sem diálise de 4 horas, foram incubados a $37^{\circ}C$, por 20 minutos, em meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 4 mM). A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. As barras de erro indicam erro padrão calculado com n de 3.

Para fins de comparação, alguns experimentos foram iniciados utilizando-se cérebros previamente congelados em nitrogênio líquido. No momento da extração, eram descongelados, homogeneizados e centrifugados por 45000g por 40 minutos. Após centrifugação, a fração S1 destes experimentos era novamente submetida a armazenamento por congelamento, por um mínimo de 48 horas, novamente descongelados e seguidos conforme o protocolo comum descrito anteriormente. A análise da figura 14, nos dá a informação de que a atividade Mg^{2+} -ATPásica específica de P3 é bastante prejudicada quando o material é proveniente de cérebros congelados, sofrendo um decréscimo de quase 3 vezes.

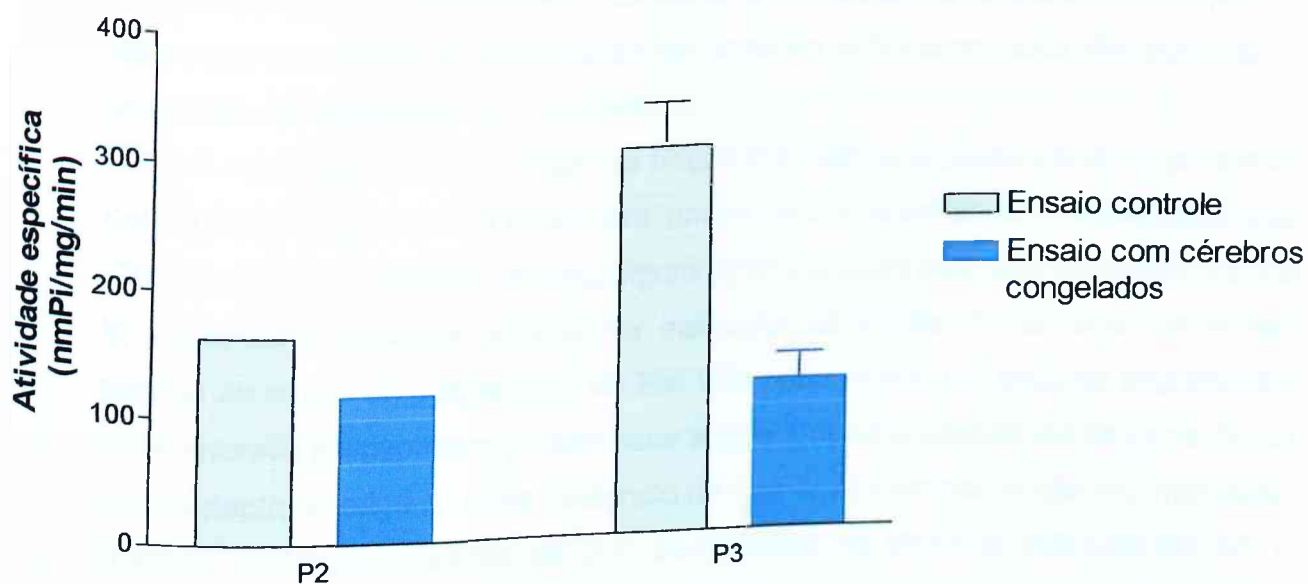


FIGURA 14: Comparação da atividade específica das frações P2 e P3 preparadas a partir de cérebros frescos e congelados

20 μ L das frações foram incubados a 37°C, por 10 minutos, em meio de reação (Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM, MgCl₂ 4 mM). A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. As barras de erro indicam erro padrão calculado com n de 3 para ensaio controle e n de 2 para ensaio com cérebros congelados.

4. DISCUSSÃO

Anteriormente, a fração solúvel de cérebro (S1) era obtida a partir de cérebros congelados. Os cérebros de ratos Wistar adultos eram extraídos e congelados em freezer -80°C. No momento da preparação eram descongelados, homogeneizados e centrifugados a 45000g por 40 minutos. Segundo DIGNAM (1990), tecidos estocados por congelamento, tem algum deterioramento devido à formação de cristais de gelo, que rompem os lisossomos liberando proteases. Desta forma, passamos a homogeneizar cérebros de rato, imediatamente após a extração dos mesmos, centrifugando em seguida e só assim congelando (S1). Assim, tentamos minimizar a degradação de nosso material evitando que as proteases atuem durante o descongelamento dos cérebros no protocolo anterior. A figura 4 mostra um aumento de cerca de 2 vezes da atividade de S1 quando

congelado após homogeneização dando uma certa base à nossa hipótese, pois isso pode ser devido à degradação de enzimas ATPásicas pela liberação de proteases no rompimento dos lisossomos.

Análise em SDS-PAGE da fração P3 indicou a presença de 3 principais polipeptídeos (figura 8): um de 45 kDa, um de 54 kDa e um de alta massa molecular (205 kDa) que em Western blotting (figura 9) foi marcada pelo anticorpo anti-miosina V, indicando a presença deste motor molecular na fração. A marcação de muitas bandas na região do polipeptídeo de 205 kDa pode indicar um grau de degradação, onde diversos polipeptídeos podem estar sendo formados através de degradação de um polipeptídeo origem. Uma evidência de que nosso problema não era marcação cruzada, é o reconhecimento de uma única banda na altura de 205 kDa em S1, o que indica um alto grau de especificidade do nosso anticorpo. Apesar desta forte evidência da presença de miosina V em P3, a fração não apresentou atividade Mg^{2+} -ATPásica estimulada por Ca^{2+} e por Ca^{2+} /Calmodulina, e também não apresentou atividade K^+ -EDTA-ATPásica significativa (ver capítulo 2), sendo uma possibilidade da causa da perda destas atividades, o tratamento de congelamento da fração solúvel. Porém nas condições de nossa fração (na presença de actina e outras proteínas), era possível que miosina V somente apresentasse baixos níveis de atividade K^+ -EDTA-ATPásica, como nos foi dito por ESPINDOLA em comunicação oral.

Os métodos descritos para a purificação de miosina V indicam o uso de condições que precipitem esta molécula, facilitando assim o isolamento da mesma. ESPINDOLA et al (1992) utilizou diálise por 20 horas, enquanto que o descrito por COELHO & LARSON (1993) usou 0,6M de NaCl como processo para precipitar miosina V. Neste trabalho comparamos estes protocolos com o desenvolvido em nosso laboratório, que obteve uma fração rica em miosina V a partir do congelamento da fração solúvel de cérebro de rato. Análise em SDS-PAGE por ESPINDOLA et al (1992) mostra que a fração rica em miosina V (mesmo após tratamento com Triton X-100) possui inúmeras bandas que não são notadas em nossa fração P3, porém a banda de 54 kDa notada no gel de P3 não está visivelmente presente. A fração precipitada com NaCl, e rica em miosina V, descrita por COELHO (1994) e CHENEY et al (1993) possui também diversas bandas não observadas na fração P3 deste trabalho.

Semelhante a ESPINDOLA et al (1992) e COELHO & LARSON (1993), usamos Triton X-100 numa tentativa de aumentar o grau de purificação da nossa fração. Este passo foi feito pois esse detergente solubiliza outros polipeptídeos presentes em preparações de actomiosina, mas não solubiliza miosinas. Apesar de ESPINDOLA et al (1992) e COELHO & LARSON (1993) usarem a concentração de 1% para Triton X-100, escolhemos a concentração de 0,2% pois foi observado que esta era suficiente para inibir consideravelmente a atividade Mg^{2+} -ATPásica de nossa fração. Observando a análise do SDS-PAGE da fração tratada com Triton X-100 (figura 10), notamos que o polipeptídeo de 57 kDa é solubilizado e praticamente desaparece da fração precipitada. A fração precipitada com NaCl não solubilizada com triton X-100, estudada por CHENEY et al (1993), possui um perfil polipeptídico muito semelhante ao encontrado neste trabalho quando obtemos a fração P3 através de tratamento com triton X-100.

A figura 11 mostra uma comparação entre a atividade Mg^{2+} -ATPásica das frações do ensaio controle e do ensaio com Triton X-100, onde podemos notar uma queda significativa na atividade de P3 após tratamento, indicando que o polipeptídeo de 57 kDa tem participação ativa na atividade Mg^{2+} -ATPásica. Porém a atividade da fração S3 nesse processo não é acrescida, o que indica que este polipeptídeo não participa da atividade Mg^{2+} -ATPásica. É importante salientar que a atividade perdida de P3 após tratamento, não passa a S3, nem mesmo após a atividade perdida de P3 após tratamento, não passa a S3, nem mesmo após diálise (figura 12). No entanto a causa da perda de atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3 após tratamento com Triton X-100, pode ser uma inibição pelo próprio triton X-100. Na figura 13 observamos uma inibição de cerca de 70% da atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3 normal, quando submetido a 0,2% de Triton X-100.

Os principais polipeptídeos, 160 e 54 kDa, observados na fração ATPase isolada por PINHEIRO (2001), não foram observados na fração P3, porém S3 possui uma banda com massa molecular semelhante ao polipeptídeo de 160 kDa referido. Ensaio usando cérebros previamente congelados mostraram-se diferentes dos ensaios controles, onde a atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3 está 3 vezes menor que P3 do ensaio controle (figura 14), além de diferenças marcantes em SDS-PAGE (não mostrado).

5. RESUMO

Pode-se obter Miosina II e V a partir de fração solúvel de cérebro através de diálise ou tratamento com alta concentração de sal. Nesse trabalho miosina V de cérebro foi isolada utilizando o congelamento como método de precipitação. Nossos procedimentos foram extração de cérebro de rato, homogeneização imediata em tampão (Imidazol-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM; DTT 1,0 mM e inibidores de proteases), centrifugação a 45000g por 40 minutos a 4 °C e congelamento da fração solúvel a -20 °C. Após um mínimo de 48 horas descongelou-se essa fração e seguiu-se uma nova centrifugação a 45000g por 40 minutos a 4 °C. Ressuspendeu-se a fração precipitada e realizou-se uma nova centrifugação, sob as mesmas condições supracitadas. A fração precipitada é enriquecida em atividade Mg^{2+} -ATPásica e apresentou três polipeptídeos principais fortemente corados em SDS-PAGE. Um de alta massa molecular que é marcado com anticorpo específico para miosina V em ensaio de Western-Blotting e outros dois de 57 kDa e 45 kDa. A análise de SDS-PAGE do tratamento da fração com triton X-100, mostrou que o polipeptídeo de 57 kDa foi solubilizado, encontrando-se no precipitado os polipeptídeos de alta massa molecular e o polipeptídeo de 45 kDa. A atividade Mg^{2+} -ATPásica desse precipitado é três vezes menor que o precipitado obtido sem triton X-100. Isso não é devido a solubilização do polipeptídeo de 57 kDa, mas o fato de triton X-100 ser um forte inibidor da atividade Mg^{2+} -ATPásica de nossa fração. Essa fração pode ser obtida de modo mais simples que outros métodos descritos na literatura para a obtenção de miosina V. Nesse trabalho descrevemos um método simples para obter miosina V a partir de uma fração solúvel de cérebro de rato.

6. ABSTRACT

We recently obtained a fraction from rat brain cytosol, with Mg^{2+} -ATPasic activity and a main polypeptide with Mr similar to myosin heavy chain. Our proceedings are extrate rat brain, i mMediately homogeneizing them on buffer (50

mM Imidazol pH 8,0, 10 mM EDTA, 1 mM DTT and protease inhibitors), centrifuged at 45.000g for 40 minutes and freezing the soluble fraction at -20°C. After at least 48 hours we defreeze this fraction and follow a new centrifugation at 45.000g for 40 minutes that give us two fractions, a soluble fraction and a precipitated fraction. After ressuspending our precipitated fraction, we procede a new centrifugation at 45.000g for 40 minutes, obtaining again two fractions, a soluble and a precipitated. That precipitated fraction is enriched with Mg^{2+} -ATPasic activity and shown two main polypetides in SDS-PAGE analisis: 57 and 45 kDa apart from the high molecular weight polypeptide similar to myosin. That high molecular weight polypeptide was marked with anti-myosin V in the Western Blotting assay. SDS-PAGE analisis of the treatment of the fraction with Triton X-100, show that the 57 kDa polypeptide is solubilized, standing in the precipitated the high molecular weight polypeptide and the 45 kDa polypeptide. The Mg^{2+} -ATPasic activity of this precipitated is 3 times lower than those precipitated obtained without Triton X-100. This is not because solubilizing the 57 kDa polypeptide, but the fact of Triton X-100 be an strong inhibitor of the Mg^{2+} -ATPasic activity of our fraction. Our fraction do not shown stimulation of the Mg^{2+} -ATPasic activity by Ca^{2+} and calmodulin, and has only a low K^+ -EDTA-ATPasic activity when compared with the Mg^{2+} -ATPasic activity. This fraction could be obtained simpler than others methods described in literature to obtaining myosin V. In this work we described a simple method for obtaining an fraction enriched of Mg^{2+} -ATPasic activity and western blotting assay show that myosin V is one of the main polypeptides in that.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADFORD, M. M. – A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Biding. *Analytical Biochemistry* 72, p. 248-254. 1976.
- CARAFOLI, E. – Plasma membrane calcium pump: structure, function and relationships. *Basic. Res. Cardiol.*, n 92, p. 59-61. 1997.

- CHENEY, R. E.; O'SHEA, M. K.; HEUSER, J. E.; COELHO, M. V.; WOLENSKI, J. S.; ESPREAFICO, E. M.; FORSCHER, J.; LARSON, R. E. & MOOSEKER, M. S. – Brain Myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. **Cell.** 75, p. 13-23. 1993.
- 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.** 26, p. 465-472. 1993.
- CONZELMAN, K. A. & MOOSEKER, M. S. – The 110- kDa protein-calmodulin complex of the intestinal microvillus is an actin-activated Mg-ATPase. **J. Cell Biol.** 105, p. 313-324. 1987.
- DIGNAM, J. D. – Preparation of extracts from higher eukariotes. **Guide to protein purification.** 182, p. 194-225. 1990.
- ESPINDOLA, F. S.; ESPREAFICO, E. M.; COELHO, M. V.; MARTINS, A. R.; COSTA, F. R. C.; MOOSEKER, M. S. & LARSON R. E. – Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: A novel calmodulin-binding myosin. **The journal of cell biology.** 118, p. 359-368. 1992.
- GERSHONI, J. M. & PALADE G. E. – Protein Blotting: Principles and application. **Anal. Biochem.** 131, p. 1-15. 1983.
- HEINONEN, J. K. & LAHTI, R. J. – A New and Convenient Colorimetric Determination of Inorganic Orthophosphate and Its Application to the Assay of Inorganic Pyrophosphatase. **Analytical Biochemistry** 113, p. 313-317. 1981.
- KOMOSZYNSKI, M. & WOJTCZAK, A. – Apyrases (ATP diphosphohydrolases, E.C. 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. **Biochim. Biophys. Acta** 1310, p. 233-241. 1996.
- LAEMMLI, V. K. & FRAVRE, M. Maturation of head of bacteriophage T4. **J. Mol. Biology** 80, p. 575-599. 1973.
- LARSON, R. E.; PITTA, E. D. & FERRO, J. A. A novel 190 kDa calmodulin binding protein associated with brain actomyosin. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 21, p. 213-217. 1988.

LARSON, R. E.; ESPINDOLA, F. S. & ESPREAFICO, E. M. Calmodulin-regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. **Journal of Neurochemistry**. 54, p. 1288-1294. 1990.

LINGREL, J. B.; KUNTZWEILER, T. Na⁺/K⁺-ATPase. **J. Biol. Chem.** 269, p. 19659-19662. 1994.

MARUTA, H. & KORN, E. D. Acanthamoeba myosin II. **J. Biol. Chem.** 252, p. 6501-6509. 1977.

PINHEIRO, C. M. Caracterização Parcial de uma ATPase de citosol de encéfalo de rato. Dissertação (**Genética e Bioquímica**) - Universidade Federal de Uberlândia – UFU, 2001.

PLESNER, L. Ecto-ATPases: identities and functions. **Int. Rev. Cytol.** 158, p. 141-215. 1995.

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slabgels. **J. Mol. Biology** 79, p. 237-248. 1973.

WEBER, J. & SENIOR, A. E. Catalitic machanism of F¹-ATPase. **Biochim. Biophys. Acta** 1319, p. 19-58. 1997.

5. CAPÍTULO 2:

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL
DE MIOSINA V OBTIDA POR
CONGELAMENTO DE CITOSOL
DE CÉREBRO DE RATO

1. INTRODUÇÃO

Segundo KOMOSZYNSKI & WOJTCZAK (1996), ATPases são enzimas que hidrolisam o ATP liberando ADP e Pi. Diversos critérios podem ser usados para a identificação de uma ATPase, dentre eles a caracterização enzimática. As ATPases podem ser divididas em ATPases de membrana e solúveis. Dentre as ATPases de membrana temos aquelas cuja função é transportar íons através da membrana, como a Ca^{2+} -ATPase e a Na^+/K^+ -ATPase. As Ca^{2+} -ATPases possuem sua atividade dependente de Ca^{2+} e estimulada por calmodulina (CARAFOLI, 1997), enquanto as Na^+/K^+ -ATPases possuem sua atividade inibida por ouabaína e digitonina (LINGREL & KUNTZWEILER, 1994). Outra ATPase de membrana é a F_1F_0 -ATPase, cuja atividade é fortemente inibida por fluoreto de alumínio 0,1 mM e fluoreto de sódio 5 mM (LUNARDI et al, 1988).

As ATPases solúveis incluem algumas ecto-ATPases e motores moleculares. As ecto-ATPases podem ser divididas em ectonucleotideo-difosfohidrolase (ecto-ATPDase) e ectonucleotideo-trifosfatase (ecto-ATPase). As ecto-ATPDases quebram nucleotídeos tri e difosfatos, enquanto as ecto-ATPases quebram apenas nucleotídeos trifosfato (PLESNER, 1995). Ambas são inibidas por Triton X-100, e são diferenciadas entre si pela inibição por azida, uma vez que apenas as ecto-ATPDases são inibidas por azida 10-20 mM (PLESNER, 1995). Dentre os motores moleculares destacam-se as miosinas, as cinesinas e as dineínas. As miosinas estão divididas em 18 classes e 3 destas já foram isoladas de cérebro, as do tipo (I), (II) e (V). Todas as miosinas possuem sua atividade estimulada por actina, porém algumas características as diferem entre si. As miosinas do tipo I possuem alta atividade Ca^{2+} -ATPásica e K^+/EDTA -ATPásica, se comparadas a atividade Mg^{2+} -ATPásica, e não possuem especificidade de substrato, quebrando diversos nucleotídeos trifosfato (BARYLKO et al, 1992). As miosinas do tipo II também possuem atividade K^+/EDTA -ATPásica (MARUTA e KORN, 1977). Segundo ESPINDOLA et al (1992) as miosinas do tipo V não apresentam atividade K^+/EDTA -ATPásica considerável na presença de actina, porém NASCIMENTO et al (1996) mostraram

a presença de atividade K^+ /EDTA-ATPásica alta nessas condições. As miosinas V possuem também sua atividade Mg^{2+} -ATPásica, na presença de actina, estimulada por Ca^{2+} e por Ca^{2+} /Calmodulina (ESPINDOLA et al, 1992).

As cinesinas possuem alta atividade Mg^{2+} -ATPásica na presença de microtúbulos, mas na ausência de microtúbulos a atividade Ca^{2+} -ATPásica é maior, além de possuírem também sua atividade Mg^{2+} -ATPásica inibida por força iônica e concentrações de vanadato maiores que $50\mu M$ na presença de microtúbulos (KACHAR et al, 1987; COHN et al, 1987). A dineína citoplasmáticas possui sua atividade Mg^{2+} -ATPásica inibida por vanadato $10\mu M$ e por N-etilmaleimida 1 mM , hidrolisando mais GTP, CTP e TTP do que ATP (SHPETNER et al, 1988).

Nosso objetivo neste trabalho foi analisar, em diferentes condições de ensaios, a atividade ATPásica da miosina V de cérebro de rato obtida por congelamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ATPÁSICA

A atividade ATPásica foi determinada pela quantificação do fosfato inorgânico (P_i) liberado pela hidrólise de ATP, usando o método colorimétrico de HEINONEN & LAHTTI (1981). Os ensaios foram feitos a $37^\circ C$ em duplicatas com volume final de $200\ \mu L$, e quantificado no comprimento de onda de 355 nm . Os meios de reação foram: atividade Mg^{2+} -ATPásica: Imidazol HCl 25 mM pH $7,5$, DTT 1 mM , EDTA 1 mM , KCl 60 mM e $MgCl_2$ 4 mM ; atividade Ca^{2+} -ATPásica: Imidazol HCl 25 mM pH $7,5$, DTT 1 mM , EDTA 1 mM e KCl 60 mM e $CaCl_2$ 2 mM ; atividade K^+ /EDTA-ATPásica: Imidazol HCl 25 mM , DTT 1 mM e EDTA 2 mM .

3.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As concentrações de proteínas nas frações de interesse foram determinadas segundo o método descrito por BRADFORD (1976), usando como padrão a Albumina de Soro Bovino (BSA). Alíquotas das respectivas frações foram previamente diluídas para 100 μ L com água deionizada e posteriormente, finalizando com a adição de 3 mL de Reagente de Bradford. As determinações foram realizadas em duplicatas, lendo-se em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

3.3 ANÁLISE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS - PAGE)

O perfil eletroforético de polipeptídeos das frações foi analisado em gel de poliacrilamida 10% com SDS utilizando o método de tampão descontínuo de LAEMMLI & FAVRE (1973) e o sistema de placas empregado por STUDIER (1973).

3.4 ENSAIO DE DIGESTÃO PROTEOLÍTICA COM TRIPSINA

Foi usado tripsina de pâncreas bovino (Sigma) para os ensaios de digestão enzimática. O ensaio foi iniciado com a adição de tripsina e 20 mM de cálcio, à temperatura de 37°C, e finalizadas com aprotinina 1% e gelo. Após o ensaio de digestão, a amostra era ensaiada para quantificação de atividade Mg²⁺-ATPásica.

3.5 OBTENÇÃO DE MIOSINA DE CÉREBRO DE RATO

Ratos wistar adultos foram anestesiados com éter comercial e sacrificados por decapitação, sendo seus cérebros extraídos imediatamente, lavados em solução salina gelada e colocados no tampão de homogeneização (Imidazol-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, Sacarose 250 mM, DTT 1 mM, benzamidina 1 mM, aprotinina 1% e calpastatina 1 μ L/mL). Cerca de 25g de cérebros foram homogeneizados em 30 mL deste tampão, usando Potter (Pyrex), em gelo a fim de se evitar degradação de proteínas. A fração

homogeneizada era centrifugada a 45.000g por 40 minutos (centrífuga Sigma modelo 3K30), sendo a fração solúvel congelada em freezer a -20°C, e a fração precipitada descartada.

A fração S1 foi descongelada após um mínimo de 48 horas. Esse descongelamento foi realizado com banho em água na temperatura ambiente (cerca de 10 minutos). Após descongelamento, S1 foi centrifugado a 45.000g por 40 minutos, resultando em duas frações, S2 e P2 (ver fluxograma no capítulo 1). A fração P2 foi ressuspensa em tampão I pH 8,0 (Imidazol 20 mM, EDTA e DTT 0,1 mM) num volume 3 vezes menor que S1, em seguida novamente centrifugado a 45.000g por 40 minutos. Resultando novamente em duas frações, S3 e P3. P3 foi ressuspensa em tampão I no mesmo volume de P2.

3. RESULTADOS

3.1 Atividade Mg^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ATPásica de P3

Em geral, motores moleculares e outras ATPases necessitam de cátions divalentes para sua atividade ATPásica. A fração P3 possui cerca de 70% de atividade Ca^{2+} -ATPásica em relação a Mg^{2+} -ATPásica (figura 4). Apesar de P3 possuir atividade tanto na presença de Ca^{2+} , como de Mg^{2+} , na presença dos dois cátions juntos, não houve soma dessas atividades.

3.2 Efeito de Ca^{2+} e Calmodulina na atividade Mg^{2+} ATPásica de P3

A miosina V apresenta sua atividade Mg^{2+} -ATPásica estimulada por calmodulina (CaM) e dependente de Ca^{2+} . Diferentemente dessa ATPase, P3 não apresentou estimulação de sua atividade Mg^{2+} -ATPásica por cálcio e calmodulina (figura 5).

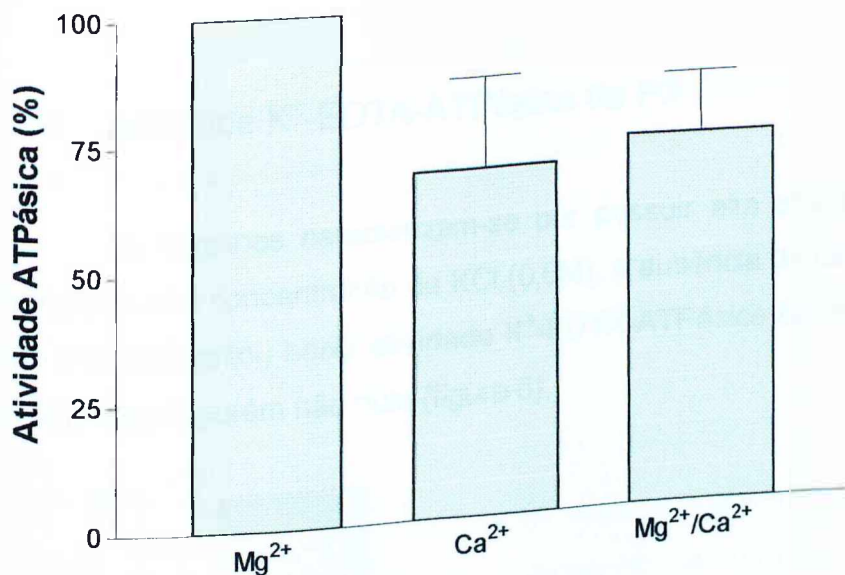


FIGURA 4: Atividade Mg²⁺-ATPásica e Ca²⁺-ATPásica de P3
 15 µg (±4) de P3 foram incubados a 37°C, por 20 minutos, em meio de reação contendo Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM e MgCl₂ 4 mM ou CaCl₂ 2 mM onde indicado. A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. As barras de erro indicam erro padrão calculado com n de 3.

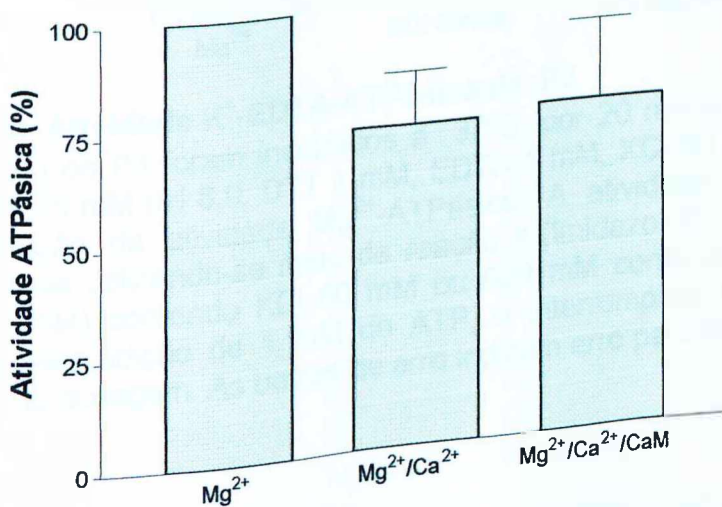


FIGURA 5: Efeito de Ca²⁺ e Calmodulina na atividade Mg²⁺-ATPásica de P3
 15 µg (±4) de P3 foram incubados a 37°C, por 20 minutos, em meio de reação contendo Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM e MgCl₂ 4 mM, CaCl₂ 2 mM e/ou 20µg de Calmodulina onde indicado. A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. As barras de erro indicam erro padrão calculado com n de 3.

3.3 Atividade K^+ -EDTA-ATPásica de P3

As miosinas caracterizam-se por possuir alta atividade ATPásica na presença de alta concentração de KCl (0,6M), e ausência de cátions divalentes. A fração P3 apresentou baixa atividade K^+ -EDTA-ATPásica em relação a atividade Mg^{2+} -ATPásica, porém não nula (figura 6).

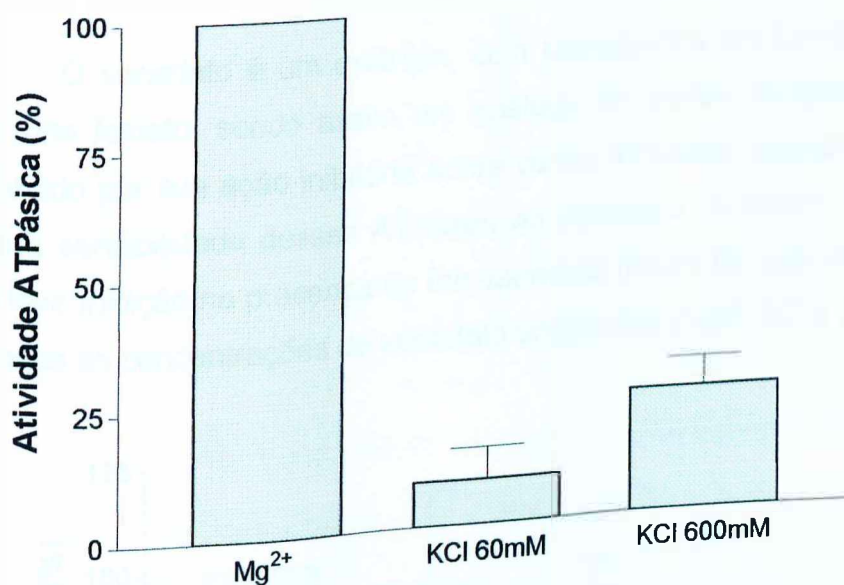


FIGURA 6: Atividade K^+ -EDTA-ATPásica de P3
15 μ g (± 4) de P3 foram incubados a 37°C, por 20 minutos, em meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 4 mM) para determinação da atividade Mg^{2+} -ATPásica. A atividade K^+ -EDTA-ATPásica foi determinada utilizando-se meio de reação II (Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM) contendo KCl 60 mM ou 600 mM conforme indicado. A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. As barras de erro indicam erro padrão calculado com n de 3.

3.4 Efeito de Fluoreto de Alumínio sobre a atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3

O fluoreto de alumínio (AlF_3), um análogo do fosfato inorgânico, é conhecido por inibir diversas enzimas que catalisam a hidrólise de nucleotídeos. Na presença de fluoreto de alumínio 1,25 mM, a fração P3 não mostrou inibição significativa de sua atividade Mg^{2+} -ATPásica, ficando entre 10 e 25% de

inibição (figura 7). Como controle para o efeito dos íons separadamente foram analisados também o efeito de Al^{3+} (AlCl_3) e F^- (NaF) na atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3.

3.5 Efeito de Vanadato de sódio sobre a atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3

O vanadato é um oxianion, com semelhança em forma, tamanho e carga com íons fosfato, sendo assim um análogo do fosfato inorgânico. O vanadato é conhecido por sua ação inibitória sobre várias ATPases, apesar de haver diferença entre a sensibilidade dessas ATPases ao vanadato. A fração P3 mostrou apenas uma leve inibição na presença do íon vanadato (figura 8), com inibição de 10 a 25% em todas as concentrações de vanadato analisadas (0,05, 0,2 e 1 mM).

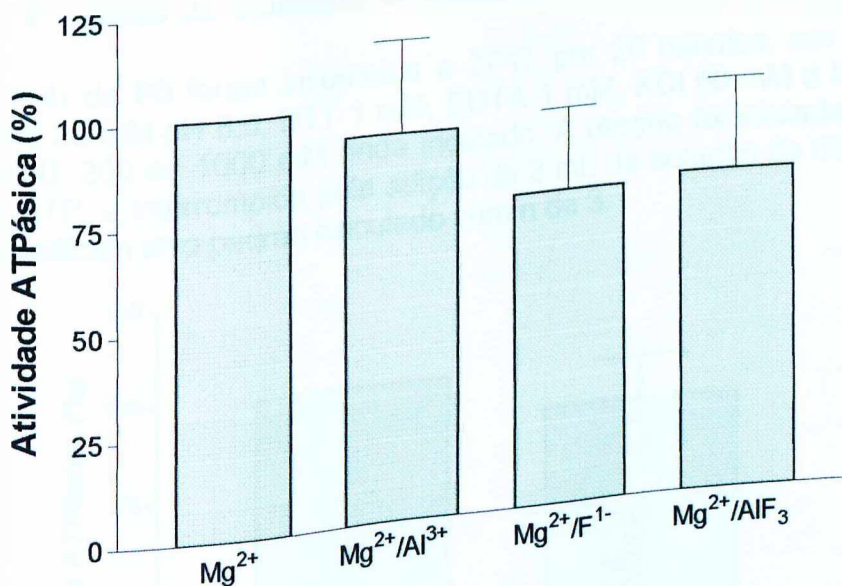


FIGURA 7: Efeito de Fluoreto de Alumínio sobre a atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3
15 μg (± 4) de P3 foram incubados a 37°C, por 20 minutos, em meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM e MgCl_2 4 mM), adicionando-se NaF 2,5 mM, AlCl_3 0,5 mM e AlF_3 1,25 mM onde indicado. A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. As barras de erro indicam erro padrão calculado com n de 3.

3.6 Efeito de Azida sobre a atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3

Azida tem conhecido efeito inibitório sobre atividade Mg^{2+} -ATPásica de F1-ATPase. A fração P3 não mostrou qualquer inibição por azida (fig 9).

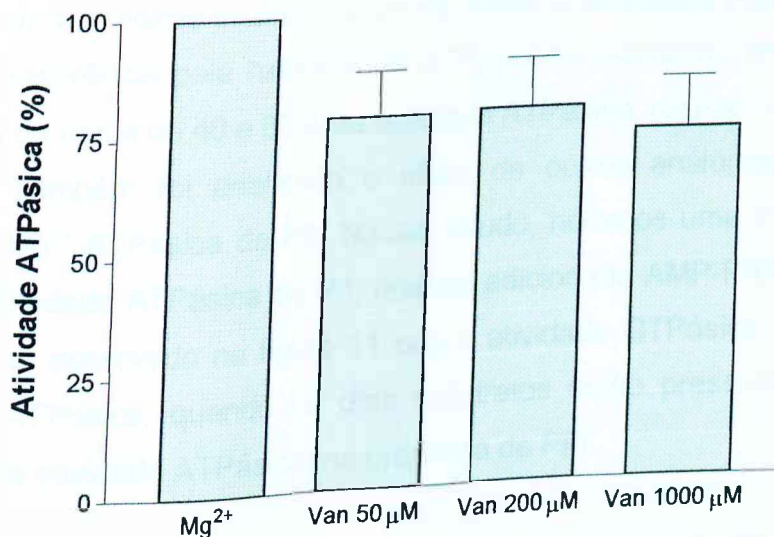


FIGURA 8: Efeito de Vanadato de sódio sobre a atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3

15 μg (± 4) de P3 foram incubados a 37°C, por 20 minutos, em meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 4 mM), com 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. As barras de erro indicam erro padrão calculado com n de 3.

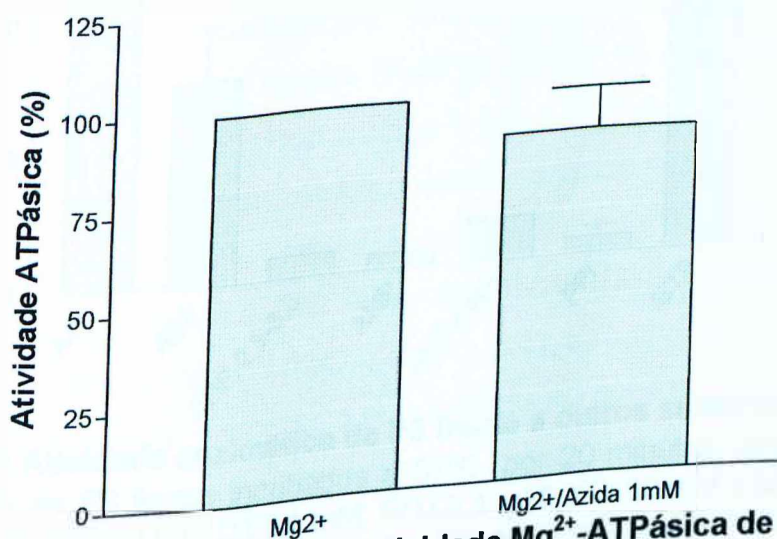


FIGURA 9: Efeito de Azida sobre a atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3

15 μg (± 4) de P3 foram incubados a 37°C, por 20 minutos, em meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 4 mM), com 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. As barras de erro indicam erro padrão calculado com n de 3.

3.7 Atividade enzimática de P3 frente a outros substratos

Dineína citoplasmática hidrolisa mais GTP, TTP, UTP e CTP que ATP, diferentemente das cinesinas e dineína axonemal. Dessa forma buscamos caracterizar a atividade enzimática de P3, frente a diferentes substratos. A fração P3 mostrou preferência pela hidrólise de ATP, porém hidrolisou também ADP e GTP, em níveis de cerca de 40 e 60% da atividade ATPásica, respectivamente (figura 10).

Também foi analisado o efeito de outros análogos de ATP sobre a atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3. Nesse estudo, notamos uma inibição de cerca de 50% na atividade ATPásica de P3, quando adicionado AMP-PNP 1 mM (figura 11). Também foi observado na figura 11 que a atividade GTPásica parece somar-se a atividade ATPásica, quando os dois substratos estão presentes. Foi notado um aumento da atividade ATPásica, na presença de PPi.

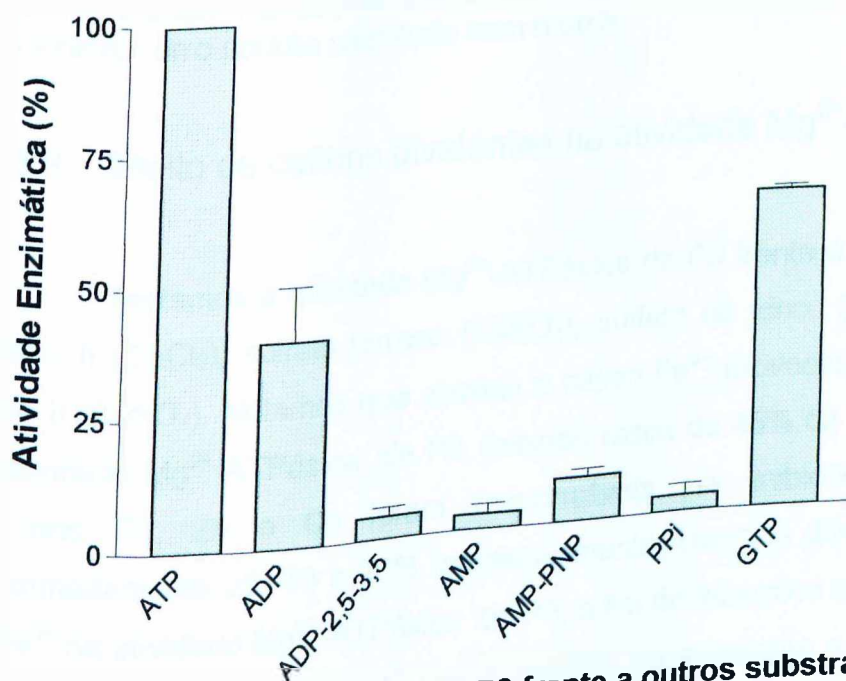


FIGURA 10: Atividade enzimática de P3 frente a outros substratos
15 μ g (± 4) de P3 foram incubados a 37°C, por 20 minutos, em meio de reação (Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 4 mM), com o respectivo substrato na concentração de 1 mM. A reação foi iniciada pela adição da fração P3, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. As barras de erro indicam erro padrão calculado com n de 3.

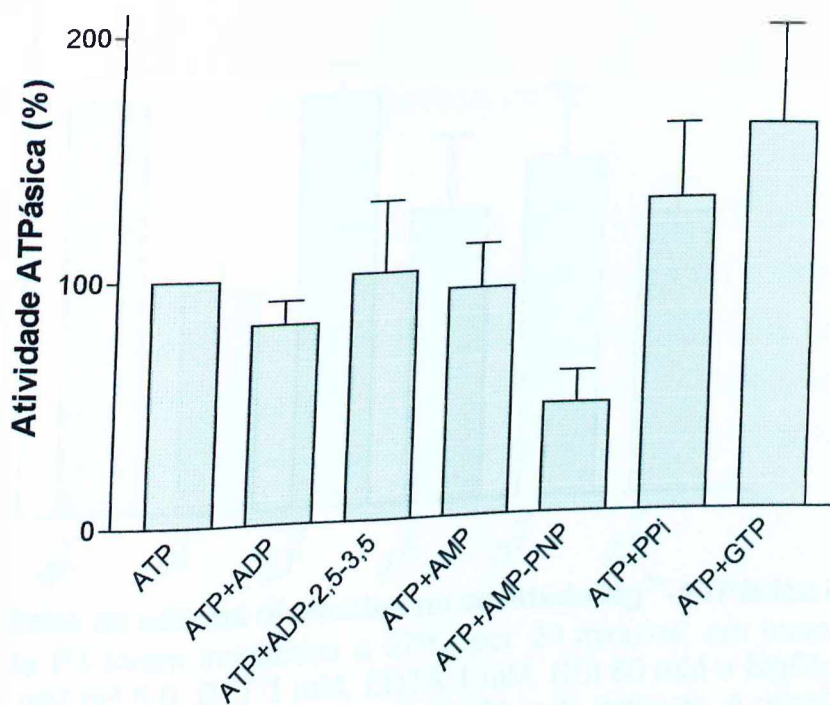


FIGURA 11: Efeito de nucleotídeos e PPI na Atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3
 15 μ g (\pm 4) de P3 foram incubados a 37°C, por 20 minutos, em meio de reação (imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 4 mM), com ATP 1 mM e efetor na concentração de 1 mM. A reação foi iniciada pela adição da fração P3 e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. As barras de erro indicam erro padrão calculado com n de 3.

3.8 Efeito de cátions divalentes na atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3

Testamos a atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3 frente a adição de cloreto de cobalto II ($CoCl_2$), sulfato ferroso ($FeSO_4$), sulfato de zinco ($ZnSO_4$) e sulfato de cobre II ($CuSO_4$). Notamos que apenas o cátion Fe^{2+} provocou significativa inibição na atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3, inibindo cerca de 45% da atividade (figura 12). Os íons Cu, Zn e Ca foram responsáveis por inibições mais leves, de aproximadamente 25, 10 e 20% respectivamente. Usamos diversas concentrações de Fe^{2+} na atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3, a fim de fazermos uma curva de inibição por Fe^{2+} . Notamos na figura 13 que a inibição se apresenta a nível de 50% numa concentração menor que 1 mM, chegando quase a 100% na concentração de 10 mM de Fe^{2+} .

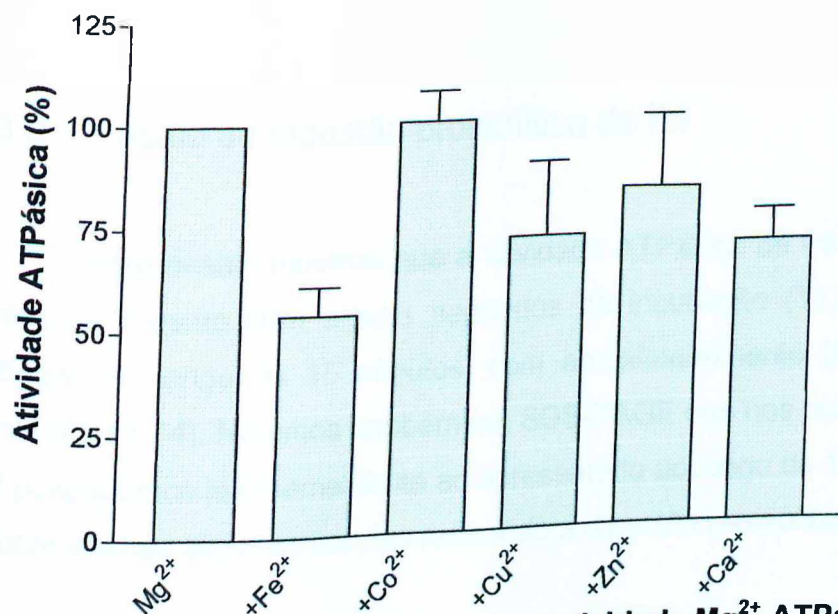


FIGURA 12: Efeito de cátions divalentes na atividade Mg²⁺-ATPásica de P3

15 µg (±4) de P3 foram incubados a 37°C, por 20 minutos, em meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM e MgCl₂ 4 mM), com os respectivos cátions na concentração de 1 mM onde indicado. A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem. As barras de erro indicam erro padrão calculado com n de 3.

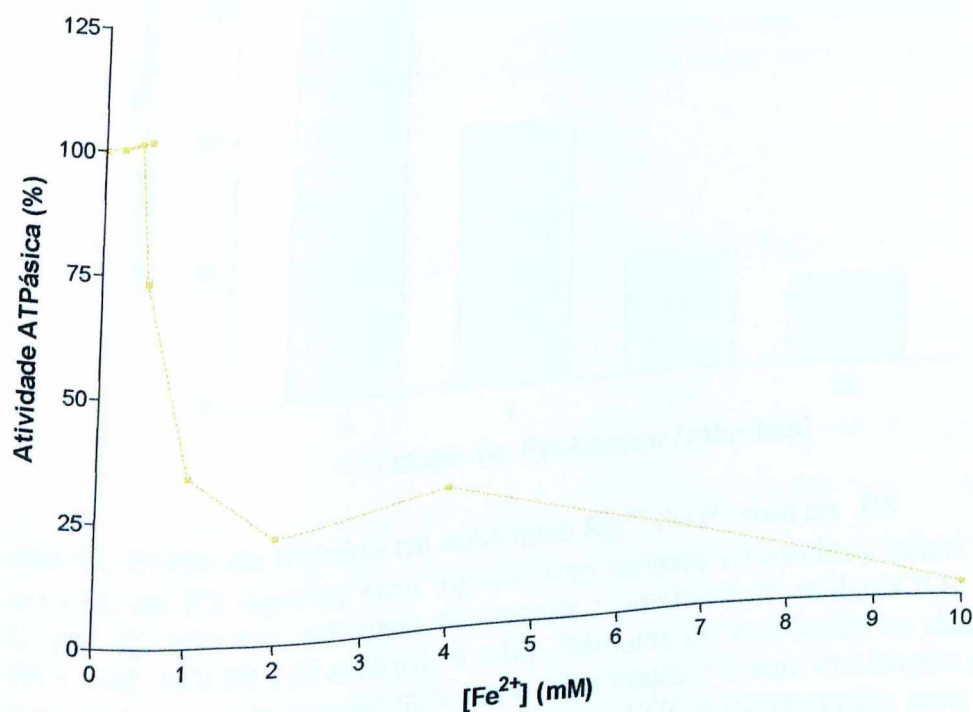


FIGURA 13: Efeito da concentração de Fe²⁺ na atividade Mg²⁺-ATPásica de P3

15 µg (±4) de P3 foram incubados a 37°C, por 20 minutos, em meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM e MgCl₂ 4 mM), com as respectivas concentrações de Fe²⁺ onde indicado. A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

3.9 Ensaio de digestão proteolítica de P3

Este ensaio mostrou que a atividade ATPásica de P3 sofre um grande decréscimo mesmo com alguns segundos de incubação (T1), tendendo a se estabilizar ao longo de 15 minutos, com aproximadamente 20% da atividade original (figura 14). Notamos também em SDS-PAGE que nos primeiros tempos, o perfil polipeptídico já é semelhante ao apresentado ao longo de 15-30 mins (figura 15), com apenas algumas bandas resistindo a digestão proteolítica.

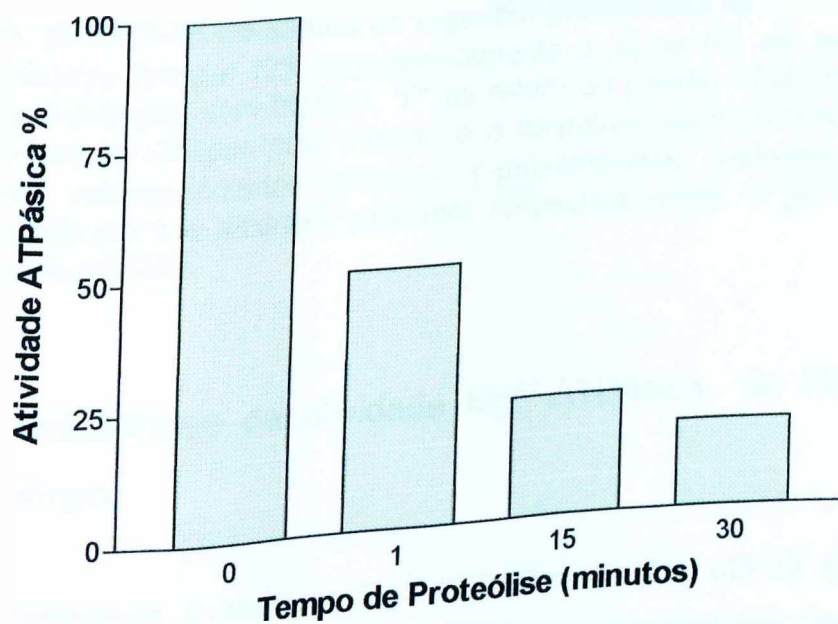


FIGURA 14: Efeito de tripsina na atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3
15 μg (± 4) de P3 digerido com tripsina (em tempos diferentes) foram incubados a 37°C, por 20 minutos, em meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 4 mM). *Minutos de incubação se refere ao tempo de incubação com tripsina em minutos e "0" a fração P3 sem incubação com tripsina. A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

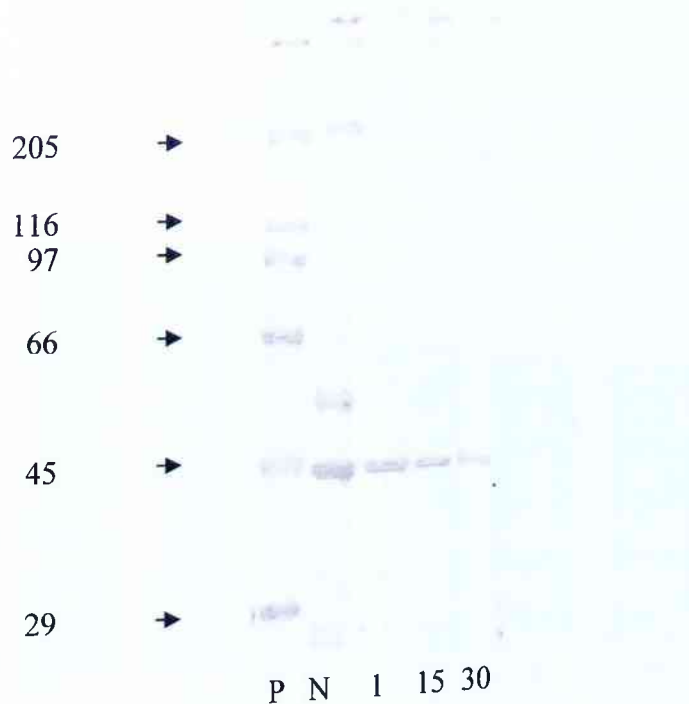


FIGURA 15: SDS-PAGE do ensaio de digestão proteolítica de P3

Foram aplicados em gel 12% aproximadamente 5 μg de P3, em seus respectivos tempos de incubação com tripsina. "P" se refere ao padrão SDS-6H SIGMA, "N" a fração P3 sem incubação com tripsina e a esquerda estão indicados as massas moleculares correspondentes (miosina, β -galactosidase, fosforilase b, albumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica respectivamente). O gel foi corado com coomassie blue R-250.

3.10 Estabilidade da atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3 quanto ao tempo

Analisamos a atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3, até 12 dias após o preparo, mantido a cerca de 4°C (geladeira). Observamos que nossa fração possui uma boa estabilidade enzimática, perdendo apenas cerca de 35% da atividade, ao fim de 12 dias (figura 16).

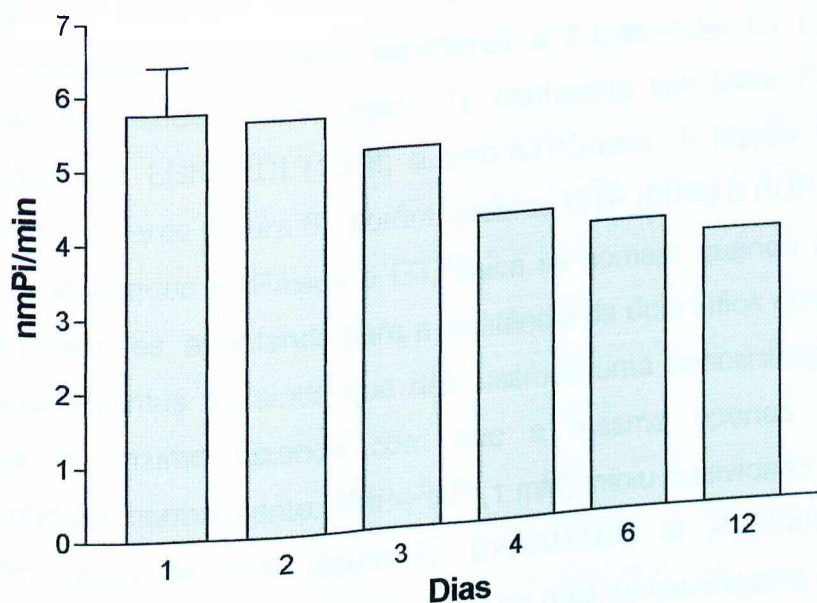


FIGURA 16: Estabilidade da atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3
 15 μg (± 4) de P3 foram incubados a 37°C, por 20 minutos, em meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM e $MgCl_2$ 4 mM). A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

4. DISCUSSÃO

A fração P3 obtida por congelamento de citosol de cérebro de rato possui atividade Mg^{2+} -ATPásica e cerca de 70% de atividade Ca^{2+} -ATPásica quando comparado com a atividade Mg^{2+} -ATPásica (figura 4). Um fato importante é que as atividades não se somam quando os dois cátions estão presentes, indicando a presença de um único sítio catalítico para as duas atividades. Diferente do encontrado por ESPINDOLA et al (1992), nossa fração não teve a atividade Mg^{2+} -ATPásica estimulada por Ca^{2+} e calmodulina, porém foi observado a semelhança de baixos níveis de atividade K^+ /EDTA-ATPásica nesta fração.

Esta fração não sofreu inibição da atividade Mg^{2+} -ATPásica por fluoreto de alumínio, como observado pela fração obtida por PINHEIRO (2001). Também não apresenta inibição pelo íon vanadato (50, 200 e 1000 μM), como observado por SHPETNER et al (1988) nas dineínas citoplasmáticas de cérebro, que são

inibidas por vanadato 10 μ M e as cinesinas convencionais que são inibidas por concentrações de vanadato superiores a 50 μ M. Não foi observada também inibição por azida 1 mM (figura 7), conhecida por inibir F₁F₀-ATPase como mostrado por LUNARDI (1988) e ecto-ATPDases. A fração P3 hidrolisou ATP preferencialmente (figura 8), porém quebrou GTP (60%) e ADP (40%), lembrando que as atividades ATPásica e GTPásica se somam quando os dois substratos estão presentes, apontando para a existência de dois sítios catalíticos ou de duas enzimas distintas ou ainda que não usamos uma concentração suficiente para saturar a enzima fazendo com que a mesma apenas hidrólise os dois nucleotídeos normalmente. AMP-PNP (1 mM) inibiu a atividade Mg²⁺-ATPásica de P3 em cerca de 50% (figura 9). BARANANO et al (2000) reportaram um transporte de Fe²⁺ dependente de ATP no qual concentrações maiores que 40 μ M de Fe²⁺ inibem este transporte e conseqüentemente esta atividade. Foi observada uma inibição significativa por Fe²⁺, que foi responsável por uma inibição de cerca de 50% da atividade Mg²⁺-ATPásica de P3 (figura 12) e possuindo um K_i de menos de 1 mM (figura 13). Outros cátions não inibiram a atividade de Mg²⁺-ATPásica de P3.

Ensaio de proteólise de P3 por tripsina mostrou que tempos menores que 1 minuto são suficientes para degradarem todo o polipeptídeo de 205 kDa e o polipeptídeo de 57 kDa, como observado em SDS-PAGE (figura 13), permanecendo praticamente intacto o polipeptídeo de 45 kDa, porém tempos superiores a 30 minutos deixam remanescentes cerca de 25% da atividade Mg²⁺-ATPásica de P3. A figura 14 mostra que a fração P3 é muito estável ao tempo, perdendo apenas cerca de 30% da atividade Mg²⁺-ATPásica ao fim de 12 dias a 4°C.

Nossa fração possui características enzimáticas distintas de várias ATPases conhecidas, ainda necessitando de outros passos de purificação que aumentem o grau de pureza de nossa amostra, facilitando análises e comparações com outros métodos de obtenção de miosina V.

5. RESUMO

Recentemente obtivemos, através de congelamento, uma fração enriquecida em atividade Mg^{2+} -ATPásica a partir de citosol de cérebro de rato. Análise em SDS-PAGE mostrou três principais polipeptídeos, um com alta massa molecular similar a cadeia pesada de miosina e outros dois com massa molecular de aproximadamente 57 e 45 kDa. O polipeptídeo de alta massa molecular foi marcado com anticorpo específico para miosina V. Nosso objetivo neste trabalho é a caracterização da atividade ATPásica dessa fração. A atividade Mg^{2+} -ATPásica desta fração não aumentou por acréscimo de íons cálcio nem por íons cálcio e calmodulina simultaneamente. A atividade Ca^{2+} -ATPásica foi cerca de 80% da atividade Mg^{2+} -ATPásica. Os níveis de atividade K^+ /EDTA-ATPásica foram baixos. Também não ocorreu alteração da atividade Mg^{2+} -ATPásica por cloreto de alumínio, fluoreto de sódio ou fluoreto de alumínio. Vanadato (50,200 e 1000 μ M) ou azida (1 mM) também não inibiu essa atividade. Essa fração apresentou especificidade para ATP, entretanto hidrolisou ADP (40%) e GTP (60%), mas não AMP, AMP-PNP, PP_i , ADP_{2,5,3,5}. AMP-PNP, inibiu a atividade Mg^{2+} -ATPásica. Concentrações de Fe^{2+} menores que 1mM inibiram cerca de 50% da atividade Mg^{2+} -ATPásica de P3, o que não foi observado pelos cátions cobre, cobalto ou zinco. A digestão protéica por tripsina mostrou uma perda da atividade e uma degradação do polipeptídeo de alta massa molecular, mantendo intacto o polipeptídeo de 45 kDa. A miosina V obtida por congelamento não foi sensível a Ca^{2+} /Calmodulina e não expressou atividade K^+ /EDTA-ATPásica.

6. ABSTRACT

We recently obtained a fraction enriched of Mg^{2+} -ATPasic activity from rat brain cytosol. Analysis by SDS-PAGE show three main polypeptides: a high molecular weight polypeptide similar to myosin, 57 and 45 kDa. The high molecular weight polypeptide was marked with anti-myosin V in western blotting assay. Our fraction does not show stimulation of the Mg^{2+} -ATPasic activity by

Ca^{2+} , neither by Ca^{2+} and calmodulin. It has about 80% of Ca^{2+} -ATPase activity when compared to the Mg^{2+} -ATPase activity. It has only low K^+ -EDTA-ATPase activity levels. There is no alteration of the Mg^{2+} -ATPase activity by aluminum, fluor, or aluminum fluoride. Vanadium (50, 200 e 1000 μM) or azide (1 mM) does not inhibit the Mg^{2+} -ATPase activity too. This fraction has a preference for ATP, however hydrolyses ADP (40%) and GTP (60%) too, but not AMP, ADP2,5-3,5, AMP-PNP and PPI. AMP-PNP, an analog of ATP, inhibit the Mg^{2+} -ATPase activity. The Mg^{2+} -ATPase activity suffer a inhibition by Fe^{2+} (1 mM) at about 50%, but not by with Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} and Ca^{2+} . Protein digestion assay by trypsin show a loss of activity and a degradation of the high molecular weight polypeptide, but the 45 kDa polypeptide still intact in the fraction. In this work we obtained a fraction enriched with Mg^{2+} -ATPase activity, that we tried to make a preliminar characterization.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARANANO, D. E.; WOLOSKER, H.; BAE, B.I.; BARROW, R.K.; SNYDER, S.H.; FERRIS, C.D. – A mammalian iron ATPase induced by iron. **J. Biol. Chem.** 275, p. 15166-15173. 2000.
- BARYLKO, B. et al – Purification and characterization of a mammalian myosin I. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89, p. 490-494. 1992.
- BRADFORD, M. M. – A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry** 72, p. 248-254. 1976.
- CARAFOLI, E. – Plasma membrane calcium pump: structure, function and relationships. **Basic. Res. Cardiol.**, n 92, p. 59-61. 1997.
- COELHO, M. V. Miosina V é alvo de duas enzimas mediadoras de íons cálcio: calpaína e CaM quinase II. Tese (Bioquímica) – Universidade de São Paulo-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP-FMRP, 1994.

- COHN, S. A.; INGOLD, A. L.; SCHOLEY, J. M. – Correlation between the ATPase and microtubule translocating activities of sea urchin egg kinesin. **Nature**, 328, p. 160-163. 1987.
- ESPINDOLA, F. S.; ESPREAFICO, E. M.; COELHO, M. V.; MARTINS, A. R.; COSTA, F. R. C.; MOOSEKER, M. S. & LARSON R. E. – Biochemical and immunological characterization of a p190-calmodulin complex from vertebrate brain: A novel calmodulin-binding myosin. **The journal of cell biology**. 118, p. 359-368. 1992.
- HEINONEN, J. K. & LAHTI, R. J. - A New and Convenient Colorimetric Determination of Inorganic Orthophosphate and Its Application to the Assay of Inorganic Pyrophosphatase. **Analytical Biochemistry** 113, p. 313-317. 1981.
- KACHAR, B.; ALBANESI, J. P.; FUJISAKI, H.; KORN, E. D. - Extensive purification from *Acanthamoeba castellanii* of a microtubule-dependent translocator with microtubule-activated Mg²⁺-ATPase activity. **J Biol Chem** 33, p. 16180-16185. 1987.
- KOMOSZYNSKI, M. & WOJTCZAK, A. – Apyrases (ATP diphosphohydrolases, E.C. 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. **Biochim. Biophys. Acta** 1310, p. 233-241. 1996.
- LAEMMLI, V. K. & FRAVRE, M. Maturation of head of bacteriophage T4. **J. Mol. Biology** 80, p. 575-599. 1973.
- LINGREL, J. B.; KUNTZWEILER, T. Na⁺/K⁺-ATPase. **J. Biol. Chem.** 269, p. 19659-19662. 1994.
- LUNARDI, J.; DUPUIS, A.; GARIN, J.; ISSARTEL, J. P.; MICHEL, L.; CHABRE, M. & VIGNAIS, P. V. Inhibition of H⁺-transporting ATPase by formation of a tight nucleoside diphosphate-fluoroaluminate complex at the catalytic site. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 85, p. 8958-8962. 1988.
- MARUTA, H. & KORN, E. D. *Acanthamoeba* myosin II. **J. Biol. Chem.** 252, p. 6501-6509. 1977.
- NASCIMENTO, A.A.; CHENEY, R.E.; TAUHATA, S.B.; LARSON, R.E.; MOOSEKER, M.S. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. **J Biol Chem**. 271, p. 17561-17569. 1996.

- PINHEIRO, C. M. Caracterização Parcial de uma ATPase de citosol de encéfalo de rato. Dissertação (**Genética e Bioquímica**) - Universidade Federal de Uberlândia - UFU, 2001.
- PLESNER, L. Ecto-ATPases: identities and functions. **Int. Rev. Cytol.** 158, p. 141-215. 1995.
- SHPETNER, H. S.; PASCHAL, B.M. & VALLEE, R. B. Characterization of the microtubule-activated ATPase of brain cytoplasmic dynein (MAP 1C). **J. Cell Biol.** 107, p. 1001-1009. 1988.
- STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slabgels. **J. Mol. Biology** 79, p. 237-248. 1973.

6. CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho purificamos parcialmente, através do congelamento de citosol de cérebro de rato, um polipeptídeo de alta massa molecular que reagiu com um anticorpo específico para miosina V. A atividade ATPásica dessa fração possui algumas propriedades distintas de miosina V.

7. ANEXOS

ANEXO 1 – DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ATPÁSICA

Para os ensaios de atividade Mg^{2+} -ATPásica, as amostras foram incubadas em meio de reação específico (meio de reação I):

- Imidazol-HCl 25 mM pH 7,5
- EDTA 1 mM
- DTT 1 mM
- $MgCl_2$ 5 mM
- KCl 60 mM

Estes ensaios foram iniciados pela adição de 20 μ l de ATP 10 mM com o volume final fixo em 200 μ l. Após a adição de ATP, este foi imediatamente incubado a uma temperatura de 37°C por um período de tempo pré-determinado de 10 minutos. Ao encerrar o tempo de incubação, foram acrescentados 2 mL de solução de dosagem AAM:

- 2 volumes de acetona
- 1 volume de molibdato de amônio 10 mM
- 1 volume de ácido sulfúrico 5 N

Ao se acrescentar a solução AAM, o mesmo foi agitado por cerca de 15 segundos em vórtex e adicionado 200 μ l de ácido cítrico 1 M, seguindo por nova agitação de cerca de 10 segundos.

Para fins de análise de cada amostra, fazia-se um controle, onde o ATP só foi adicionado ao final do tempo de incubação e antes de adicionar a solução AAM, evitando a hidrólise do mesmo. Todos ensaios foram realizados em duplicatas, e foram analisados a uma absorvância de 355 nm em espectrofotômetro (HITACHI U-2000) usando cubetas de quartzo.

Como padrão, foi feita uma curva de Pi, onde diversas concentrações de fosfato diácido de potássio (KH_2PO_4), geralmente de 0 a 250 nmoles, foram analisadas ao espectrofotômetro. Observa-se claramente que nesta faixa, a absorvância aumenta linearmente com o aumento de Pi (figura 1). Os resultados das leituras, em nmoles de Pi, foram utilizados para o cálculo da atividade específica em nmoles de Pi por mg de proteína por minutos de incubação.

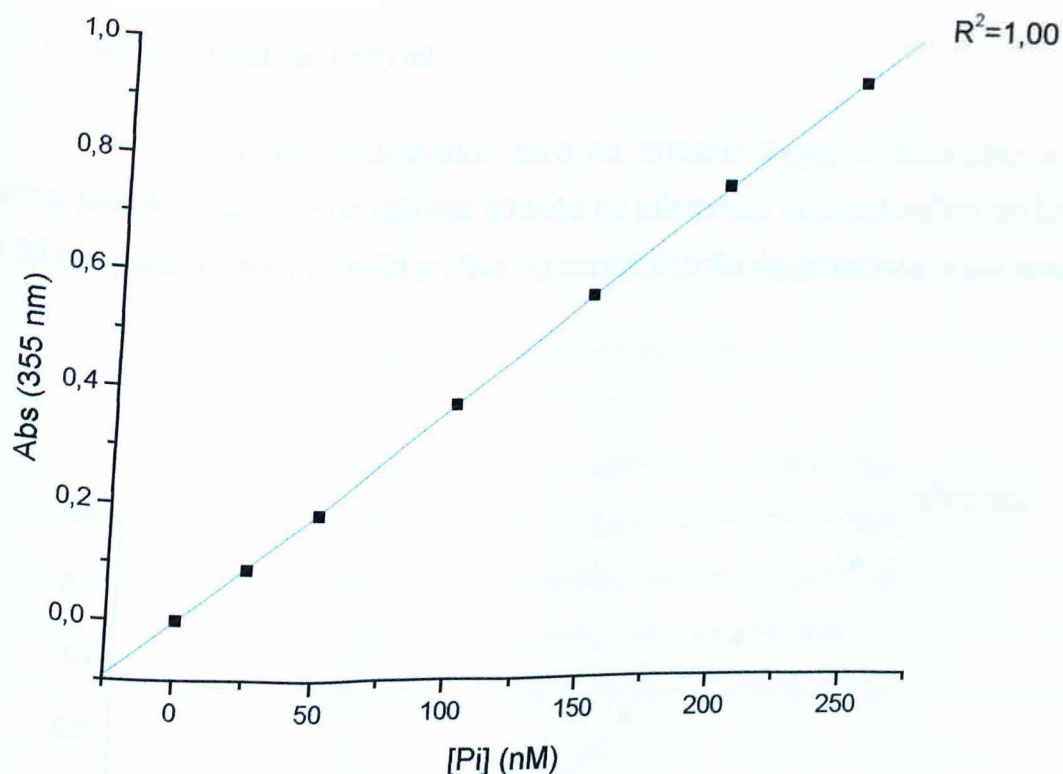


FIGURA 1: Curva padrão de fosfato (Pi), com coeficiente de linearidade (R^2)

ANEXO 2 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As concentrações de proteínas nas frações de interesse foram determinadas segundo o método descrito por BRADFORD (1976), usando como padrão a albumina de soro bovino (BSA). Aliquotas das respectivas frações foram previamente diluídas para 100 μ L com água deionizada e posteriormente, finalizando com a adição de 3 mL de Reagente de Bradford. As determinações foram realizadas em duplicatas, lendo-se em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

Reagente de Bradford:

- 100mg de Coomassie Blue G
- 50 mL de etanol 95%
- 100 mL de ác. Fosfórico 85%

- volume total de 1000 mL

Os valores encontrados para os ensaios foram comparados a uma curva padrão (figura 2) construída através de diferentes concentrações de BSA (0 a 25 μg) para a determinação gráfica da concentração de proteínas neste ensaio.

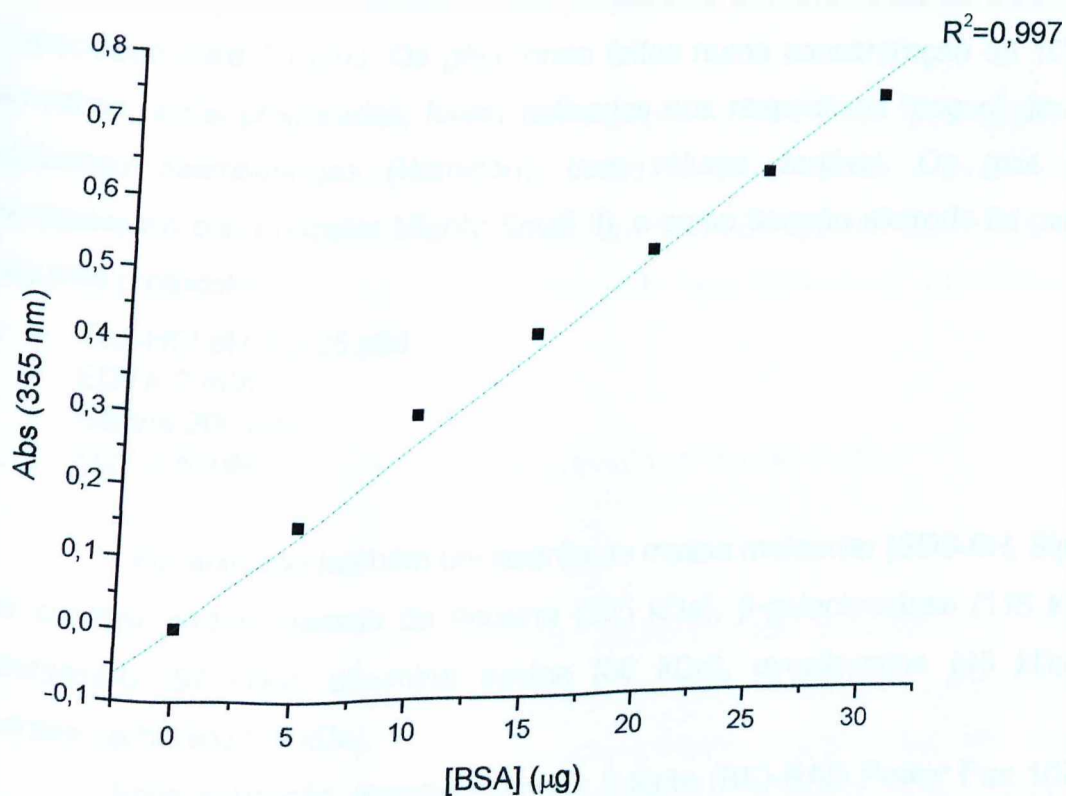


FIGURA 2: Curva padrão de proteína (BSA), com coeficiente de linearidade (R^2)

ANEXO 3 - SDS-PAGE / WESTERN BLOTTING

A análise em SDS-PAGE foi realizada em placas de vidro e cerâmica de 10 x 10 x 0,06 cm de dimensões. As amostras analisadas foram preparadas adicionando 100 μL da fração em questão e 10 μL de *Tampão da amostra*:

- SDS 8,75%
- Sacarose 600 mM
- Tris HCl 50 mM pH 6,8
- β -mercaptoetanol 1,43 M
- EGTA-K 10 mM
- azul de bromofenol

As amostras foram aquecidas em seguida a aproximadamente 100°C por 2 minutos.

Os géis para análise foram preparados em uma cuba de acrílico com capacidade para 13 géis. Os géis foram feitos numa concentração de 10%. As amostras, após preparadas, foram aplicadas nos respectivos "poços" dos géis, utilizando microseringas (Hamilton), com volume variável. Os géis foram montados na cuba (Hofer Mighty Small II), e como tampão eletrodo foi usado o seguinte protocolo:

- Tris-HCl pH 8,3 25 mM
- EDTA 2 mM
- Glicina 200 mM
- SDS 2,5 mM

Foi aplicado também um padrão de massa molecular (SDS-6H, Sigma) que contém: cadeia pesada de miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase-b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa).

Após aplicação, ligava-se a cuba à fonte (BIO-RAD Power Pac 1000), onde a eletroforese foi realizada sob uma corrente constante de 25 miliampères. Alguns minutos antes da frente de bromofenol sair do gel, este foi retirado e corado com solução corante:

- Comassie Brilliant Blue – R-250
- Metanol 50%
- Ácido acético 40%

Posteriormente foi retirado o excesso de corante por uma solução descorante:

- Metanol 30%
- Ácido acético 10%

Segundo Gershoni e Palade (1983), a técnica de Immunoblotting pode ser dividida em duas etapas: transferência da banda protéica do gel para a matrix e a decoração do epítipo com o anticorpo específico. O método de transferência usado foi o conhecido como "wet blotting", no qual um sanduíche de gel-matrix é submerso no tampão de transferência para ser eletrotransferido. A eletrotransferência foi realizada com "BioRad Mini Trans-Blot transfer cell", utilizando-se o seguinte tampão de transferência:

- Tris-HCl 15,6 mM
- Glicina 120 mM

Géis SDS-PAGE 10% e membrana de nitrocelulose Hybond ECL (amersham pharmacia biotech) foram utilizados na eletrotransferência. Foi utilizado anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina que reage com o substrato "bromochloroindolyl phosphate - nitro blue tetrazolium" para liberar um precipitado púrpura escura estável.

ANEXO 4 - DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DE POLIPEPTÍDEOS

SDS-PAGE é freqüentemente utilizado para determinar a massa molecular relativa (M_r) de um polipeptídeo uma vez que sua migração no gel é geralmente proporcional a massa do polipeptídeo. A estimativa do massa molecular dos polipeptídeos de interesse foi feita utilizando uma curva de calibração obtida através de uma curva plotada com a migração relativa (R_f) dos polipeptídeos presentes no padrão de massa molecular, e o logaritmo (\log) de cada massa molecular correspondente. O cálculo de cada R_f seguiu a seguinte equação:

$$R_f = \frac{\text{Distância de migração dos padrões a partir da origem do gel}}{\text{Distância de migração da origem do gel até a frente de corrida do gel}}$$

A massa molecular do polipeptídeo de interesse foi calculado pela leitura do R_f do mesmo no gráfico plotado com os polipeptídeos do padrão de massa molecular. Um exemplo de gráfico plotado de R_f por \log do massa

molecular pode ser encontrado na figura 3. É importante lembrar que este tipo de cálculo não é 100% confiável, pois alguns polipeptídeos migram de forma anômala.

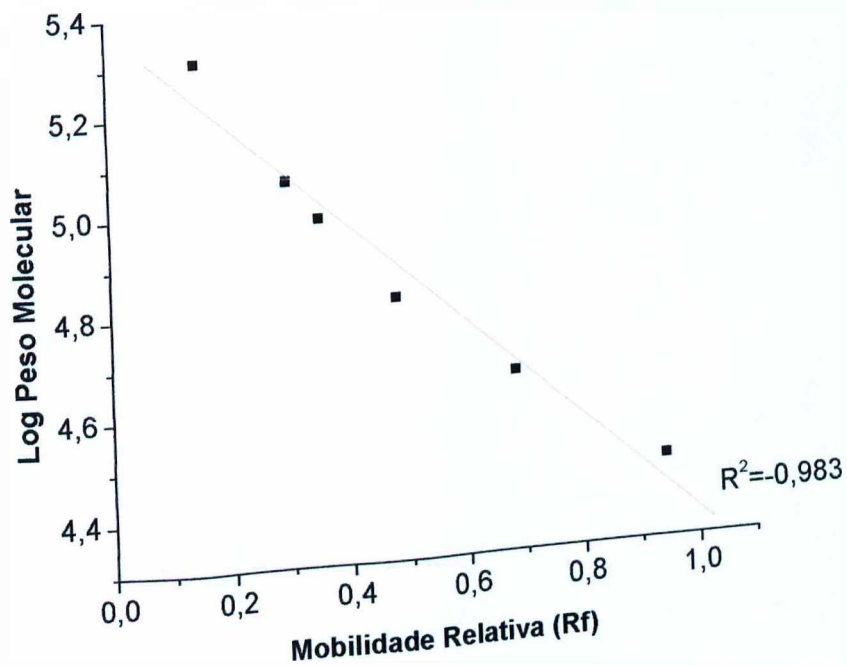


FIGURA 3: Curva padrão de determinação de massa molecular, com coeficiente de linearidade (R^2). Padrões de massa molecular: cadeia pesada de miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase-b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa).

ANEXO 4 - ENSAIO DE DIGESTÃO PROTEOLÍTICA COM TRIPSINA

A tripsina é uma protease que quebra ligações específicas entre lisina (ou arginina) e um outro aminoácido. Os ensaios de digestão enzimática com tripsina de pâncreas bovino (Sigma) foram procedidos de acordo com uma proporção pré-definida de cada componente. Após a determinação da

concentração protéica da amostra, calculávamos uma concentração 200 vezes menor de tripsina. A amostra foi então incubada a 37°C com tal concentração de tripsina, e 20 mM de cálcio, por um tempo pré-definido. Ao fim deste tempo a reação de digestão era interrompida com aprotinina 1% e gelo. Logo após o ensaio de digestão, a amostra era ensaiada para quantificação de atividade Mg^{2+} -ATPásica, conforme descrito anteriormente.