

MON  
577.112  
F866 c  
TES/mem

**PAULA MENDES DE FREITAS**

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS POLIPEPTÍDEOS DE UMA  
FRAÇÃO ATPase ISOLADA DE ENCÉFALO DE RATA**

**DIRBI/UFU**



1000184227

UBERLÂNDIA-MG  
JUNHO 1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MON  
577.112  
F866 C  
725/60  
v.1

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS POLIPEPTÍDEOS  
DE UMA FRAÇÃO ATPase ISOLADA DE ENCÉFALO DE  
RATA**

**PAULA MENDES DE FREITAS**

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

UBERLÂNDIA-MG  
JUNHO 1997



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Campus Umuarama Bloco 2E Sala 37

38.400-902, UBERLÂNDIA - MG

## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

1 - TÍTULO DA TESE: Caracterização parcial dos polipeptídeos de uma fração ATPase isolada de encéfalo de rata

2 - ALUNO: Paula Mendes de Freitas

3 - PROFESSOR ORIENTADOR: Milton Vieira Coelho

4 - DATA: 01/ 07/ 97

5 - BANCA EXAMINADORA:

Titular Milton Vieira Coelho

Titular Foued Salmen Espíndola

Titular Luiz Claudio Cameron

Suplente Enilza Maria Espreáfico

Suplente Carlos Alberto de Oliveira

6 - APRESENTAÇÃO: Início - 14:06 Término - 14:56

7 - TEMPO DE ARGUIÇÃO: Início - 14:56 Término - 16:40

8 - CONCEITO ATRIBUÍDO POR EXAMINADOR:

1º Membro da Banca A

2º Membro da Banca A

3º Membro da Banca A

Conceito Final: A

9 - OBSERVAÇÕES: \_\_\_\_\_

10 - ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA:

Milton Vieira Coelho  
Foued Salmen Espíndola  
Luiz Claudio Cameron

11 - RESERVADO AO COLEGIADO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS POLIPEPTÍDEOS  
DE UMA FRAÇÃO ATPase ISOLADA DE ENCÉFALO DE  
RATA**

Aluna: Paula Mendes de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

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

UBERLÂNDIA-MG

JUNHO 1997

*À minha filha Flavianna, pelo amor incondicional e compreensão necessária durante toda esta fase.*

*Ao meu namorado Luiz Henrique, pelo companheirismo, amor e estímulo que sempre me dedicou.*

*Aos meus pais, Paulo e Seloisa, com minha gratidão por todo o amor e respeito profissional.*

*À minha irmã Selaine, com muito carinho, pela sua ajuda que tornou possível a minha formação profissional.*

*"Uma queda não é uma derrota; uma batalha ganha não é o fim de uma luta. Em toda caminhada, tropeçamos e caímos, mas com as pedras do caminho edificamos o futuro. Cada queda é um estímulo para nos erguermos; cada vitória é um prenúncio de outras que virão. E é com amor que nos levantamos sempre, amparados pela mão de Deus."*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar os meus passos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Milton Vieira Coelho, pela orientação e liberdade de expressão concedidas durante o desenvolvimento desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola pelo apoio e colaboração constantes.

Ao Prof. Dr. L. C. Cameron, da Universidade do Rio de Janeiro, pelo interesse e valiosa contribuição na discussão deste trabalho.

À equipe do Prof. Dr. Luis Ricardo Goulart, desta universidade, pela disponibilidade com que sempre nos atendeu.

À equipe do Prof. Dr. Roy Edward Larson e da Prof<sup>a</sup> Dra. Enilza Maria Espreáfico, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela gentil doação de anticorpos.

Ao CEBIM, VALLÉE e à FUNDAP pelo fornecimento dos animais.

Ao Departamento de Genética e Bioquímica desta universidade através de seus docentes, funcionários e colegas de pós-graduação.

Aos professores do laboratório de bioquímica pela ajuda e incentivo fornecidos.

Aos técnicos do laboratório de bioquímica, Sebastiana e Cleuber, pelo precioso apoio.

Aos técnicos, Helinho e Reis, que sempre ajudaram com relação aos animais e reagentes.

À minha amiga e companheira inseparável, Ana Cecília Silva Santos, pela amizade sincera e por todos os momentos que vivenciamos juntas.

Às minhas amigas e colegas de trabalho, Eliana Valéria Patussi e Ana Grace Brito pelo incentivo durante todo este período.

Aos colegas de grupo Jair Junior e Fátima pela convivência harmoniosa e produtiva.

Aos demais colegas de mestrado que direta ou indiretamente contribuíram: Veri, Cristiane, Regildo, Robson, Gismar, Márcia Aguiar, Márcia Borges, Alessandra, Elaine, Fábio, Warley, Maurício, Marcelo entre outros.

Aos meus queridos amigos, Sílvia e Marcelo, que além da amizade de toda uma vida, contribuíram com acessoria na parte de informática.

E a todos aqueles que participaram colaborando para a consecução de nossos objetivos.

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

Coordenadora de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABS	- Absorvância
AE	- Atividade específica
4-2 AEBSF	- 4-(2-aminoetil)benzeno-sulfonil fluoreto
AMP-PNP	- Adenil 5' - imidodifosfato
AT	- Atividade total
ATP	- Adenosina - 5' - trifosfato
ATPase	- Adenosina trifosfatase
BCIP	- 5 - bromo, 1 - cloro, 3 - indolil fosfato
BSA	- Soro albumina bovina
CaM	- Calmodulina
CaM-quinase II	- Proteína quinase dependente de $Ca^{2+}$ /calmodulina
C-terminal	- Carboxi-terminal
DEAE	- Dietilaminoetil
DTT	- Ditioneitol
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	- Ácido etilenoglicol-bis-( $\beta$ amino etil éter), N, N', - tetracético
EHNA	- Eritro (-2- hidroxil -3 nonil) adenina
GDP	- Guanosina 5' - difosfato
GTP	- Guanosina 5' - trifosfato
MAP	- Proteína associada com microtúbulos
Mr	- Massa molecular relativa
NBT	- Nitro blue tetrazolium
NEM	- N-etilmaleimida
nmoles	- nanomoles
N-terminal	- Amino terminal
PC	- fosfoceleulose

Pi	- Fosfato inorgânico
PMSF	- Fluoreto de fenilmetilsulfonila
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TBS	- Tampão tris/salina
TCA	- Ácido tricloroacético
TEMED	- N, N, N', N'- tetrametilenodiamino
TFP	- Trifluorperazina
Tris	- Tris-(hidroximetil) aminometano

## ÍNDICE

<b>1- Introdução</b>	01
1.1- Citoesqueleto	01
1.2- Fodrina	05
1.3- Motores Moleculares	10
1.3.1- Miosina	10
1.3.2- Dineína	14
1.3.3- Cinesina	18
<b>2- Objetivos</b>	22
<b>3- Materiais e métodos</b>	23
3.1- Preparação das proteínas	23
3.1.1- Purificação parcial de uma ATPase de encéfalo de ratas	23
3.1.2- Separação dos polipeptídeos da fração PC em CaM-Agarose	26
3.2- Métodos analíticos	27
3.2.1- Dosagem de proteínas	27
3.2.2- Ensaio de atividade ATPásica	28
3.2.3- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)	30
3.2.4- Determinação do peso molecular dos polipeptídeos por SDS-PAGE	32
3.2.5- Transferência eletroforética de proteínas do gel de poliacrilamida para papel de nitrocelulose - Western blot	34
3.2.6- Identificação de polipeptídeos ligantes de calmodulina	36

3.2.7- Ensaio de cosedimentação com F-actina	36
3.2.8- Ensaio de proteólise por calpaína	37
<b>4- Resultados</b>	<b>38</b>
4.1- Perfil eletroforético da preparação de ATPase de encéfalo de ratas	38
4.2- Ensaio de cosedimentação da fração PC com actina	41
4.3- Ensaio de proteólise da fração PC com calpaína	41
4.4- Identificação do polipeptídeo principal da fração PC	44
4.5- Separação dos polipeptídeos da fração PC por coluna de afinidade a calmodulina	48
4.6- Ensaio de ligação à calmodulina	48
4.7- Identificação de CaM-quinase II na fração PC	53
<b>5- Discussão</b>	<b>56</b>
<b>6- Conclusões</b>	<b>62</b>
<b>7- Resumo</b>	<b>63</b>
<b>8- Summary</b>	<b>65</b>
<b>9- Referências bibliográficas</b>	<b>67</b>

## **1-INTRODUÇÃO**

### **1.1-CITOESQUELETO**

As células eucarióticas possuem em seu interior uma complexa rede tridimensional denominada citoesqueleto. O citoesqueleto coordena muitas estruturas na célula desempenhando muitos tipos de transporte e motilidade celular (Fulton & L'Ecuyer, 1993). Dentre estes processos podemos citar seu importante papel na manutenção da morfologia celular, divisão, migração, adesão, interação célula-célula e possivelmente a transferência de informação desde a membrana plasmática até o núcleo, afetando assim a expressão gênica (Niggli & Burger, 1987).

A mais fina das fibras são os microfilamentos que possuem um diâmetro de 7 nanômetros e são constituídos de subunidades da proteína actina em homopolímeros lineares (para revisão ver Carraway & Carraway, 1989). A G-actina é uma proteína globular de peso molecular 45 kDa, a qual polimeriza em filamentos formando F-actina (figura 1), para realizar muitas de suas funções biológicas (para revisão ver Hennessey et al, 1993). Cada molécula de actina é uma proteína de cadeia simples contendo cerca de 375 resíduos de aminoácidos, cuja sequência e propriedades bioquímicas são altamente conservadas evolutivamente, estando presente em todas as células eucarióticas (para revisão ver Kabsch & Vandekerckhove, 1992). A actina

purificada, mantida em condições de baixa força iônica, é um monômero que por adição de sal e ATP, polimeriza espontaneamente formando F-actina. Este processo é reversível e é base de muitos procedimentos de purificação (para revisão ver Kabsch & Vandekerckhove, 1992). A polimerização da actina é um processo dinâmico regulado pela hidrólise de um nucleotídeo (no caso, o ATP) ligado firmemente ao monômero (para revisão ver Kabsch & Vandekerckhove, 1992; Mullins et al, 1996). Nas células, aproximadamente a metade da actina é mantida sob a forma monomérica (Korn, 1982) através da sua ligação com proteínas tais como a profilina (para revisão ver Way & Weeds, 1990; Hennessey et al, 1993). A polimerização pode ser regulada por sinais externos que se ligam a receptores na superfície celular (Lassing & Lindberg, 1985). As diversas formas poliméricas da actina estão em equilíbrio dinâmico entre elas e com a G-actina monomérica. Logo abaixo das membranas celulares existem formas de actina que não estão definidas nem como microfilamentos nem como G-actina. São filamentos curtos de actina (protofilamentos) que por exemplo unem tetrâmeros de espectrina. O estado da actina na célula e a organização dos microfilamentos depende de um grupo diverso de proteínas ligantes de actina (para revisão ver Carraway & Carraway, 1989).

Os microtúbulos são filamentos tubulares de cerca de 24 nanômetros de diâmetro constituídos de heterodímeros de tubulina  $\alpha$  e  $\beta$  (figura 2). Cada dímero é um complexo de aproximadamente 100 kDa (para revisão ver Cassimeris et al, 1987). Os microtúbulos são encontrados em cílios e flagelos em estruturas altamente organizadas nas quais nove pares de microtúbulos externos estão dispostos ao redor de dois microtúbulos

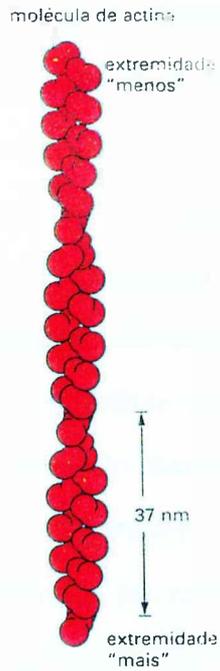
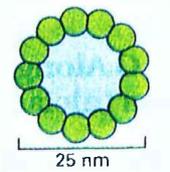
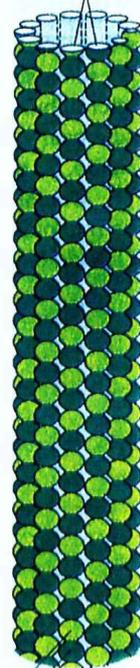


Figura 1: Esquema de um filamento de actina (Alberts et al, 1997).



protofilamentos



molécula de tubulina

$\alpha$

$\beta$

Figura 2: Esquema de um microtúbulo em secção transversal e vista lateral (Alberts et al, 1997).

centrais (para revisão ver Wallin & Strömberg, 1995). Esta organização, a qual é mantida por diversas proteínas associadas, está envolvida na geração de movimentos de flexão dos cílios e flagelos usando a energia proveniente da hidrólise do ATP pela dineína, uma ATPase associada a microtúbulos (para revisão ver Carraway & Carraway, 1989). Os microtúbulos são também encontrados no citoplasma das células, irradiando do centro da célula durante a intérfase (Brenner & Brinkley, 1981). Durante a mitose estes microtúbulos são despolimerizados e microtúbulos do fuso mitótico são formados (Connolly & Kalnins, 1980). A polimerização ou despolimerização dos microtúbulos durante a mitose ou formação dos cílios, envolve o crescimento de microtúbulos dos centros de organização de microtúbulos, nas regiões dos centríolos ou corpos basais, respectivamente (figura 3). Polimerização e estabilização parecem ser estimuladas por duas classes de proteínas associadas a microtúbulos (Connolly & Kalnins, 1980): MAPs, que são polipeptídeos grandes, > 250 kda, e proteínas tau, 60-70 kda (para revisão ver Carraway & Carraway, 1989). MAPs estão envolvidas na associação dos microtúbulos com microfilamentos (Sattilaro et al, 1981; Griffith & Pollard, 1982) e dos microtúbulos com neurofilamentos (Leterrier, 1982). Tanto os microtúbulos quanto os microfilamentos são polares, ou seja, as duas extremidades do polímero são diferentes. Há uma extremidade de crescimento rápido, denominada de extremidade positiva (+) para microtúbulos e microfilamentos e a extremidade de crescimento lento é a extremidade negativa (-) (Mitchison, 1992). Esta diferença é usada pela célula para promover a organização espacial. Em uma célula típica, como o fibroblasto, os microtúbulos estão dispostos com as extremidades positivas na periferia da célula (Heidemann et al, 1981) (figura 4). A polaridade também controla a direção de movimento das proteínas motoras (Mitchison, 1992) como, por exemplo, a dineína que é responsável pelo transporte centrípeto (Paschal & Vallee, 1987; Lin & Collins, 1992), enquanto a

cinesina realiza movimento centrífugo (Vale et al, 1985) (figura 4). A maioria dos microtúbulos nos axônios possui a mesma orientação que nos cílios e flagelos, com as extremidades (+) próximas à terminação do axônio (sinapse) e as extremidades (-) próximas ao corpo celular (Heidemann et al, 1981; Burton & Paige, 1981). O transporte de organelas nos axônios ocorre em dois sentidos, anterógrado (para longe do corpo celular) e retrógrado (para perto do corpo celular), correspondendo ao movimento para as extremidades (+) e (-) dos microtúbulos nos axônios, respectivamente (para revisão ver Vallee & Shpetner, 1990). Com relação aos centrossomos, as extremidades (+) são distais e as (-) são proximais (Salmon & Wadsworth, 1986; McIntosh, 1984) (figura 4).

Os filamentos intermediários são estruturas fibrilares de aproximadamente 10 nm e suas proteínas constituintes variam de acordo com o tipo celular (para revisão ver Carraway & Carraway, 1985).

## 1.2-FODRINA

O citoesqueleto celular está envolvido em processos fundamentais como divisão celular, migração celular, mudança de forma, adesão celular, interação célula-célula e possivelmente também na transferência de informação da membrana plasmática para o núcleo, assim afetando a expressão gênica (para revisão ver Niggli & Burger, 1987). Para exercer estas funções, os filamentos precisam estar ancorados à membrana plasmática. Investigações do mecanismo de interação membrana-citoesqueleto foram realizadas inicialmente em eritrócitos, que constituem um excelente modelo experimental de estudo. Várias proteínas do citoesqueleto, que antes acreditava-se serem únicas dos eritrócitos, foram encontradas largamente distribuídas em diferentes tipos celulares (para revisão ver Niggli & Burger, 1987).

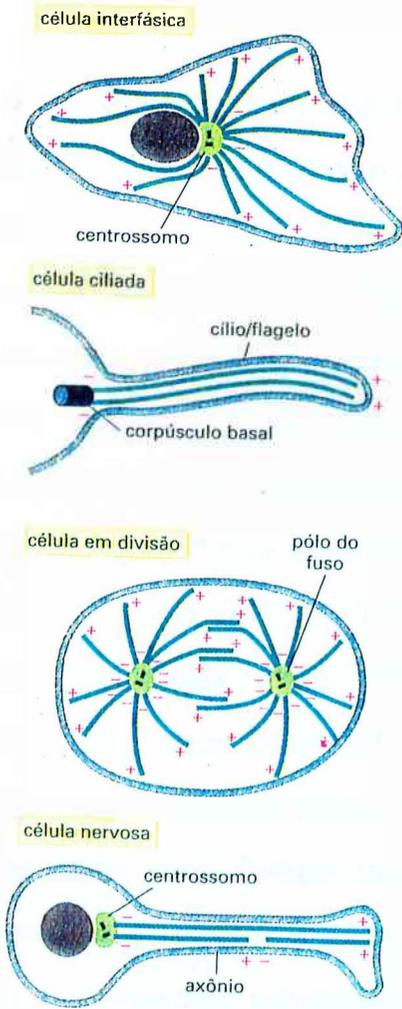


Figura 3: A orientação dos microtúbulos nas células (Alberts et al, 1997).

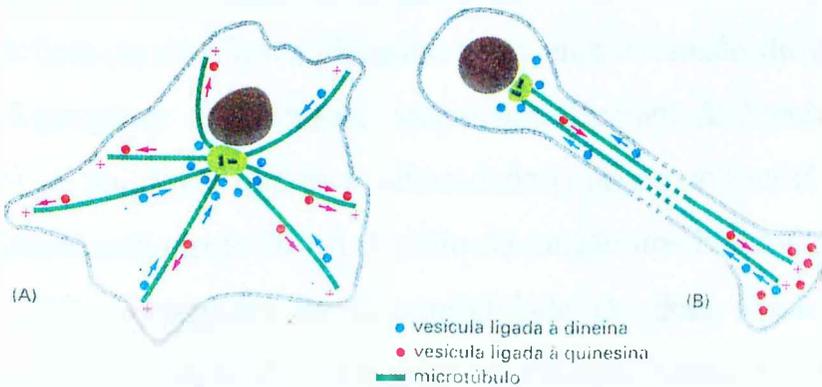


Figura 4: Transporte de vesículas pela cinesina e dineína em um fibroblasto (A) e no axônio de um neurônio (B) (Alberts et al, 1997 ).

Espectrina, o maior componente da membrana esquelética do eritrócito, é um heterodímero composto de duas cadeias polipeptídicas: 240 ( $\alpha$ ) e 220 ( $\beta$ ) kDa (Shotton et al, 1979). As duas cadeias são homólogas, com aproximadamente 35% de identidade, consistindo em unidades repetidoras com 106 aminoácidos (Speicher, 1986; Speicher & Marchesi, 1984) (figura 5). As subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  associam-se para formar heterodímeros por interações nas extremidades das subunidades e por contatos em múltiplos sítios ao longo de seus comprimentos (Morrow et al, 1980; Shotton et al, 1979; Tyler et al, 1979) (figura 5). No heterodímero as duas subunidades estão alinhadas lado a lado, em uma orientação antiparalela, para constituir uma molécula flexível com 100 nm de comprimento (Shotton et al, 1979). As extremidades onde dois dímeros associam-se para formar um tetrâmero (200 nm de comprimento) são denominadas cabeças (Shotton et al, 1979). A consequência do arranjo cabeça-cabeça das subunidades é que a espectrina não forma filamentos prolongados como ocorre em uma organização cabeça-cauda (figura 6). As subunidades estão arranjadas com a extremidade N-terminal de cada subunidade  $\alpha$  associada com a extremidade C-terminal de cada subunidade  $\beta$  no heterodímero adjacente (Harris & Lux, 1980; Speicher et al, 1983II; Speicher et al, 1983; Speicher et al, 1982). O tetrâmero de espectrina liga-se à superfície da membrana plasmática por uma interação de alta afinidade com fosfoproteínas denominadas anquirinas (Bennett & Stenbuck, 1979a) (figura 6). A anquirina liga-se à subunidade  $\beta$  da espectrina (Calvert et al, 1980), aproximadamente 200 Å do sítio de junção dos heterodímeros (Tyler et al, 1979). Apesar da disponibilidade de dois sítios ligantes de anquirina por tetrâmero de espectrina, a estequiometria na superfície da membrana é de uma molécula de anquirina ligada por tetrâmero de espectrina (Goodman & Weidner, 1980). A anquirina é, por sua vez, ligada à membrana através do domínio citoplasmático da proteína transmembrana

banda 3 (Bennett & Stenbuck, 1979b) (figura 6). A proteína banda 3 atua como um transportador de ânion, o qual possibilita ao  $\text{CO}_2$  cruzar a membrana dos eritrócitos em processo de troca com o  $\text{Cl}^-$  (Jay & Cantley, 1986; Jennings, 1985). Devido ao fato dos tetrâmeros de espectrina serem formados pela associação cabeça-cabeça dos heterodímeros, outras proteínas ligantes são requeridas para formar a rede bidimensional da membrana esquelética (figura 6). Protofilamentos consistindo de 20 monômeros de actina (Shen et al, 1984) e a proteína 4.1 (fosfoproteína periférica da membrana de eritrócitos) ligam-se às extremidades terminais do tetrâmero de espectrina (Tyler et al, 1979), unindo moléculas de espectrina adjacentes em uma rede bidimensional (para revisão ver Goodman & Shiffer, 1983 e Goodman et al, 1984) (figura 6). Sendo assim, os tetrâmeros de espectrina associam-se com oligômeros de actina via proteína 4.1. Esta rede é ligada à membrana principalmente pela anquirina e proteína 4.1. A proteína 4.1 liga-se tanto ao domínio citoplasmático da banda 3 quanto da glicoforina, outra proteína transmembrana (para revisão ver Goodman & Zagon, 1986; Bennett, 1990).

A fodrina compreende 2-3% da proteína total em homogeneizado de cérebro e suas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  tem 240 e 235 kDa respectivamente (para revisão ver Goodman & Zagon, 1986). Há um sítio ligante de calmodulina na subunidade  $\alpha$  (para revisão ver Bennett, 1990). Em células neuronais, fodrina move ao longo do axônio com velocidade similar a actina, miosina e proteínas baseadas em microtúbulos (Levine & Willard, 1981). Estudos *in vitro* demonstraram que a fodrina pode afetar certos processos incluindo polimerização de G-actina, ligação cruzada de F-actina (Glenney et al, 1982) e a modulação da atividade  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPásica da actomiosina de músculo (Wang et al, 1987). Wang et al (1987) demonstraram que fodrina é capaz de estimular a atividade  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPásica de actomiosina de músculo liso de uma maneira dependente de cálcio e calmodulina. Esta estimulação

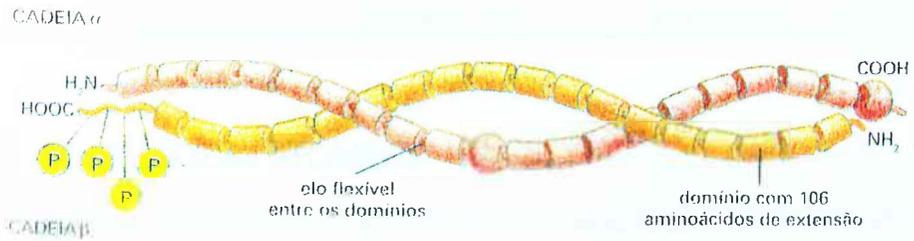


Figura 5: Heterodímero de espectrina de eritrócitos humanos (Alberts et al, 1997).

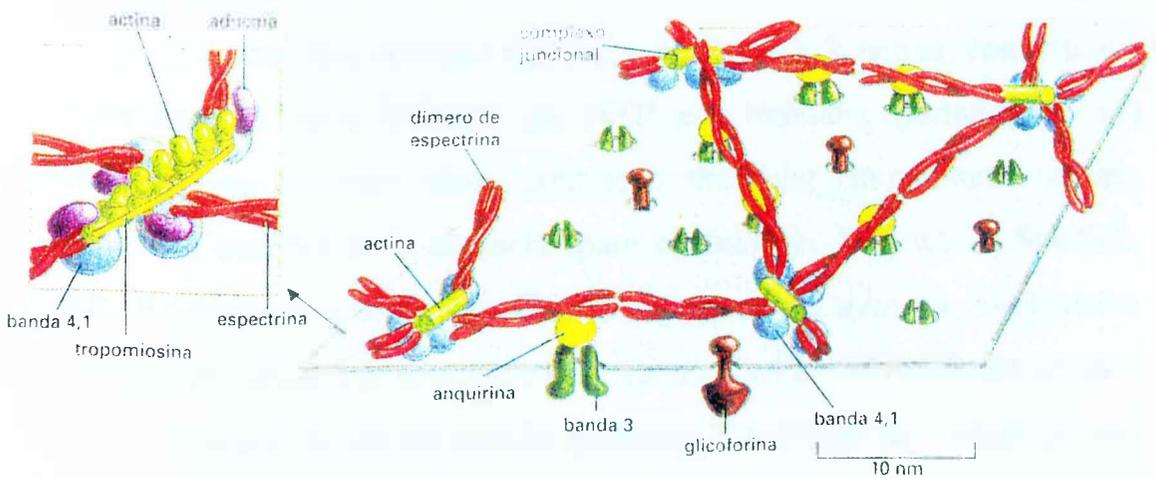


Figura 6: O citoesqueleto, baseado em espectrina, sobre o lado citoplasmático da membrana do eritrócito humano (Alberts et al, 1997).

depende de outras condições específicas incluindo uma concentração crítica de fodrina, pré-incubação da actina e miosina a 30°C, miosina fosforilada e a presença de tropomiosina. Estas observações sugerem um papel da fodrina na regulação da contração do músculo liso, além de demonstrar o efeito de cálcio e calmodulina na função da fodrina (Wang et al, 1987).

### **1.3-MOTORES MOLECULARES**

Muitos movimentos em células eucarióticas dependem da ação dos motores moleculares baseados no citoesqueleto. Esses motores são enzimas que acoplam a hidrólise de ATP ou outro nucleotídeo trifosfato para geração de força e movimento relativo aos filamentos do citoesqueleto, ambos actina ou microtúbulos (Scholey, 1990). Os motores moleculares são classificados em três famílias de proteínas: As miosinas utilizam filamentos de actina como trilhos para movimento, enquanto as cinesinas e dineínas movem sobre trilhos de microtúbulos (para revisão ver Endow & Titus, 1992).

#### **1.3.1-MIOSINA**

As miosinas, sob interação com filamentos de actina, convertem a energia liberada pela hidrólise do ATP em trabalho, participando em atividades bem diversas como contração muscular, movimento celular, citocinese e transporte de organela (para revisão ver Warrick & Spudick, 1987). Existe uma grande superfamília de genes de miosina amplamente expressa. Em adição à já bem caracterizada miosina II convencional de duas cabeças (domínio motor ou porção globular N-terminal da cadeia pesada responsável pela atividade ATPásica e motora) e com capacidade de formar filamentos em músculo e células não musculares, foram identificadas ao menos dez classes de miosinas. Em vertebrados no mínimo sete das dez

classes são expressas e muitas miosinas podem ser expressas em um único tipo de célula (para revisão ver Mooseker & Cheney, 1995).

A miosina clássica de músculo foi denominada miosina II por apresentar duas cadeias polipeptídicas, que possuem duas cabeças na extremidade N-terminal. A dimerização ocorre pelo enrolamento de duas cadeias em  $\alpha$ -hélices ( $\alpha$ -hélice super espiralada) formando uma estrutura torcida na região C-terminal, coordenada pela associação dos aminoácidos hidrofóbicos distribuídos regularmente ao longo da cadeia. A estrutura torcida forma, em solução, um bastão estendido e, por isso, esta parte da molécula é denominada domínio em bastão ou cauda. A cauda destas miosinas é capaz de formar filamentos (figura 7). As miosinas II estão presentes em células musculares e não musculares (para revisão ver Korn & Hammer, 1988; Warrick & Spudick, 1987).

A primeira miosina encontrada em *Acanthamoeba castellanii* foi denominada miosina I. Esta miosina possui uma única cadeia pesada e não é capaz de formar filamentos por falta da cauda em  $\alpha$ -hélice super espiralada, presente nas miosinas da classe II (Pollard & Korn, 1973) (figura 8). Miosinas com a mesma característica da enzima de *Acanthamoeba* foram identificadas na borda em escova das células epiteliais do intestino de vertebrados (Collins & Borysenko, 1984) e em *Dictyostelium* (Titus et al, 1989). Por extrapolação, todas as miosinas que não possuíam uma cauda em  $\alpha$ -hélice super espiralada capaz de formar filamentos eram consideradas membros da classe I de miosinas (para revisão ver Korn & Hammer, 1988; Pollard et al, 1991). Assim, as miosinas foram divididas em duas categorias: Convencionais ou miosinas II, que inclui todas as miosinas de duas cabeças e uma cauda em  $\alpha$ -hélice super espiralada capaz de formar filamentos e não convencionais ou miosinas I para as miosinas que não são capazes de formar filamentos (Cheney & Mooseker, 1992).

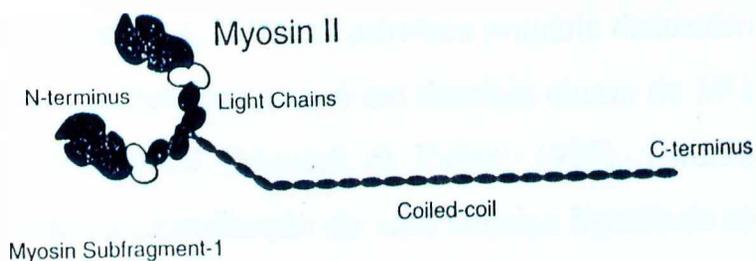


Figura 7: Esquema da miosina II representando as duas cadeias pesadas e quatro cadeias leves (Gulick & Rayment, 1997).

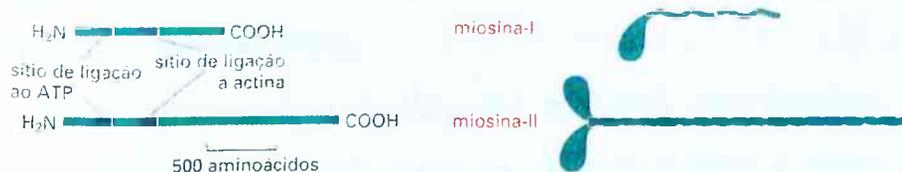


Figura 8: Esquema de dois membros da família das miosinas mostrando seus sítios conservados de ligação ao ATP e à actina (Alberts et al, 1997).

Através da análise de mutações, outras miosinas foram descobertas como, o gene *Nina C* de *Drosophila* (Montell & Rubin, 1988), o gene *Dilute* de camundongo (Mercer et al, 1991) e o gene MYO2 de levedura (Johnston et al, 1991). A estrutura primária deduzida do gene *Nina C* revelou que esta miosina possui um domínio cinase de 30 kDa (nariz) na extremidade N-terminal (Montell & Rubin, 1988). Estudos bioquímicos também levaram à identificação de uma miosina ligante de calmodulina em cérebro de vertebrados denominada inicialmente de p190 (Larson et al, 1986; Larson et al, 1988; Larson et al, 1990; Espíndola et al, 1992 e Espreafico et al, 1992). Devido à diversidade destas miosinas, a classificação em apenas dois grupos (miosinas I e II) não era adequada. Uma comparação detalhada da sequência de aminoácidos dos domínios cabeças nas miosinas levou à conclusão de que essas proteínas deveriam ser agrupadas em várias classes distintas (Espreafico et al, 1992; Goodson & Spudich, 1993; para revisão ver Mooseker, 1993). Para esta classificação foi proposta uma ordem cronológica das descobertas de novas classes de miosinas (Cheney et al, 1993). Em geral, miosinas de uma determinada classe ou subclasse mostram domínios cauda estruturalmente similares sugerindo que cada classe está associada com um conjunto específico de funções conservadas (para revisão ver Mooseker & Cheney, 1995).

Todas as miosinas conhecidas mostram um domínio cabeça estruturalmente conservado onde estão os sítios de ligação à actina e ATP, um domínio pescoço (ou regulatório) onde ligam-se as cadeias leves e um domínio cauda específico de cada classe (para revisão ver Mooseker & Cheney, 1995). O domínio “pescoço” consiste de um número variável de repetições em série de uma sequência de aproximadamente 23 resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos, cujos resíduos na maioria conservados estão de acordo com o consenso IQxxxRGxxxRK (Mercer et al, 1991; Cheney & Mooseker, 1992). Em algumas miosinas, tais como a miosina I da

borda em escova do intestino de vertebrados e a miosina V de cérebro de galinha, os motivos IQ constituem potenciais sítios de ligação para a calmodulina (Espreafico et al, 1992; Mooseker et al, 1991). Uma característica do domínio cauda de miosinas de diferentes classes é a presença de regiões que formam segmentos de  $\alpha$ -hélice enrolados em espiral, o que sugere que estas miosinas formam dímeros. Outra propriedade atribuída aos domínios cauda de diversas miosinas não convencionais é a habilidade de interagir com membranas diretamente por ligação a fosfolípidos ou hipoteticamente via receptores protéicos; mais surpreendentemente outras miosinas possuem domínios (SH3, cinase, PH e ativadores de GTPase) usualmente associados com transdução de sinal (para revisão ver Mooseker & Cheney, 1995).

As miosinas geralmente expressam alta atividade  $K^+$ -EDTA ATPase (atividade na presença de alta concentração de KCl e sem cátions divalentes), alta atividade  $Ca^{2+}$ -ATPase e baixa atividade  $Mg^{2+}$ -ATPase (Pollard, 1982; Nascimento et al, 1996). Quando a miosina interage com filamentos de actina ocorre estimulação de sua atividade  $Mg^{2+}$ -ATPase (Pollard, 1982). A interação de miosina e actina de células não musculares produz uma força de deslizamento semelhante à do músculo, embora a quantidade e a organização da miosina nessas células seja bem inferior à das células musculares (Johnson, 1985; Korn & Hammer, 1988).

### 1.3.2-DINEÍNA

As dineínas foram primeiro descritas como estruturas semelhantes a braços laterais presentes em pares de microtúbulos externos de axonemas de cílios e flagelos (Gibbons, 1965). Esses braços são ATPases responsáveis pela geração de movimentos de deslizamento entre microtúbulos e causam o batimento de cílios e flagelos. Os nove pares externos de microtúbulos, que carregam os braços de dineína, estão fixos em

um anel por ligações entre os pares chamadas ligações de nexina. Em muitos casos, este anel rodeia um núcleo central de 2 microtúbulos isolados formando a estrutura característica 9 + 2 de um axonema (figura 9). Essas estruturas forçam e coordenam o deslizamento de microtúbulos induzido pela dineína axonemal para gerar a ondulação flagelar (Gibbons, 1981).

As dineínas de modo geral possuem entre 1000 e 2000 kDa (para revisão ver Vallee, 1993). Estudos ultraestruturais mostram que cada molécula de dineína possui duas ou três cadeias pesadas onde encontram-se as cabeças globulares contendo os sítios para hidrólise de ATP e ligação de microtúbulos (para revisão ver Schroer, 1994). As cabeças são ligadas por hastes a um domínio basal, o qual é tão largo quanto as cabeças mas bem menos definido estruturalmente. Em adição, as dineínas contem um número altamente variável de cadeias intermediárias e leves (para revisão ver Vallee, 1993). A cadeia pesada de várias dineínas contém múltiplos sítios ligantes de nucleotídeos (envolvidos na ligação de  $\gamma$ -fosfato e hidrólise em ATPases e GTPases), que foram denominados P-loops (Walker et al, 1982; Saraste et al, 1990). Na cadeia pesada ( $\beta$ ) de dineína flagelar de ouriço-do-mar foram observados 5 P-loops (Gibbons et al, 1991; Ogawa, 1991). Um P-loop, encontrado perto da extremidade N-terminal, não foi encontrado em outras formas de cadeia pesada de dineína. Os outros 4 P-loops estão espaçados em intervalos de aproximadamente 35 a 40 kDa na região central do polipeptídeo (para revisão ver Holzbaur & Vallee, 1994). A primeira sequência entre os quatro elementos P-loop é muito conservada entre as formas de dineína analisadas até o momento e pode ser o principal sítio da hidrólise de ATP (Gibbons et al, 1991).

A forma citoplasmática da dineína foi isolada de tecido cerebral como o motor molecular responsável pelo transporte axonal retrógrado de organelas, assim como o transporte centrípeto de endossomos, lisossomos e

elementos do complexo de Golgi (figura 10) nas células em geral (Paschal & Vallee, 1987; para revisão ver Holzbaur & Vallee, 1994).

A dineína citoplasmática de cérebro bovino é composta de 2 cadeias pesadas de 532 kDa, 3 cadeias intermediárias de 74 kDa e 4 cadeias leves de 59, 57, 55 e 53 kDa (para revisão ver Holzbaur & Vallee, 1994) (figura 11).

A atividade ATPásica de dineína citoplasmática de cérebro é estimulada por microtúbulos (Paschal et al, 1987). Microtúbulos agem como ativadores específicos e saturáveis da atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica da dineína. A ativação é fortemente afetada por força iônica e pela presença de agentes redutores durante a purificação. A estimulação da atividade ATPásica por microtúbulos diminui com o aumento da força iônica sendo abolida por concentrações de KCl acima de 200 mM, provavelmente por um decréscimo na afinidade da dineína por microtúbulos (Shpetner et al, 1988). A atividade ATPásica da dineína de cérebro requer cátions divalentes sendo mais alta na presença de magnésio do que de cálcio (Pratt et al, 1984; Shpetner et al, 1988). A dineína de cérebro difere de outras formas de dineína na especificidade de nucleotídeos. Ela hidroliza GTP, CTP e TTP em taxas maiores que ATP. Entretanto, hidrólise destes nucleotídeos não foi estimulada por microtúbulos (Shpetner et al, 1988) e diferente do ATP não gerou movimento (Paschal & Vallee, 1987; Shpetner et al, 1988). A atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica estimulada por microtúbulos e a translocação de microtúbulos "in vitro" pela dineína citoplasmática são inibidas por EHNA, NEM e vanadato, mas não por oligomicina, azida ou ouabaína (Paschal & Vallee, 1987).

Figura 9: O arranjo dos microtúbulos em um cílio ou flagelo (Alberts et al, 1997).

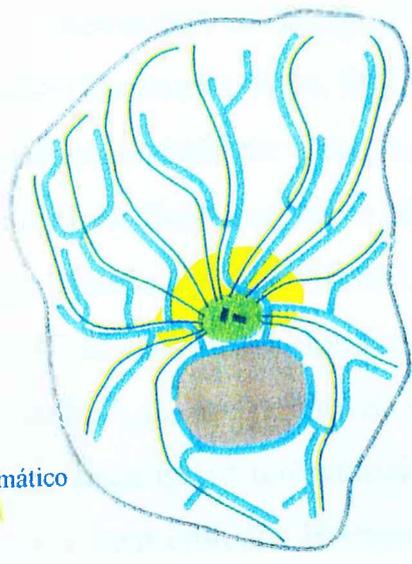
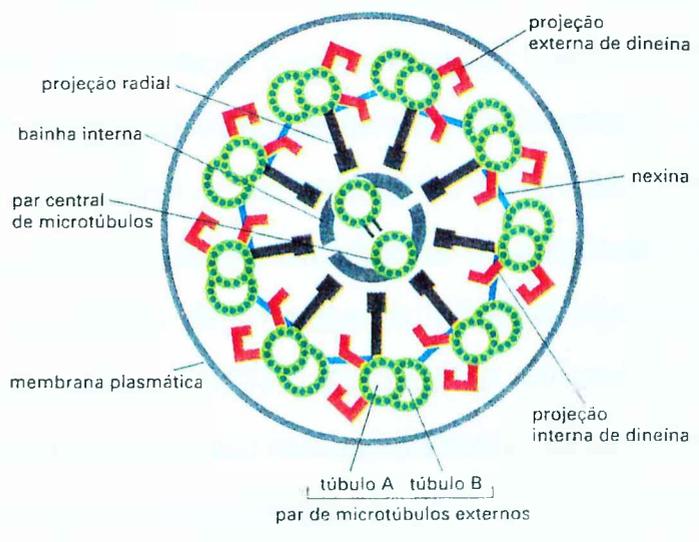
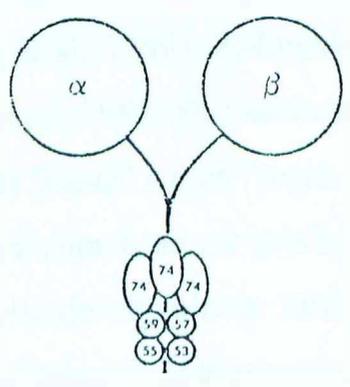


Figura 10: O posicionamento das organelas pelos microtúbulos (Alberts et al, 1997).

- microtúbulos
- retículo endoplasmático
- aparato de Golgi
- núcleo
- centrossomo

MICROTUBULE BINDING



MEMBRANE BINDING

Figura 11: Modelo estrutural da dineína de cérebro (Vallee et al, 1989).

### 1.3.3-CINESINA

A primeira cinesina foi descoberta em axoplasma de lula por Vale et al (1985). O principal passo na purificação envolve a cosedimentação da proteína com microtúbulos na presença de um análogo do ATP, AMP-PNP (Vale et al, 1985). Esta proteína purificada inicialmente de axoplasma de lula (Vale et al, 1985), de cérebro de vertebrados (Vale et al, 1985; Kuznetsov & Gelfand, 1986; Amos, 1987) e de ovos de ouriço-do-mar (Scholey et al, 1985), promove o movimento dos microtúbulos em superfície de vidro e de partículas ao longo de microtúbulos.

A cinesina converte a energia liberada da hidrólise do ATP em movimento unidirecional ao longo de microtúbulos (Goldstein, 1991), sendo responsável pelo movimento centrífugo (Vale et al, 1985) e pelo transporte axonal anterógrado (Endow & Titus, 1992) (figuras 4 e 11).

A cinesina isolada de vários tecidos é geralmente um tetrâmero ( $\alpha_2\beta_2$ ) que consiste de duas cadeias  $\alpha$  pesadas e duas cadeias  $\beta$  leves. As cadeias pesadas possuem entre 110-134 kDa, enquanto as cadeias leves possuem entre 60-80 kDa e estão localizadas na extremidade C-terminal de cada cadeia pesada. A cadeia pesada da cinesina consiste de três domínios principais: 1)-A cabeça que é um domínio globular visível por microscopia eletrônica situado na extremidade N-terminal de cada cadeia pesada (Amos, 1987; Hirokawa et al, 1989; Scholey et al, 1989). Cada cabeça é composta de aproximadamente 450 aminoácidos e contém os sítios para a ligação de microtúbulos e a hidrólise de ATP (Yang et al, 1989). 2)-Ligada à cabeça globular está a longa cauda, 50-60 nm (Amos, 1987; Hirokawa et al, 1989; Scholey et al, 1989), a qual consiste de uma "haste" e uma "região terminal". A cauda é uma  $\alpha$ -hélice super espiralada com base na predição de sua sequência de aminoácidos, espectroscopia de dicroísmo circular (CD), microscopia eletrônica e experimentos de ligação química cruzada (para revisão ver Goldstein, 1991). 3)-A extremidade C-terminal da cadeia pesada

dobra-se formando uma segunda região globular onde estão os sítios de ligação das cadeias leves e da carga transportada pela proteína (para revisão ver Cole & Scholey, 1995) (figura 12). As cinesinas mostram seqüências da cauda distintas umas das outras (figura 12). Aparentemente cada uma destas tem um papel fisiológico diferente se ligando a diversos constituintes. As diferentes caudas podem funcionar para a ligação de diferentes cargas a serem transportadas (para revisão ver Goldstein, 1991).

Um grande número de cinesinas foram identificadas pela análise genética de mutantes (Enos & Morris, 1990; Otsuka et al, 1991; para revisão ver Goldstein, 1991) (figura 12). Estas proteínas tem uma região de aproximadamente 340 aminoácidos que é 35-45% idêntica à região cabeça da cinesina de axoplasma de lula (Enos & Morris, 1990; para revisão ver Goldstein, 1991). Geralmente esta região é encontrada nas extremidades N-terminal de cinesinas identificadas em diversos organismos tais como: 1)- O produto do gene *BimC* (bloqueado em mitose C) de *Aspergillus nidulans* foi determinado pela análise do DNA de um mutante mitótico sensível à temperatura que é incapaz de completar a divisão nuclear (Enos & Morris, 1990). 2)- A identificação do gene *Cut7* de *Schizosaccharomyces pombe* foi feita pela análise do mutante *cut7-446* que mostrou uma formação anormal do fuso em temperatura restritiva (Hagan & Yamagida, 1990). 3)- *Eg5* foi a primeira cinesina relatada em vertebrados. Foi identificada como um RNA que é adenilado e desadenilado durante o desenvolvimento de *Xenopus* (Le Guellec et al, 1991). 4)- Mutantes *Unc-104* de *C. elegans* (Otsuka et al, 1991) mostram uma acumulação de numerosas vesículas no corpo celular neuronal (Hall & Hedgecock, 1991).

Certas cinesinas como *Kar3* e *Ncd* possuem a região motora na extremidade C-terminal (figura 12). Mutantes do gene *Kar3* (Karyogamy-defective) de *Saccharomyces cerevisiae* exibem eficiência reduzida da fusão nuclear durante a conjugação (Meluh & Rose, 1990). Estudos do mutante

*Ncd* (non claret disjunctional) de *Drosophila melanogaster* mostram alterações na cor dos olhos e na distribuição de cromossomos durante a meiose (Endow et al, 1990). Assim como os mutantes *Ncd*, *Nod* (no distributive disjunction) causa a não separação e a perda dos cromossomos na meiose (Zhang et al, 1990).

A cinesina purificada de cérebro bovino é uma molécula tetramérica do tipo  $\alpha_2\beta_2$ , com duas subunidades  $\alpha$  de 120 kDa e duas subunidades  $\beta$  de 62 kDa (Kuznetsov et al, 1988). Na ausência de microtúbulos, a cinesina apresenta atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase maior do que  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, sendo ambas as atividades estimuladas por microtúbulos (Kuznetsov & Gelfand, 1986). Microtúbulos estimulam a atividade  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPásica da cinesina cerca de 15 vezes e tal estimulação é independente de cálcio. Entretanto, na presença de CaM a atividade  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPásica estimulada por microtúbulos foi inibida (50%) por cálcio. Certas cadeias leves de cinesina são proteínas ligantes de calmodulina. As cadeias leves e pesadas da cinesina podem ser fosforiladas diferentemente pela proteína quinase dependente cAMP e proteína quinase C “in vitro” e “in vivo”. A fosforilação da cinesina causa um aumento do efeito de microtúbulos na atividade ATPásica, de cerca de duas vezes, sugerindo que tal modificação pode intensificar o movimento de organelas baseado na cinesina. A fosforilação da cinesina (cAMP-PK) reduz a ligação de cálcio/CaM às cadeias leves e obstrui o efeito de cálcio/CaM na atividade ATPásica (Matthies et al, 1993).

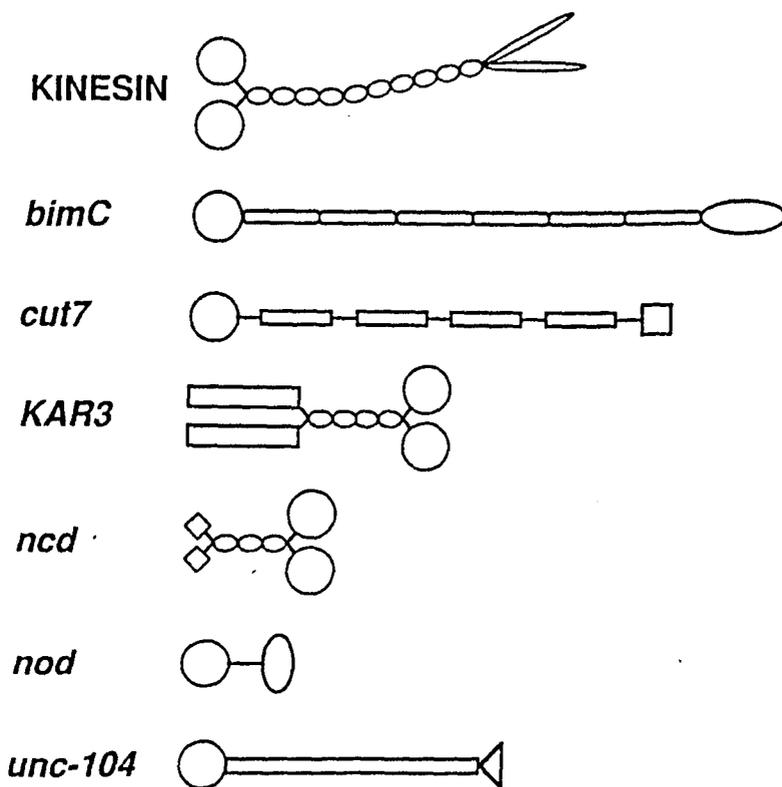
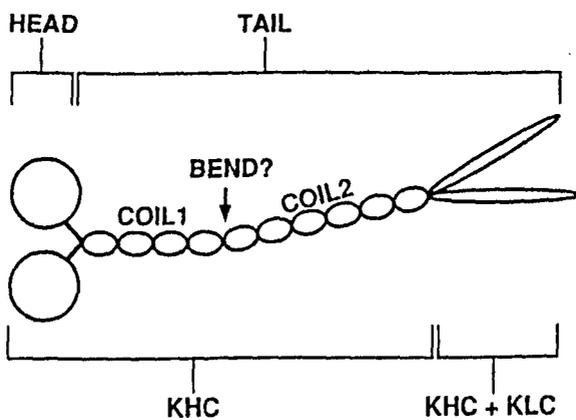


Figura 12: Diagrama esquemático da cinesina e das possíveis estruturas de vários membros da superfamília de cinesinas (Goldstein, 1991).

## 2-OBJETIVOS

Nosso laboratório tem se dedicado ao estudo de identificação e purificação de ATPases como uma maneira preliminar de se caracterizar motores moleculares, que são ATPases que realizam movimento através dos filamentos de actina ou microtúbulos. Como exemplo, duas ATPases foram recentemente isoladas em nosso laboratório: uma  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  nucleotidase trifosfatásica de testículo de coelho (Patussi, 1996) e uma fração (PC) enriquecida em atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica obtida a partir de encéfalo de ratas (Santos, 1997). Dados de Santos (1997) mostram que esta fração hidrolisa preferencialmente ATP, não possui atividade K-EDTA ATPásica, possui atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica que não é estimulada nem por actina nem por calmodulina e é maior que a atividade  $Ca^{2+}$ -ATPásica. O principal polipeptídeo, situado acima da cadeia pesada de miosina II em SDS-PAGE, parece ser o responsável pela atividade ATPásica presente na fração. Contudo, não se descarta a possibilidade da atividade ATPásica estar associada com outro polipeptídeo da fração PC. Por estes motivos, nós propomos, neste trabalho, verificar se o referido polipeptídeo principal é responsável pela atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica da fração e caracterizar, além deste, outros polipeptídeos de possível interesse na fração.

### **3-MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1-Preparação de proteínas**

##### **3.1.1-Purificação parcial de uma ATPase a partir de sobrenadante de encéfalo de ratas (Método de Santos, 1997 )**

Ratas fêmeas foram sacrificadas por decaptação e os encéfalos removidos rapidamente para solução salina gelada e em seguida homogeneizados em tampão de extração pH 8,0: Imidazol-HCl 50 mM; EDTA 10 mM (para quelar íons tais como  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  requeridos por proteases); DTT 1,0 mM (para evitar oxidação de grupos SH e formação de pontes dissulfeto); sacarose 0,25 mM (para evitar lise de membranas melhorando o perfil cromatográfico); 4-2 AEBSF 0,3 mM; benzamidina 1,0 mM e aprotinina 1,0 mM, sendo estes 3 últimos utilizados como inibidores de proteases. Todos estes cuidados visam a manutenção das proteínas numa conformação o mais natural possível. Foram utilizados 20 cérebros sendo 7 ml de tampão para cada cérebro. A homogeneização foi realizada em rotação máxima, de 10 em 10 cérebros, usando microtritador Tecnal modelo TE 102, conectado a motor elétrico do tipo Marconi. O homogeneizado foi colocado em tubos de poliestireno com capacidade para

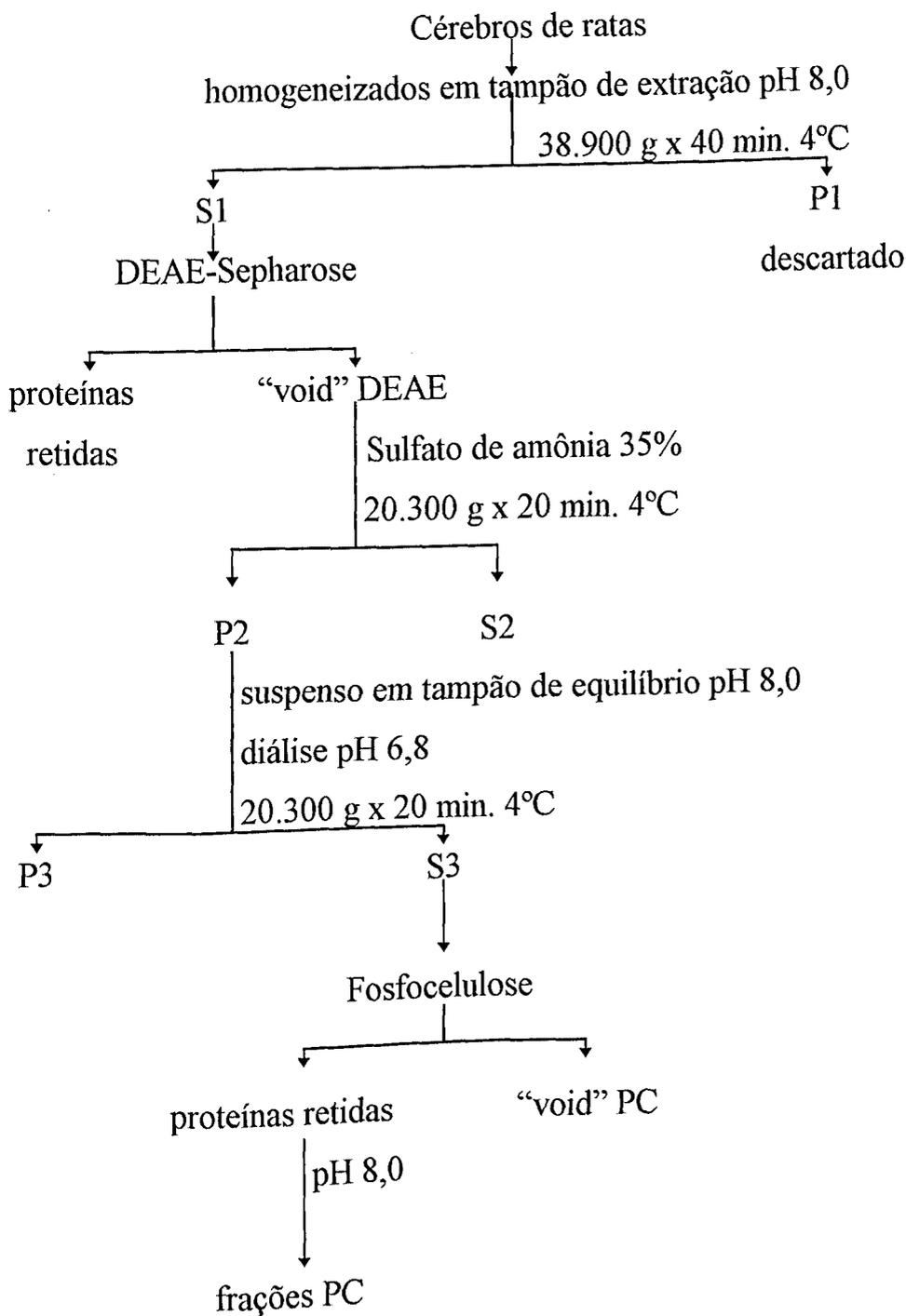
50 ml cada e centrifugado a 38.900 g por 40 minutos numa centrífuga refrigerada a 4°C.

A fração P1 (fração precipitada obtida após a centrifugação), contendo debris celulares e outras proteínas, foi descartada. A fração S1 (fração solúvel obtida após a centrifugação) filtrada em gaze foi primeiramente aplicada em coluna de DEAE-Sepharose (2,9 cm x 4,9 cm; 25 ml) pois como observado por Santos (1997), o S1 aplicado diretamente na resina de fosfocelulose causou um empacotamento desta resina. A coluna de DEAE-Sepharose foi previamente equilibrada com 250 ml de tampão de equilíbrio pH 8,0 (Imidazol-HCl 50 mM; EDTA; 0,2 mM; DTT 0,2 mM) utilizando um fluxo de 16 gotas/minuto. O "void" da coluna foi submetido a precipitação com sulfato de amônia 35% de saturação adicionado lentamente sob agitação moderada. Em seguida foi centrifugado a 20.300 g por 20 minutos a 4°C. A fração S2 e a fração P2 (suspensa em 30 ml do mesmo tampão de equilíbrio pH 8,0) foram dializadas "overnight" contra 1 litro de tampão de diálise pH 6,8 (Imidazol-HCl 50 mM; EDTA 0,5 mM; 2-mercaptoetanol 1,0 mM) para cada, sendo realizadas 3 trocas deste tampão. A diálise teve como objetivo retirar o sulfato de amônia e corrigir o pH para posterior aplicação em coluna de fosfocelulose.

A fração P2 dializada foi centrifugada a 20.300 g por 20 minutos a 4°C. A fração P3 resultante desta centrifugação foi suspensa em 10 ml de tampão de equilíbrio e guardada em geladeira, enquanto a fração S3 foi aplicada em coluna de fosfocelulose (1,8 cm x 6,9 cm; 14 ml) previamente equilibrada com 140 ml de tampão de equilíbrio pH 6,8 com um fluxo de 12 gotas/minuto. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 100 ml do mesmo tampão. Proteínas retidas foram eluídas com 50 ml de tampão de eluição pH 8,0 (Imidazol-HCl 50 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 1,0 mM; 4-2 AEBSF 0,3 mM; benzamidina 1,0 mM). Foram coletadas frações de 3 ml (esquema 1).

As frações foram analisadas em SDS-PAGE e conforme o perfil eletroforético e a atividade ATPásica aproximadamente 5 tubos foram reunidos recebendo a denominação de fração PC.

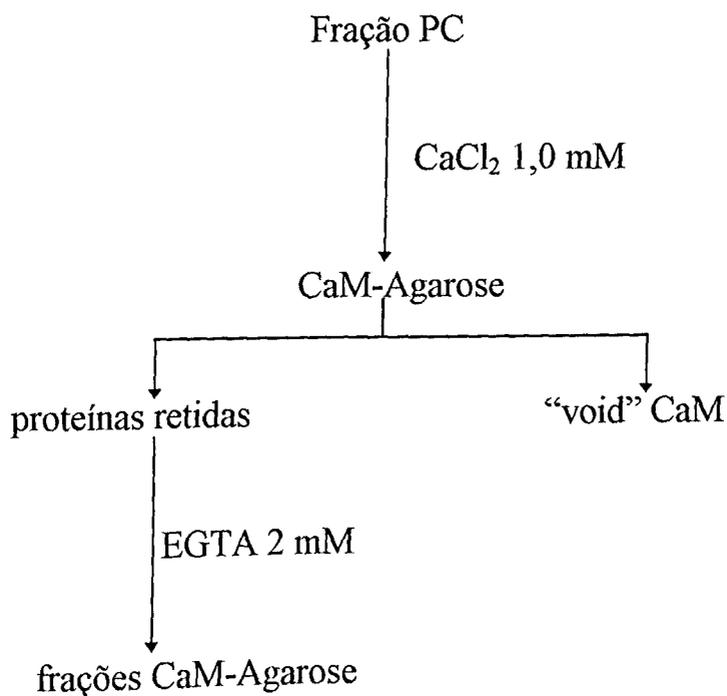
**Esquema 1: Purificação parcial de ATPase a partir de sobrenadante de encéfalo de ratas (Método de Santos, 1997)**



### 3.1.2-Separação dos polipeptídeos da fração PC por coluna de afinidade a calmodulina

Na fração PC foi adicionado  $\text{CaCl}_2$  1mM e esta foi aplicada, com fluxo de 12 gotas/minuto, em coluna de CaM-Agarose (1,1 cm x 4,0 cm; 5 ml) previamente equilibrada com 20 ml de **tampão I** (Imidazol-HCl 50 mM pH 8,0; DTT 1,0 mM; 4-2 AEBSF 0,3 mM; benzamidina 1,0 mM) contendo  $\text{CaCl}_2$  0,2 mM. A coluna foi lavada com 20 ml do mesmo tampão. O “void” da coluna de CaM-Agarose foi guardado em geladeira. Proteínas retidas foram eluídas com 20 ml do tampão I contendo EGTA 2 mM. Foram coletadas frações de 1,5 ml (esquema 2). O “void” e as frações obtidas foram analisados em SDS-PAGE.

#### Esquema 2: Separação dos polipeptídeos da fração PC por coluna de afinidade a calmodulina



### 3.2-Métodos analíticos

#### 3.2.1-Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando como padrão soro albumina bovina (SIGMA).

Para a dosagem foram utilizados 3 µl de S1; 10 µl de S3; 10 µl do “void” PC; 50 µl da fração PC; 100 µl do “void”, do lavado e das frações eluídas da coluna de afinidade (CaM-Agarose). Completou-se o volume para 100 µl com H<sub>2</sub>O destilada e foi adicionado em cada tubo, contendo a amostra, 3 ml do reagente de Bradford (100 mg de Coomassie blue G em 50 ml de etanol 95 %, misturados com 100 ml de ácido fosfórico 85 %, completando até um litro com água e posterior filtração). As dosagens foram realizadas em duplicatas. A absorbância foi medida espectrofotometricamente a 595 nm, após 3 minutos e antes de uma hora, contra um branco que contem o mesmo tampão da amostra. Foram utilizadas cubetas de quartzo. Para conversão da absorbância em concentração de proteína foi feita a regressão linear da curva padrão de soro albumina bovina realizada paralelamente à dosagem da amostra. A quantidade de proteína (5 a 30 µg) utilizada para construção desta curva está dentro da faixa de linearidade do método.

A concentração de proteína em mg/reação foi utilizada para cálculo da atividade específica do ensaio de atividade ATPásica.

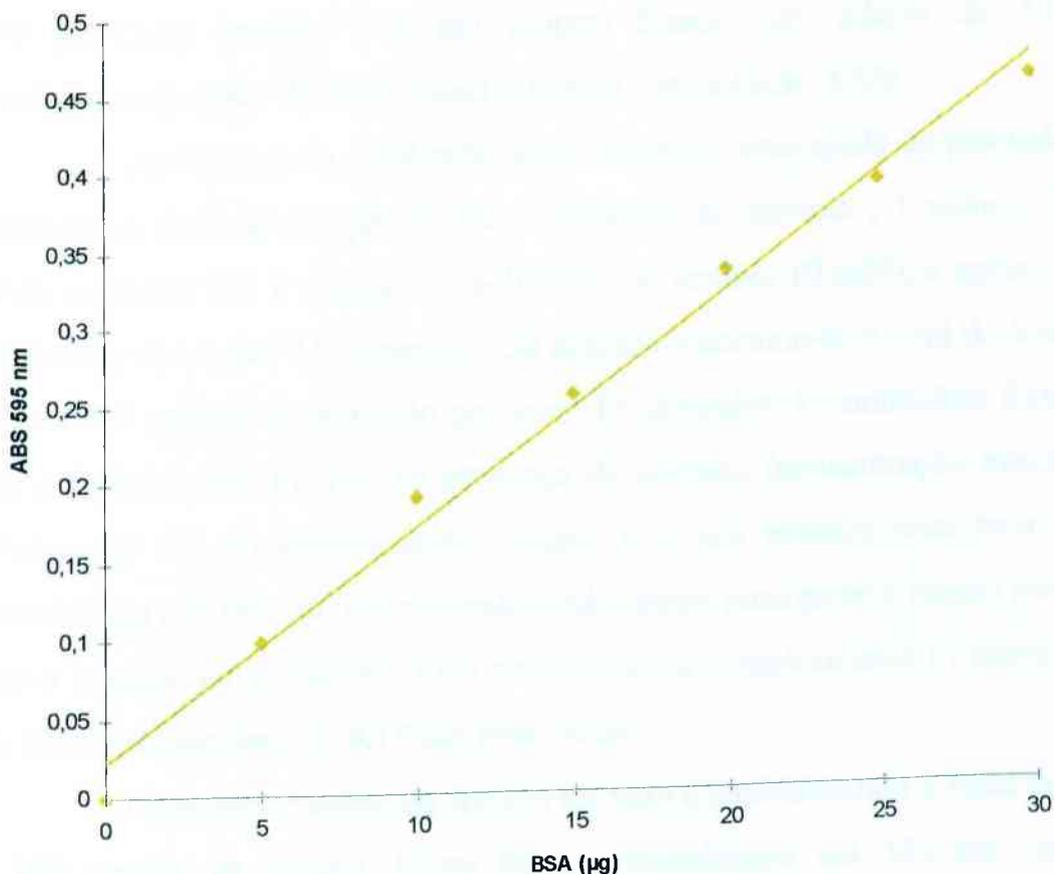


Figura 13: Curva padrão de soroalbumina bovina

### 3.2.2-Ensaio de atividade ATPásica

As atividades ATPásicas foram determinadas através de dosagem colorimétrica do ortofosfato inorgânico liberado da hidrólise do ATP (Heinonen & Lahti, 1981).

Para o ensaio da atividade Mg-ATPásica, o meio de reação contém: Imidazol-HCl 25 mM pH 7,0, KCl 60 mM, EGTA 1,0 mM, EDTA 1,0 mM, DTT, 0,2 mM e  $MgCl_2$  5 mM.

A cada tubo contendo 40 µl do meio de reação foram adicionados 140 µl da fração PC ou do “void” CaM-Agarose ou da fração CaM-

Agarose, completando-se com água desionizada para o volume de 180  $\mu$ l. Após a adição da fração, a reação foi iniciada com 20  $\mu$ l de ATP 10 mM e incubada a 37°C por tempo pré-determinado. O volume final da reação foi 200  $\mu$ l. Cada amostra teve seu próprio branco com adição de ATP imediatamente antes de interromper a reação com solução AAM.

Ao término da incubação acrescentou-se, com ajuda de pipetador automático, 2ml de solução AAM (2 volumes de acetona, 1 volume de ácido sulfúrico 5N, 1 volume de molibdato de amônio 10 mM), e agitou-se o tubo em vórtex por 15 segundos. Em seguida adicionou-se 0,2 ml de ácido cítrico 1M seguido de agitação por mais 15 segundos. O molibdato forma um complexo com Pi que, na presença de acetona (concentração mínima precisa ser 1/3 do volume final), origina uma cor amarela com pico de absorvância em 355 nm. Foi utilizado ácido cítrico para parar a reação antes que o excesso de molibdato livre na solução se complexasse com Pi liberado da quebra espontânea de ATP em meio ácido.

Uma curva padrão de fosfato foi feita compreendendo a faixa de 0 a 160 nmoles de fosfato. Nesta faixa a absorvância em 355 nm varia linearmente com a concentração de fosfato.

A absorvância das amostras foi medida em espectrofotômetro a 355 nm utilizando-se cubetas de quartzo. As leituras obtidas foram utilizadas para cálculo da atividade específica através da seguinte fórmula:

$$AE = \text{Abs. Amostra} \times \frac{1}{\text{Abs. Padrão}} \times 80 \text{ nmoles do padrão} \times \frac{1}{\text{tempo}} \times \frac{1}{\text{mg de prot.}}$$

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

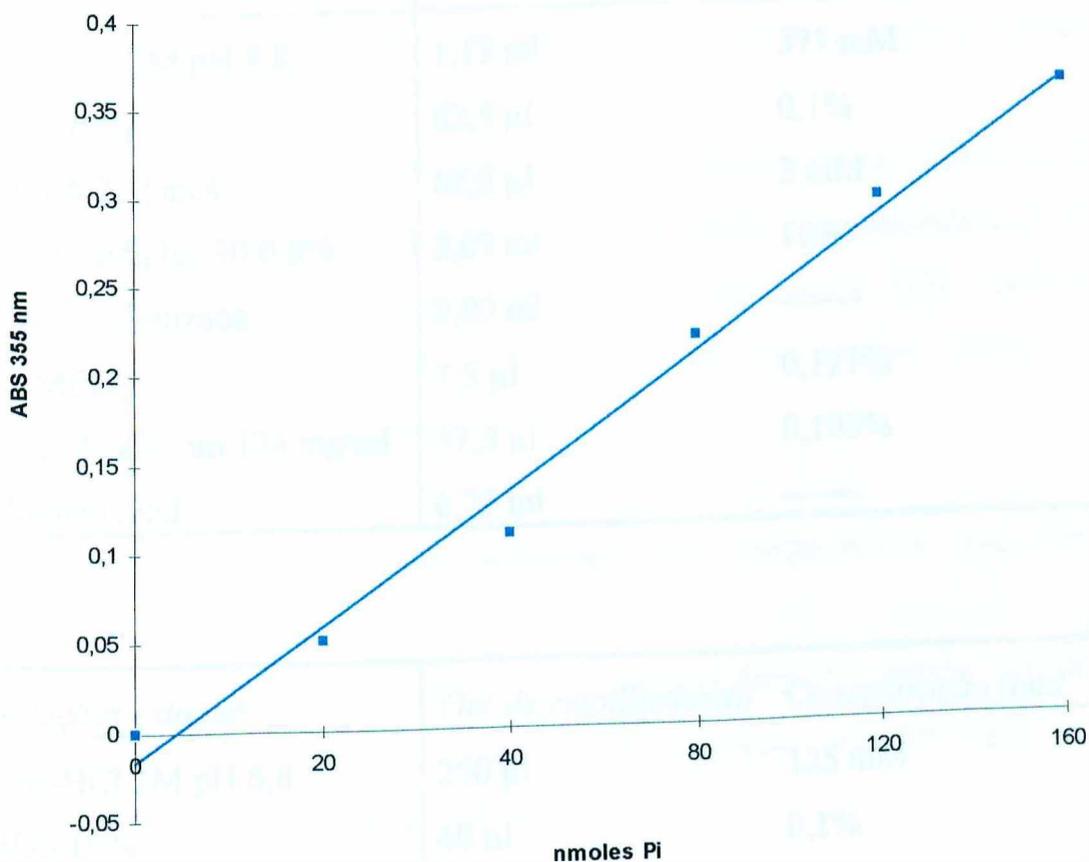


Figura 14: Curva padrão de fosfato

### 3.2.3-Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Métodos de Laemmli & Favre, 1973; Studier, 1973).

A eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS foi realizada em placa de vidro como descrito por Studier (1973). As dimensões do mini-gel foram 11 x 10 x 0,06 cm. Em 100  $\mu$ l de cada amostra foi adicionado 50  $\mu$ l de tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 1%, bromofenol 0,025% e glicerol 10%), 10  $\mu$ l de 2-mercaptoetanol e ferveu-se por 2 minutos em água em ebulição.

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

<i>Soluções estoque</i>	<i>Gel de separação 10%</i>	<i>Concentração final</i>
Tris-HCl 2M pH 8,8	1,17 ml	377 mM
SDS 10%	62,5 µl	0,1%
EDTA 200 mM	62,5 µl	2 mM
Acrilamida:bis 30:0,8%	2,07 ml	10%
Água desionizada	2,80 ml	-----
TEMED	7,5 µl	0,121%
Pers. de amônio 174 mg/ml	37,5 µl	0,105%
Volume total	6,21 ml	-----

<i>Soluções estoque</i>	<i>Gel de empilhamento</i>	<i>Concentração final</i>
Tris-HCl 2M pH 6,8	250 µl	125 mM
SDS 10%	40 µl	0,1%
EDTA 200 mM	40 µl	2 mM
Acrilamida:bis 30:0,8%	650 µl	5%
Água desionizada	2,96 ml	-----
TEMED	5 µl	0,125%
Pers. de amônio 174 mg/ml	35 µl	0,154%
Volume total	3,98 ml	-----

As placas contendo os mini-geis foram montadas em cubas apropriadas contendo o tampão eletrodo (Tris-HCl 100 mM pH 8,3, EDTA 7,8 mM, glicina 0,77 M e SDS 0,3%). O volume desejado de cada amostra foi aplicado no mini-gel com o auxílio de microseringa Hamilton. A eletroforese foi realizada com corrente constante de 40 miliamperes. Após a corrida, o gel foi fixado e corado por 10 minutos em solução corante: 0,2% de Coomassie brilliant blue R-250 em metanol 50% e ácido acético. O

excesso de corante do gel foi descorado em solução de metanol e ácido acético, 30 e 10% respectivamente. Para a secagem o gel foi colocado entre duas folhas de papel celofane embebidas em água ou ácido acético e presas por bastidores de madeira.

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

### 3.2.4-Determinação do peso molecular dos polipeptídeos por SDS-PAGE

A distância de migração dos polipeptídeos do padrão SDS-6H (SIGMA) foi medida. Os valores de migração relativa ( $R_f$ ) dos polipeptídeos do padrão foram calculados:

$$R_f = \frac{\text{distância que cada polipeptídeo migrou da origem do gel}}{\text{distância de migração da origem do gel até a frente de bromofenol}}$$

A curva de calibração foi construída com os valores  $R_f$  encontrados para cada polipeptídeo do padrão (EIXO X) versus os logaritmos dos seus correspondentes pesos moleculares (EIXO Y).

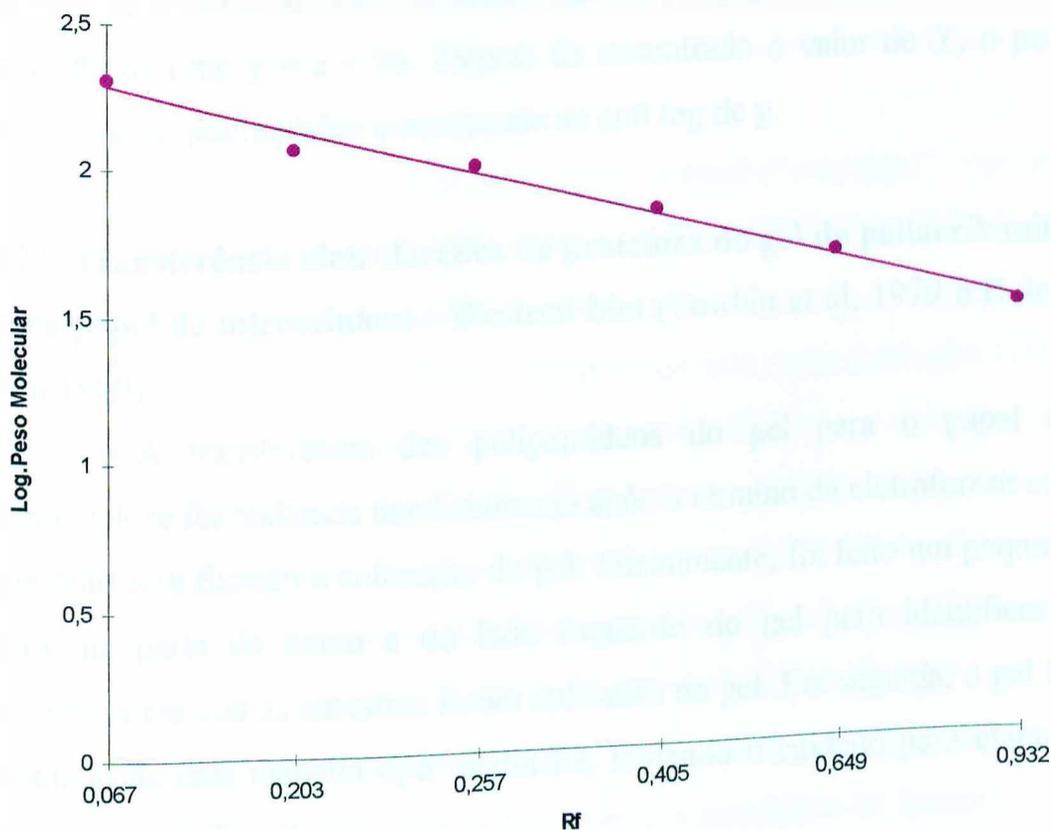


Figura 15: Curva de calibração dos polipeptídeos do padrão SDS-6H

A distância de migração de cada polipeptídeo de interesse foi medida e os Rf correspondentes foram calculados através da fórmula citada acima.

O ponto na curva de calibração que corresponde ao valor de Rf para o polipeptídeo de peso molecular desconhecido foi localizado. O valor no eixo Y que corresponde a este ponto é o logaritmo do peso molecular estimado para o polipeptídeo de interesse. Este logaritmo foi encontrado por regressão linear com os valores do eixo x (Rf dos polipeptídeos do padrão) e do eixo y (logaritmos dos pesos moleculares dos polipeptídeos do padrão) obtendo-se o coeficiente  $a$  (intercepto, onde a reta corta o eixo y), o coeficiente  $b$  (inclinação da reta) e o coeficiente  $r$  que avalia se a reta ficou

adequada (para isto o valor encontrado deve ser próximo de 1). Substituiu-se (em  $x$ ) o valor de  $R_f$  encontrado para o polipeptídeo de interesse na equação da reta:  $y = a + bx$ . Depois de encontrado o valor de  $Y$ , o peso molecular do polipeptídeo corresponde ao anti log de  $y$ .

### 3.2.5-Transferência eletroforética de proteínas do gel de poliacrilamida para papel de nitrocelulose - Western blot (Towbin et al, 1979 e Bittner et al 1980)

A transferência das polipeptídeos do gel para o papel de nitrocelulose foi realizada imediatamente após o término da eletroforese sem que houvesse fixação e coloração do gel. Inicialmente, foi feito um pequeno corte na parte de baixo e do lado esquerdo do gel para identificar a sequência em que as amostras foram aplicadas no gel. Em seguida, o gel foi montado de uma maneira tipo sanduíche, tomando o cuidado para evitar a formação de bolhas de ar.

O procedimento para montagem deste sanduíche foi o seguinte: Colocou-se sobre uma placa de acrílico perfurada, uma esponja, um papel de filtro grosso e o gel com o corte voltado para o lado direito. O papel de nitrocelulose também marcado com um corte no lado direito foi colocado sobre o gel. Completou-se o sanduíche com mais um papel de filtro, mais uma esponja e outra placa de acrílico perfurada.

Durante a montagem do sanduíche este foi mantido sempre molhado em tampão eletro-blot ( tris- HCl 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM e metanol 20%). O sanduíche, assim montado, era colocado na cuba com o lado da nitrocelulose voltado para o ânodo (+). A cuba foi totalmente preenchida com o mesmo tampão eletro-blot e colocou-se uma barra magnética dentro desta. A corrida foi realizada "overnight" em câmara fria usando corrente constante de 60 mA e mantendo agitação.

Após a transferência eletroforética, as fitas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau 0,2% em ácido acético 3% por 5 minutos e lavados com água desionizada. Os polipeptídeos do padrão foram marcados com uma agulha.

Posteriormente, a nitrocelulose foi incubada "overnight" com leite desnatado em pó (Molico) 5% dissolvido na solução TBS (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 150 mM e Tween 20 0,05%). Após o bloqueio, a nitrocelulose foi lavada 3 vezes (cada vez ficou 3 minutos agitando) com a solução TBS e incubada por uma hora com anticorpo primário diluído em solução TBS como recomendado pelo fabricante. Procedeu-se outra lavagem como já indicado acima. Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi incubada por uma hora com o anticorpo secundário diluído em solução TBS como recomendado pelo fabricante. Utilizou-se anti-IgG de coelho no caso de miosina V e fodrina. Para CaM-quinase II, fosfoserina e calmodulina foi utilizado anti-IgG de camundongo. Novamente a membrana foi lavada.

Para a revelação cobriu-se um tubo com papel alumínio e nele acrescentou-se 9,8 ml de tampão AP (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM e MgCl<sub>2</sub> 5 mM); 33 µl de BCIP e 66 µl de NBT. Em seguida, este conteúdo foi despejado sobre a membrana em recipiente vedado com papel alumínio para impedir a entrada de luz. Assim que a membrana foi marcada, a solução de NBT/BCIP foi descartada e a membrana lavada com água desionizada.

### 3.2.6-Identificação de polipeptídeos ligantes de calmodulina na fração PC

As fitas de nitrocelulose, após o bloqueio, foram incubadas por uma hora em 5 ml de Tris-HCl 25 mM pH 7,0; DTT 1,0 mM; CaM 15 µg/ml contendo EGTA 1,0 mM ou CaCl<sub>2</sub> 1,0 mM. Na solução TBS para as lavagens foi acrescentado, em cada caso, EGTA 1,0 mM ou CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM. As fitas de nitrocelulose foram incubadas por 2 horas, na presença (CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM) e ausência (EGTA 1,0 mM) de cálcio, com anticorpo contra calmodulina. A incubação por uma hora com anti-IgG de camundongo e a revelação também foram realizadas na presença e ausência de cálcio.

### 3.2.7-Ensaio de cosedimentação com F-actina (Pollard & Cooper, 1982)

O ensaio de cosedimentação foi realizado incubando a fração PC com F-actina. Para a obtenção de actina polimerizada (F-actina) diluiu-se o volume da alíquota de G-actina em igual volume de tampão A (Imidazol-HCl 20 mM pH 7,2; KCl 150 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM) com DTT 2 mM (concentração final). A incubação foi feita por 30 minutos à temperatura ambiente em repouso.

Os tubos contendo 16,7 µg da fração PC e 60 µl de tampão B (tampão A diluído uma vez) foram incubados com 14,4 µg de F-actina na presença e ausência de ATP 5 mM. Foram feitos os controles da amostra com e sem ATP na ausência de actina. Em todos os tubos, a concentração final de DTT foi corrigida para 2 mM. O volume final dos tubos foi corrigido para 250 µl com água desionizada.

Os tubos foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente e em seguida foram centrifugados por 15 minutos a 12.000 g em câmara fria. Os precipitados resultantes foram suspensos em 50 µl de tampão B, acrescentando-se 25 µl de tampão de amostra, 5 µl de 2-mercaptoetanol e nos sobrenadantes 125 µl de tampão de amostra e 25 µl de 2-

mercaptoetanol. A diferente diluição dos precipitados e sobrenadantes foi posteriormente corrigida pelo volume aplicado em SDS-PAGE.

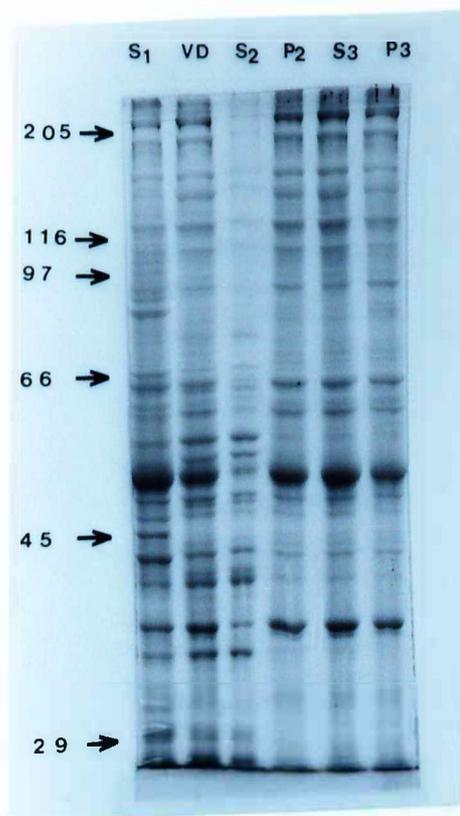
### 3.2.8-Ensaio de proteólise por calpaína

Para este ensaio colocou-se em um tubo: DTT 5 mM;  $\text{CaCl}_2$  5 mM e 77,6  $\mu\text{g}$  da fração PC (concentrações finais). Iniciou-se a reação com o acréscimo de 40  $\mu\text{l}$  de uma solução de calpaína 40  $\mu\text{g/ml}$  (SIGMA). O volume final foi corrigido para 600  $\mu\text{l}$  com água desionizada. A reação foi finalizada, em intervalos de tempos pré-estabelecidos, retirando-se alíquotas de 80  $\mu\text{l}$  para tubos contendo 40  $\mu\text{l}$  de tampão de amostra e 8  $\mu\text{l}$  de 2-mercaptoetanol. O controle foi realizado adicionando-se 45  $\mu\text{l}$  de tampão de amostra antes de 14,9  $\mu\text{g}$  da fração PC e 6,4  $\mu\text{l}$  de calpaína. Após aquecimento acrescentou-se 9  $\mu\text{l}$  de 2-mercaptoetanol. As alíquotas foram analisadas em SDS-PAGE.

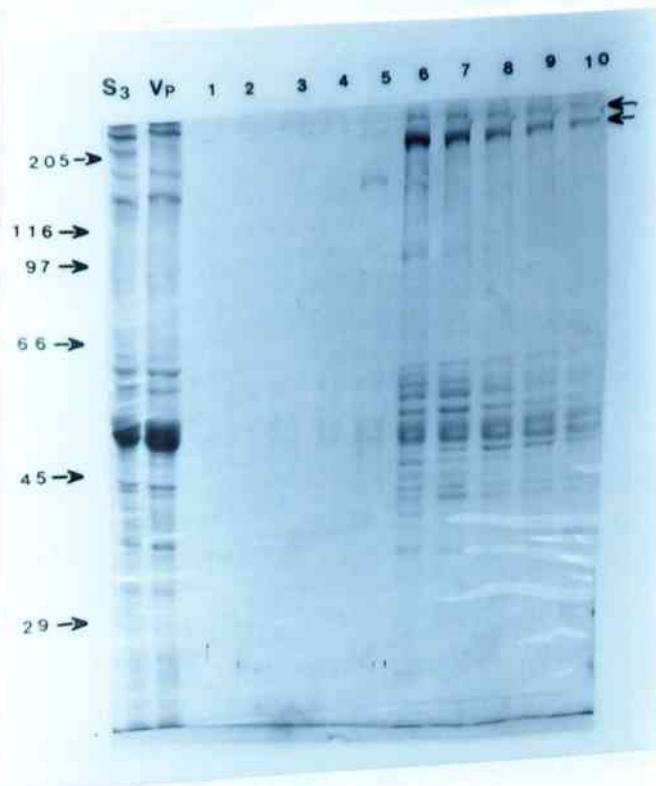
## 4-RESULTADOS

### 4.1-Perfil eletroforético da preparação de ATPase de encéfalo de ratas

A fração S3 possui vários polipeptídeos, sendo os principais observados acima de 205 KDa e outros em torno de 150, 66, 50 e 40 KDa, apresentando bandas mais fortes e definidas (figura 16). Nas frações enriquecidas em atividade ATPásica, eluidas da coluna de fosfocelulose por alteração de pH, observou-se a presença de um polipeptídeo principal, cujo peso molecular está logo acima da cadeia pesada de miosina II, um polipeptídeo de peso molecular maior do que este e vários polipeptídeos entre 45-66 KDa (figura 17). Pela intensidade do polipeptídeo principal indicado pela 2<sup>a</sup> seta, suspeitou-se ser o responsável pela atividade ATPásica.



**Figura 16: SDS-PAGE da preparação de ATPase de encéfalo de ratas**  
 Foram aplicados no gel 4,65  $\mu\text{g}$  da fração S1; 11,8  $\mu\text{g}$  do "void" DEAE-Sepharose (VD); 4,41  $\mu\text{g}$  da fração S2; 4,74  $\mu\text{g}$  da fração P2; 7,92  $\mu\text{g}$  da fração S3; 1,52  $\mu\text{g}$  da fração P3. As setas à esquerda indicam os padrões de peso molecular ( $M_r \times 10^{-3}$ ): cadeia pesada de miosina,  $\beta$ -galactosidase, fosforilase b, soroalbumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica.



**Figura 17: SDS-PAGE do fracionamento de S3 em coluna de fosfocelulose**  
 Proteínas da fração S3 retidas na coluna de fosfocelulose foram eluídas com tampão de eluição pH 8,0 (Imidazol-HCl 50 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 1,0 mM; 4-2 AEBSF 0,3 mM; benzamidina 1,0 mM) e coletadas frações de 3 ml. O "void" da coluna de fosfocelulose está indicado como VP. As setas à direita indicam os dois polipeptídeos de alto peso molecular. As setas à esquerda indicam os padrões de peso molecular ( $M_r \times 10^{-3}$ ): cadeia pesada de miosina,  $\beta$ -galactosidase, fosforilase b, soroalbumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica.

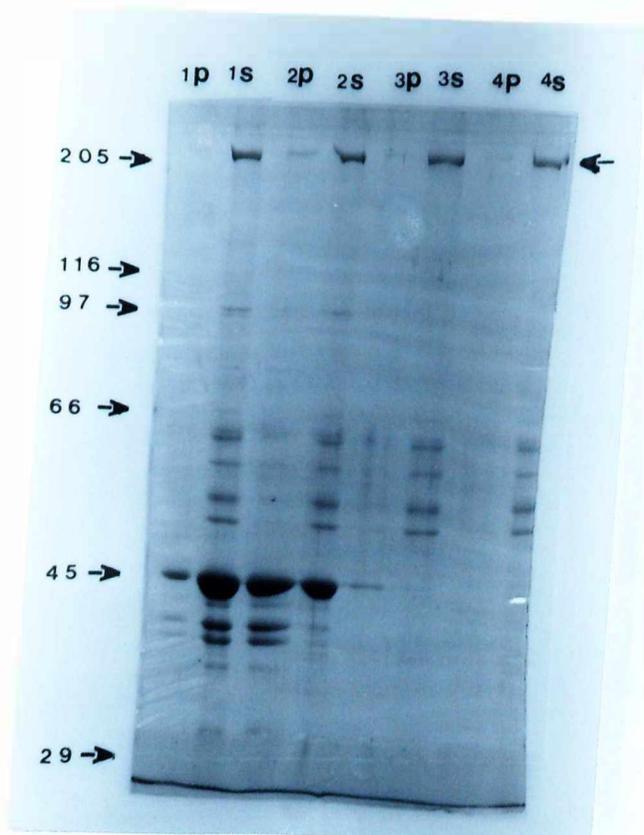
#### 4.2- Ensaio de cosedimentação da fração PC com actina

Sabendo que as miosinas possuem atividade ATPásica e cosedimentam com F-actina de maneira dependente de ATP, a fração PC foi submetida ao ensaio de cosedimentação com F-actina. A análise em SDS-PAGE (figura 18) foi utilizada para visualizar a composição de polipeptídeos dos sobrenadantes e sedimentos após o ensaio de cosedimentação. Houve uma leve cosedimentação do polipeptídeo principal com actina na ausência de ATP, em baixa velocidade de centrifugação. Entretanto, na presença de ATP, este polipeptídeo principal não cosedimentou com actina. Como controle do ensaio, o polipeptídeo principal não sedimentou quando a fração PC foi incubada isoladamente ou apenas na presença de ATP. Os demais polipeptídeos presentes na fração permaneceram no sobrenadante em todas as condições.

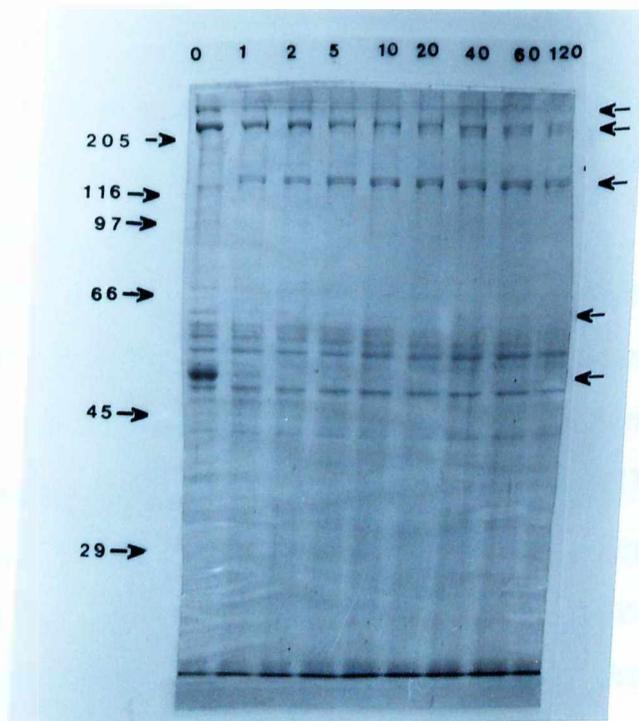
#### 4.3-Ensaio de proteólise da fração PC com calpaína

A calpaína, cisteína protease dependente de cálcio, cliva um grande número de proteínas e gera polipeptídeos estáveis. A miosina V e a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase são exemplos de ATPases que são substratos de calpaína.

A fração PC foi submetida a proteólise com calpaína e observou-se degradação de dois polipeptídeos entre 66 e 45 KDa e dos polipeptídeos de alto peso molecular, ao mesmo tempo em que surge um fragmento de 130 KDa além de outros fragmentos situados junto à frente de bromofenol (figura 19). A proteólise de miosina V por calpaína, também, produz um fragmento em torno de 130 KDa.



**Figura 18: Ensaio de cosedimentação da fração PC com F-actina**  
 Os tubos contendo 16,7  $\mu\text{g}$  da fração PC foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente na presença (1 e 2) ou ausência (3 e 4) de 14,4  $\mu\text{g}$  de F-actina com (1 e 3) ou sem (2 e 4) ATP 5 mM. Após centrifugação a 12.000 g x 15 minutos, os precipitados (P) foram suspensos em 1/5 do volume dos sobrenadantes (S). As amostras de cada ensaio foram preparadas para SDS-PAGE. Foram aplicados no gel 12  $\mu\text{l}$  dos sobrenadantes e 2,4  $\mu\text{l}$  dos precipitados (concentrações finais iguais). A seta à direita indica o polipeptídeo principal. As setas à esquerda indicam os padrões de peso molecular ( $M_r \times 10^{-3}$ ): cadeia pesada de miosina,  $\beta$ -galactosidase, fosforilase b, soroalbumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica.

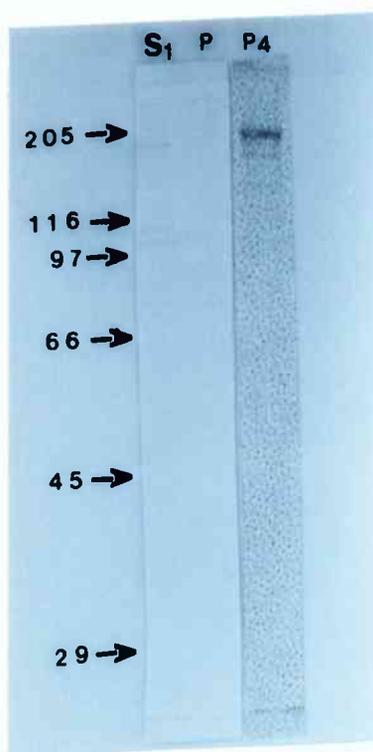


**Figura 19: Proteólise com calpaína de proteínas da fração PC**  
 O meio de reação contém 77,6  $\mu\text{g}$  de proteínas da fração PC; DTT 5 mM e  $\text{CaCl}_2$  5 mM. A reação foi realizada à temperatura ambiente tendo início com o acréscimo de calpaína. A relação protease/substrato é 1:50. Nos tempos indicados, alíquotas da mistura de reação foram preparadas para SDS-PAGE. O controle foi feito com solução STOP adicionada ao meio antes de calpaína. Foram aplicados no gel 12  $\mu\text{l}$  destas amostras. As setas à direita indicam os polipeptídeos proteolizados e gerados durante o ensaio. As setas à esquerda indicam os padrões de peso molecular ( $\text{Mr} \times 10^{-3}$ ): cadeia pesada de miosina,  $\beta$ -galactosidase, fosforilase b, soroalbumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica.

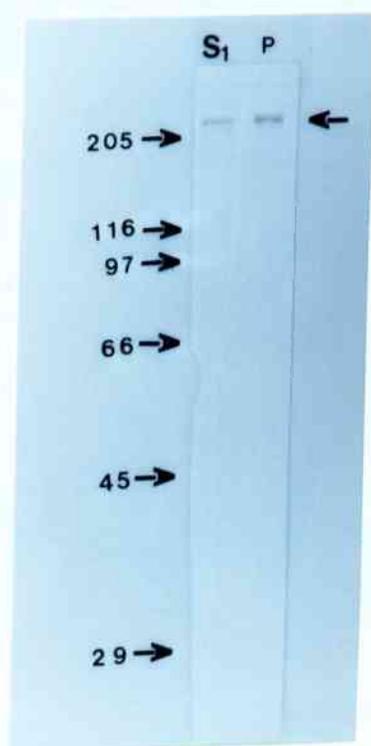
#### 4.4-Identificação do polipeptídeo principal da fração PC

Devido à cosedimentação do polipeptídeo principal com actina e o surgimento de um fragmento de aproximadamente 130 KDa durante a proteólise, decidiu-se verificar a existência de miosina V ou de algum polipeptídeo com um domínio homólogo, que pudesse ser reconhecido por um anticorpo específico para o domínio cabeça de miosina V. Um polipeptídeo de 190 KDa da fração S1 foi marcado com o anti-cabeça de miosina V mas, devido a problemas de documentação, não foi possível a visualização na figura. Entretanto, nenhum polipeptídeo da fração PC foi marcado (figura 20).

A fodrina é uma proteína composta de duas subunidades de alto peso molecular (Mr 240000 e 235000) que, também, possui a propriedade de cosedimentar com actina em baixa velocidade de centrifugação e é substrato de calpaína gerando um fragmento de 130 KDa. Portanto, a cosedimentação do polipeptídeo principal com actina, a degradação deste polipeptídeo com calpaína e o aparecimento de um fragmento de 130 KDa levantou a suspeita de que este polipeptídeo fosse fodrina. Por estes motivos, a fração PC foi sondada com anticorpo específico para a subunidade  $\alpha$  da fodrina. O polipeptídeo principal foi marcado pelo anticorpo contra fodrina tanto na fração S1 quanto na fração PC (figura 21). O fragmento de aproximadamente 130 KDa resultante de clivagem por calpaína também foi marcado com anti-fodrina (figura 22).

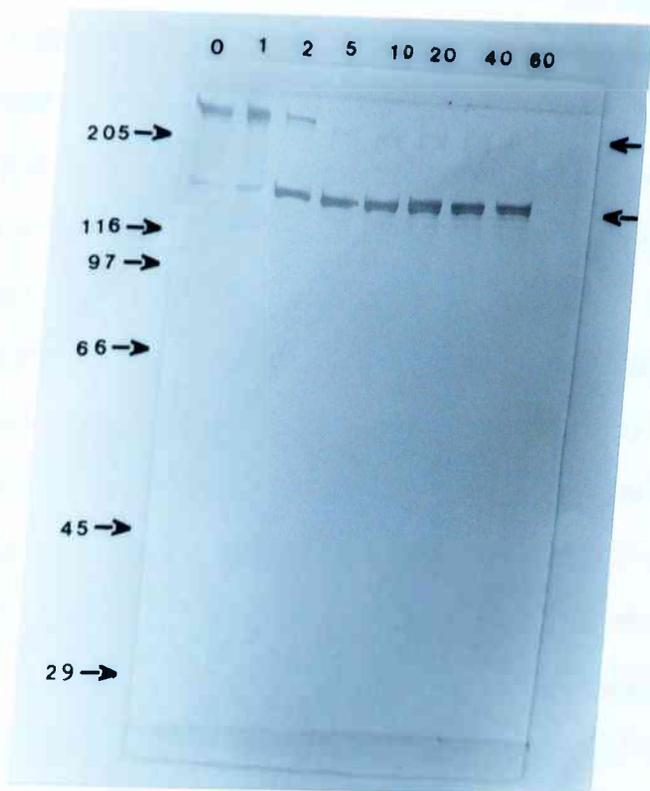


**Figura 20: Imunoblot utilizando anti-cabeça de miosina V como sonda**  
 Foram aplicados em SDS-PAGE 14,7  $\mu\text{g}$  da fração S1, 1,7  $\mu\text{g}$  da fração PC (P) e 10  $\mu\text{g}$  da preparação de miosina V de medula adrenal (P4) como controle positivo do anticorpo. Os polipeptídeos contidos no gel foram eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose e sondados com anti-cabeça de miosina V (fornecido pela equipe do Prof. Dr. Roy E. Larson). Foi utilizado um anticorpo secundário produzido contra IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (SIGMA) e a revelação foi realizada com NBT/BCIP. As setas à esquerda indicam os padrões de peso molecular ( $\text{Mr} \times 10^{-3}$ ): cadeia pesada de miosina,  $\beta$ -galactosidase, fosforilase b, soroalbumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica.



**Figura 21: Imunoblot utilizando anti-fodrina como sonda**

Foram aplicados em SDS-PAGE 14,7  $\mu\text{g}$  da fração S<sub>1</sub> e 1,7  $\mu\text{g}$  da fração PC (P). Os polipeptídeos contidos no gel foram eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose e sondados com anti-fodrina (SIGMA). Foi utilizado um anticorpo secundário produzido contra IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (SIGMA) e a revelação foi realizada com NBT/BCIP. A seta à direita indica o polipeptídeo principal. As setas à esquerda indicam os padrões de peso molecular ( $M_r \times 10^{-3}$ ): cadeia pesada de miosina,  $\beta$ -galactosidase, fosforilase b, soroalbumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica.



**Figura 22: Imunoblot do ensaio de proteólise com calpaína utilizando anti-fodrina como sonda**

O meio de reação contém 77,6  $\mu\text{g}$  da fração PC; DTT 5 mM e  $\text{CaCl}_2$  5 mM. A reação foi realizada à temperatura ambiente tendo início com o acréscimo de calpaína. A relação protease/substrato é 1:50. Nos tempos indicados, alíquotas da mistura de reação foram preparadas para SDS-PAGE. O controle foi feito com solução STOP adicionada ao meio antes de calpaína. Foram aplicados no gel 12  $\mu\text{l}$  destas amostras. Os polipeptídeos contidos no gel foram eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose e sondados com anti-fodrina (SIGMA). Foi utilizado um anticorpo secundário produzido contra IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (SIGMA) e a revelação foi realizada com NBT/BCIP. As setas à direita indicam os polipeptídeos proteolizados e gerados durante o ensaio marcados pelo anticorpo. As setas à esquerda indicam os padrões de peso molecular ( $\text{Mr} \times 10^{-3}$ ): cadeia pesada de miosina,  $\beta$ -galactosidase, fosforilase b, soroalbumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica.

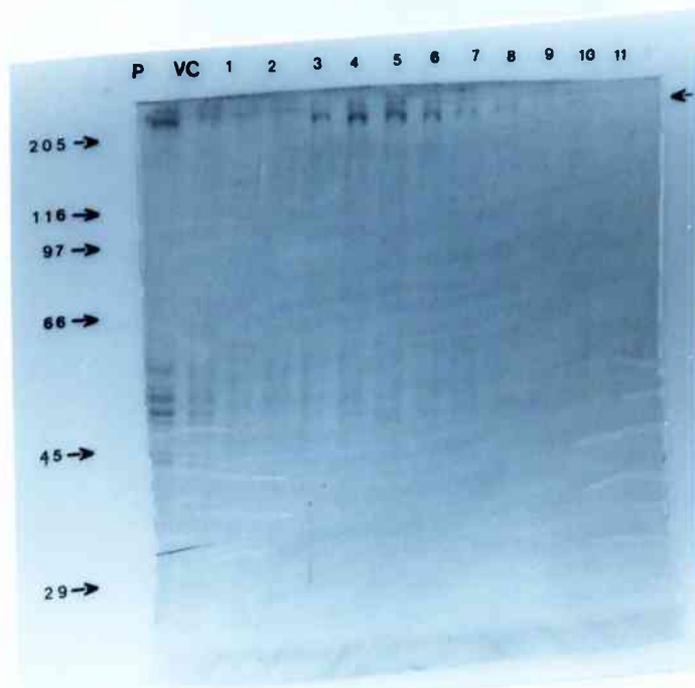
#### 4.5-Separação dos polipeptídeos da fração PC por coluna de afinidade a calmodulina

Sabendo que fodrina liga-se à calmodulina na presença de cálcio e não tem atividade ATPásica, foi utilizada uma coluna de CaM-Agarose para eliminar o polipeptídeo principal e separá-lo da atividade ATPásica da fração PC. Como era esperado, o polipeptídeo principal ficou retido na coluna. Entretanto um polipeptídeo acima deste também foi retido, como demonstrado por SDS-PAGE (figura 23). Observa-se que no "void" há polipeptídeos na mesma altura destes, porém de menor intensidade, além de um polipeptídeo de 50 KDa (figura 23). A atividade ATPásica neste experimento foi perdida. A coluna foi eluída com EGTA 2 mM e Uréia 8 M entretanto nenhum polipeptídeo foi observado por SDS-PAGE.

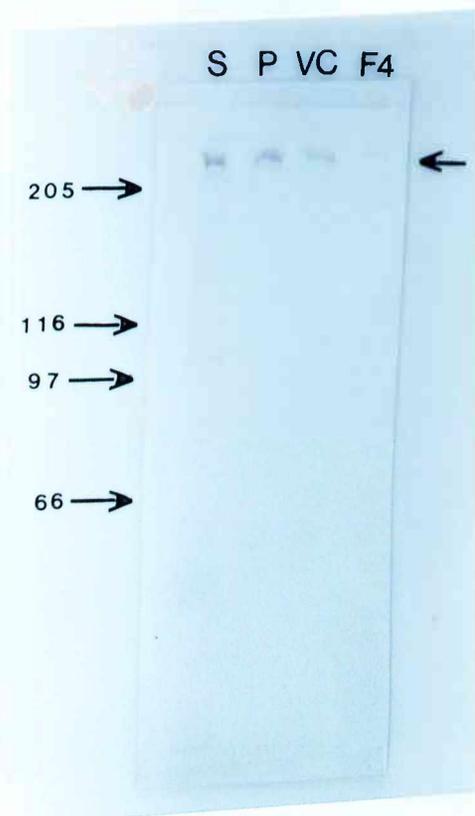
Em outro experimento realizado, o polipeptídeo principal se ligou fracamente à coluna o que impossibilitou a documentação na figura. O polipeptídeo principal do "void" foi marcado com anti-fodrina como observado pelo imunoblot sondado com anti-fodrina (figura 24). Este resultado não está de acordo com a intensidade do polipeptídeo principal em SDS-PAGE no primeiro experimento (figura 23). A atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica, também, saiu no "void" (figura 25). O inserto da figura 25 mostra que a alta atividade específica da fração da CaM-agarose parece ser devido à baixa concentração de proteína nesta fração.

#### 4.6-Ensaio de ligação à calmodulina

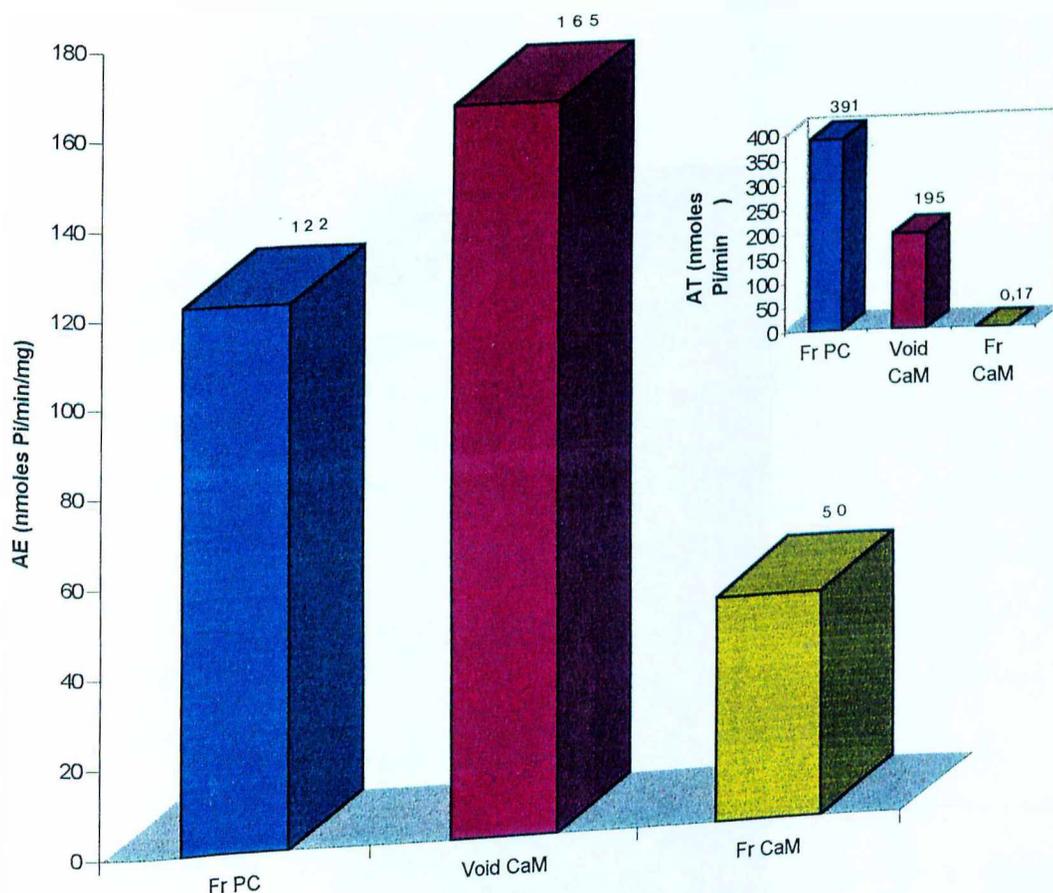
A fração PC foi submetida ao ensaio de ligação à calmodulina por método de "overlay" para identificação de proteínas ligantes de calmodulina em membrana de nitrocelulose contendo os polipeptídeos de PC. Pela figura 26 pode-se observar que o polipeptídeo principal não ligou calmodulina em nenhum dos dois casos (presença ou ausência de cálcio). Entretanto, um polipeptídeo de 50 KDa ligou calmodulina na presença de cálcio, levantando a suspeita de corresponder à subunidade  $\alpha$  de CaM-quinase II.



**Figura 23: Separação dos polipeptídeos da fração PC por coluna de CaM-Agarose**  
 4,1 mg da fração PC contendo cálcio 1 mM foi aplicada em coluna de CaM-Agarose pré-equilibrada com tampão I (Imidazol-HCl 50 mM pH 8,0; DTT 1,0 mM; 4-2 AEBSF 0,3 mM; benzamidina 1,0 mM) contendo cálcio 0,2 mM. A eluição foi feita com tampão I contendo EGTA 2 mM. Foram aplicados no gel 8  $\mu$ l do "void" e 12  $\mu$ l das outras amostras. A seta à direita indica o polipeptídeo principal. As setas à esquerda indicam os padrões de peso molecular ( $M_r \times 10^{-3}$ ): cadeia pesada de miosina,  $\beta$ -galactosidase, fosforilase b, soroalbumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica.



**Figura 24: Imunoblot do fracionamento de PC em coluna de CaM-Agarose utilizando anti-fodrina como sonda**  
 Foram aplicados em SDS-PAGE 27,1  $\mu\text{g}$  da fração S1; 2,1  $\mu\text{g}$  da fração PC (P); 1,1  $\mu\text{g}$  do "void" (VC) e 0,03  $\mu\text{g}$  da fração (F4) da coluna de CaM-Agarose. Os polipeptídeos contidos no gel foram eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose e sondados com anti-fodrina (SIGMA). Foi utilizado um anticorpo secundário produzido contra IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (SIGMA) e a revelação foi realizada com NBT/BCIP. A seta à direita indica o polipeptídeo principal. As setas à esquerda indicam os padrões de peso molecular ( $\text{Mr} \times 10^{-3}$ ): cadeia pesada de miosina,  $\beta$ -galactosidase, fosforilase b, soroalbumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica.



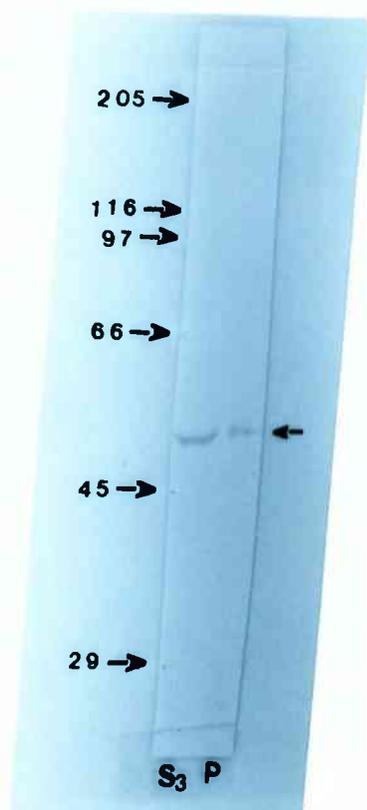
**Figura 25: Atividade Mg-ATPásica da fração PC, do "void" e da fração da coluna de CaM-Agarose**  
 24,9  $\mu\text{g}$  da fração PC; 12,7  $\mu\text{g}$  do "void" e 0,31  $\mu\text{g}$  da fração da coluna de CaM-Agarose foram incubadas por 16 minutos a 37°C em meio de reação I (Imidazol-HCl 25 mM pH 7,0; KCl 60 mM; EGTA 1,0 mM; EDTA 1,0 mM; DTT 0,2 mM;  $\text{MgCl}_2$  5 mM). A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. O volume final da reação foi 200  $\mu\text{l}$ . Todas as reações foram realizadas em duplicatas. AE=Atividade específica, AT=Atividade total.



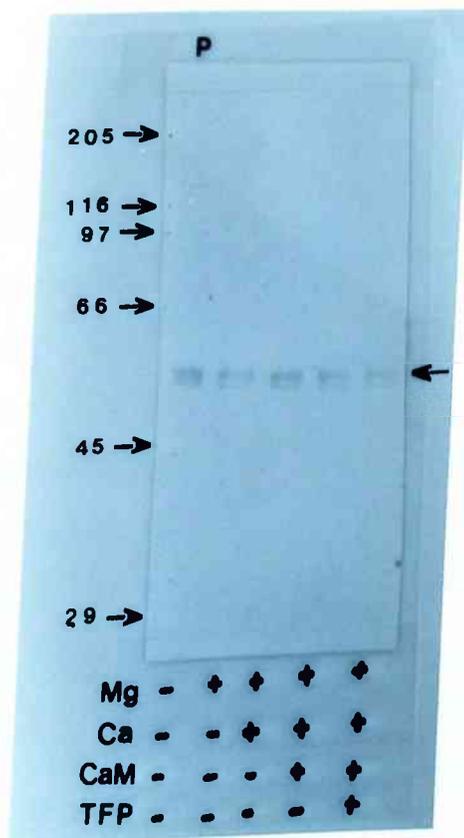
#### 4.7-Identificação de CaM-quinase II na fração PC

Como na fração PC existe um polipeptídeo de 50 KDa que, semelhante às subunidades de CaM-quinase II, foi proteolizado por calpaína (figura 19) e ligado à calmodulina (figura 26), decidiu-se verificar se este polipeptídeo corresponde à subunidade  $\alpha$  de CaM-quinase II. O polipeptídeo de 50 KDa foi marcado com um anticorpo específico para a subunidade  $\alpha$  de CaM-quinase II (figura 27).

A CaM-quinase II é uma proteína quinase multifuncional que incorpora fosfato em várias proteínas tais como miosina V, sinapsina I, MAP-2 e suas próprias cadeias polipeptídicas. As proteínas quinases, em geral, possuem grande especificidade para  $Mg^{2+}$ -ATP e, além disso,  $Ca^{2+}$  é fundamental para que a calmodulina atue sobre sistemas-alvo. De acordo com isto, foi realizado o ensaio de quinase para verificar se a fração PC contém substrato para essa enzima. Como uma maneira de identificar se algum polipeptídeo de PC foi fosforilado, utilizou-se um anticorpo específico para fosfoserina. Pela figura 28 pode-se observar que o polipeptídeo de 50 KDa já estava fosforilado na fração PC antes do ensaio. Diferente do que era esperado, a adição de cálcio ou de cálcio/calmodulina não promoveu nenhum aumento significativo da fosforilação. Observou-se, também, que nenhum outro polipeptídeo da fração PC sofreu fosforilação. A trifluorperazina foi acrescentada com o intuito de verificar se inibiria uma possível estimulação da fosforilação por cálcio/calmodulina, o que não ocorreu.



**Figura 27: Imunoblot utilizando anti-CaM-quinase II como sonda**  
 Foram aplicados em SDS-PAGE 21,4  $\mu\text{g}$  da fração S3 e 1,9  $\mu\text{g}$  da fração PC (P). Os polipeptídeos contidos no gel foram transferidos para membrana de nitrocelulose e sondados com anti-CaM-quinase (Boehringer Mannheim Biochemica). Foi utilizado um anticorpo secundário produzido contra IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Promega) e a revelação foi realizada com NBT/BCIP. A seta à direita indica o polipeptídeo de 50 KDa. As setas à esquerda indicam os padrões de peso molecular ( $M_r \times 10^{-3}$ ): cadeia pesada de miosina,  $\beta$ -galactosidase, fosforilase b, soroalbumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica.



**Figura 28: Imunoblot do ensaio de quinase utilizando anti-fosfoserina como sonda**  
 A fração PC (7,2  $\mu\text{g}$ ) foi submetida ao ensaio de quinase em meio de reação contendo Imidazol-HCl 25 mM pH 7,0; KCl 60 mM; EGTA 1,0 mM; EDTA 1,0 mM; DTT 0,2 mM;  $\text{MgCl}_2$  5 mM e onde indicado foi acrescentado  $\text{CaCl}_2$  3,2 mM; calmodulina 54,2  $\mu\text{g}$ ; trifluorperazina 50  $\mu\text{M}$ . P indica a fração PC utilizada como controle do ensaio. A reação foi iniciada com adição de ATP 1 mM (concentração final) e após 5 minutos a 37°C foi interrompida com a solução STOP. Foram aplicados no gel 12  $\mu\text{l}$  destas amostras. Os polipeptídeos contidos no gel foram eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose e sondados com anti-fosfoserina (SIGMA). Foi utilizado um anticorpo secundário produzido contra IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Promega) e a revelação foi realizada com NBT/BCIP. A seta à direita indica o polipeptídeo de 50 KDa. As setas à esquerda indicam os padrões de peso molecular ( $\text{Mr} \times 10^{-3}$ ): cadeia pesada de miosina,  $\beta$ -galactosidase, fosforilase b, soroalbumina bovina, ovoalbumina e anidrase carbônica.

## 5-DISCUSSÃO

Os resultados apresentados aqui mostram a caracterização parcial da fração enriquecida em atividade ATPásica obtida por Santos (1997) a partir de encéfalo de ratas usando coluna de fosfoceleulose.

A eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS revelou a presença de um polipeptídeo principal cujo peso molecular está acima da cadeia pesada de miosina II, outro polipeptídeo de peso molecular maior que o polipeptídeo principal e vários polipeptídeos entre 45 e 66 KDa (figura 17). Suspeita-se que o polipeptídeo principal seja o responsável pela atividade ATPásica presente na fração (Santos, 1997). O peso molecular deste polipeptídeo principal não está de acordo com as ATPases que se movem sobre trilhos de microtúbulos como a cinesina de cérebro, cujas cadeias pesadas possuem 120 KDa, e a dineína de cérebro que possui cadeias pesadas de 532 KDa. Entretanto não se descarta a possibilidade do polipeptídeo principal ser um produto de degradação. Verificou-se também que o peso molecular do polipeptídeo principal não conferiu com as cadeias pesadas das seguintes miosinas de cérebro: myr 1a de rato (130 KDa), miosina V de cérebro de vertebrados (190 KDa) e miosina VI de suínos (140-145 KDa) (para revisão ver Mooseker & Cheney, 1995). Entretanto, podem existir proteínas relacionadas a estas, com peso molecular diferente,

que ainda não foram descritas. Além disto, outras miosinas recentemente identificadas por análise genética possuem peso molecular acima de miosina II, assim como o polipeptídeo principal. Tais miosinas são: A miosina VII identificada como um gene defectivo em um camundongo mutante recessivo para surdez (Gibson et al, 1995) e em humanos na síndrome de Usher tipo IB, uma doença recessiva caracterizada pela surdez congênita, disfunção vestibular e retinite pigmentosa (Weil et al, 1995). Análise por imunoblot revelou que a cadeia pesada da miosina VII, em vários vertebrados, é um polipeptídeo de cerca de 240 KDa (Hasson et al, 1995). A miosina IX de ratos Myr 5 (Reinhard et al, 1995) e a miosina humana IXb (Bement et al, 1994) foram identificadas em vários tecidos, entre estes o cérebro, como polipeptídeos de 225 KDa e 229 KDa respectivamente (para revisão ver Mooseker & Cheney, 1995). Porém, as características bioquímicas destas proteínas ainda não são conhecidas.

O peso molecular do polipeptídeo principal também não está de acordo com outras ATPases que não são motores moleculares como por exemplo: A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase que encontra-se embebida na membrana plasmática de diversos tipos celulares sendo bem abundante no sistema nervoso, é constituída de dois tipos de subunidades:  $\alpha$  (112 KDa) e  $\beta$  (~40 KDa) associadas na membrana como um tetrâmero  $\alpha_2\beta_2$  (para revisão ver Dahl & Hokin, 1974). A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (110 KDa), situada na membrana do retículo endoplasmático, transporta  $\text{Ca}^{2+}$  ativamente para fora da célula (MacLennan et al, 1985). A bomba de prótons de membranas de mitocôndria é constituída pelo complexo  $\text{F}_1\text{F}_0$ , onde  $\text{F}_1$  cataliza a hidrólise de ATP (ATPase) e  $\text{F}_0$  promove a translocação de prótons através da membrana. Em mamíferos, a ATPase  $\text{F}_1$  mitocondrial possui de 300 a 400 KDa, sendo constituída por 6 tipos de subunidades com peso molecular de 6 a 56 KDa (para revisão ver Fillingame, 1980).

Para verificar se a ATPase da fração PC é uma miosina foi determinado o seu efeito na sedimentação da actina sob baixa velocidade de centrifugação (Polard & Cooper, 1982). Sob as condições deste ensaio F-actina sozinha não sedimenta durante a centrifugação a 12.000 g. Entretanto, a adição de baixa concentração de miosina resulta na cosedimentação da actina com miosina quando ATP está ausente, mas não quando ATP está presente (Polard & Cooper, 1982; Espíndola et al, 1992). Deste modo, parte do polipeptídeo principal cosedimentou com F-actina na ausência de ATP em baixa velocidade de centrifugação, o que não ocorreu na presença de ATP (figura 18).

A cosedimentação do polipeptídeo principal com actina levantou a possibilidade deste polipeptídeo ser miosina. Coelho & Larson (1993) mostraram a rápida degradação de miosina V de cérebro por calpaína gerando fragmentos de aproximadamente 135, 80 e 65 KDa. A proteólise por calpaína dos polipeptídeos da fração PC mostrou degradação de dois polipeptídeos entre 45-66 KDa e dos polipeptídeos de alto peso molecular, ao mesmo tempo em que surge um fragmento de aproximadamente 130 KDa além de outros fragmentos situados junto à frente de bromofenol (figura 19).

Apesar dessas similaridades com miosina V, nenhum polipeptídeo da fração PC foi marcado por anticorpos contra o domínio cabeça de miosina V em imunoblot (figura 20). Dados de Santos (1997) mostram, também, que diferente das miosinas, a fração PC não possui atividade  $K^+$ -EDTA ATPásica, possui atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica vinte vezes maior que a atividade  $Ca^{2+}$ -ATPásica e a atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica não é estimulada por actina. Além disto, a atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica da fração PC é inibida por calmodulina, enquanto que as miosinas I e V apresentam estimulação desta atividade por calmodulina (Santos, 1997).

A fodrina é constituída por duas subunidades de alto peso molecular ( $\alpha$ :240 e  $\beta$ :235 KDa) e, semelhante à miosina, ela também cosedimenta com

actina e sofre proteólise por calpaína produzindo fragmentos em torno de 130 KDa (Glenney et al, 1982a; Glenney et al, 1982b; BurrIDGE et al, 1982). O polipeptídeo principal da fração PC foi marcado por um anticorpo específico para a subunidade  $\alpha$  da fodrina (figura 21). Além disto, o fragmento de 130 KDa gerado da proteólise por calpaína também foi marcado pelo anti-fodrina provando ser este derivado da clivagem do polipeptídeo principal nesta fração (figura 22). Fodrina tem um sítio ligante de calmodulina na subunidade  $\alpha$  (para revisão ver Bennett, 1990). Como era esperado dos dados anteriores, o polipeptídeo principal presente na fração PC ficou retido em coluna de CaM-Agarose, como pode ser demonstrado por SDS-PAGE (figura 23). Com base nestes resultados, descarta-se a suspeita de que o polipeptídeo principal seja o responsável pela atividade ATPásica, pois fodrina não tem atividade ATPásica.

Diferente do que era esperado o polipeptídeo principal não foi marcado pelo anti-calmodulina no ensaio de ligação à calmodulina (figura 26). Posteriormente, suspeitou-se de que o lote do anticorpo utilizado estivesse trocado uma vez que, em ensaios paralelos no nosso laboratório, o controle feito com calmodulina de cérebro bovino, também, não foi marcado com este anticorpo. Porém, este ensaio foi importante pela marcação de outro polipeptídeo como será discutido abaixo.

Os polipeptídeos de alto peso molecular que foram observados nas frações e no "void" CaM, neste com menor intensidade (figura 23), levantam a suspeita de saturação da coluna ou de sobreposição de polipeptídeos diferentes no gel. A atividade ATPásica, neste experimento, não foi detectada nem nas frações nem no "void", o que levou a pensar que ela ainda poderia estar retida na coluna. Entretanto, nenhum polipeptídeo foi observado em SDS-PAGE após eluição da coluna com EGTA 2 mM e uréia 8M.

Suspeita-se que a eluição da coluna com uréia e EGTA causou danos na resina pois, em outro experimento realizado, o polipeptídeo principal se ligou fracamente à coluna, como observado pelo imunoblot sondado com anti-fodrina, enquanto que houve marcação deste polipeptídeo no "void" (figura 24). Corroborando a suspeita, observou-se que este resultado não está de acordo com a intensidade do polipeptídeo principal, em SDS-PAGE, do primeiro experimento (figura 23). A figura 25 mostra que a atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica também saiu no "void".

No ensaio de ligação à calmodulina, um polipeptídeo de 50 KDa da fração PC foi marcado (figura 26). Este resultado junto com a degradação por calpaína do polipeptídeo de 50 KDa (figura 19) levantou a possibilidade deste polipeptídeo ser a subunidade  $\alpha$  de CaM-quinase II.

A proteína quinase tipo II dependente de calmodulina (CaM quinase II) é uma proteína quinase multifuncional encontrada principalmente no cérebro. A enzima purificada de cérebro de rato tem um peso molecular nativo de 550-650 KDa e é composta de duas subunidades diferentes:  $\alpha$  (50 KDa) e  $\beta/\beta'$  (60 e 58 KDa) que na presença de cálcio também ligam à calmodulina (para revisão ver Nairn et al, 1985). Semelhante ao polipeptídeo de 50 KDa, a CaM-quinase II também é retida em coluna de fosfocelulose em pH 6,9 sendo eluída por alteração para pH 8,0 (Coelho, 1988 e 1995) e também é substrato de calpaína (Kwiatkowski & King, 1989). Corroborando estes dados, o polipeptídeo de 50 KDa da fração PC foi marcado com anticorpo específico para a subunidade  $\alpha$  da CaM quinase II (figura 27).

A CaM-quinase II incorpora fosfato em várias proteínas tais como miosina V, sinapsina I, MAP-2, além de suas próprias cadeias polipeptídicas (para revisão ver Nairn et al, 1985). Entretanto, observou-se que o polipeptídeo de 50 KDa da fração PC sofreu fosforilação endógena (figura 28) e diferente de uma fração isolada de cérebro de rato (Coelho, 1988), a

adição de cálcio/calmodulina não estimulou a fosforilação (figura 28). Observou-se, também, que nenhum outro polipeptídeo da fração PC sofreu fosforilação (figura 28). Por isto, o polipeptídeo de 50 KDa pode ter sido fosforilado durante a preparação e no decorrer desta, por desnaturação, tornou-se inativo, perdendo a capacidade de autofosforilação e de fosforilar outros polipeptídeos da fração PC. A desnaturação, originando uma forma de CaM quinase II inativa, pode explicar porque o polipeptídeo de 50 KDa não ficou retido na coluna de afinidade a calmodulina.

A descoberta, neste trabalho, de que o polipeptídeo principal da fração PC é fodrina, elimina a possibilidade de ser o responsável pela atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica da fração. Isto explica o pequeno grau de purificação da atividade  $Mg^{2+}$ ATPásica obtido na fração PC por Santos (1997), uma vez que o principal polipeptídeo desta preparação é fodrina. Dados recentes no nosso laboratório mostram uma separação parcial das duas bandas de alto peso molecular mostrando que a atividade ATPásica acompanha o polipeptídeo acima de fodrina (comunicação pessoal, Cunha). No entanto, outros experimentos precisam ser realizados para purificar e identificar a ATPase desta fração.

## 6-CONCLUSÕES

- 1)- O polipeptídeo principal da fração PC é a subunidade  $\alpha$  da fodrina portanto, não é responsável pela atividade ATPásica desta fração.
- 2)- O polipeptídeo de 50 KDa é a subunidade  $\alpha$  de CaM-quinase II, que sofreu fosforilação endógena durante a preparação e no decorrer desta se tornou inativa, perdendo a capacidade de autofosforilação e de fosforilar outros polipeptídeos da fração PC.

## 7-RESUMO

Este trabalho consiste na caracterização de polipeptídeos de uma fração enriquecida em atividade  $Mg^{2+}$ -ATPásica obtida a partir de sobrenadante 38.900 g de cérebro de ratas utilizando coluna de fosfocelulose (Santos, 1997). Observa-se nesta fração um polipeptídeo principal de peso molecular acima da cadeia pesada de miosina II, um polipeptídeo acima deste e vários polipeptídeos entre 45-66 KDa. O polipeptídeo principal cosedimentou com actina, a 12.000 g, na ausência de ATP. O ensaio de proteólise com calpaína mostrou a degradação de dois polipeptídeos entre 66-45 KDa e dos polipeptídeos de alto peso molecular, com o surgimento de um fragmento de aproximadamente 130 KDa, além de outros junto à frente de bromofenol. O polipeptídeo principal e o fragmento de 130 KDa foram marcados por um anticorpo específico para a subunidade  $\alpha$  de fodrina. Corroborando estes dados, o polipeptídeo principal ficou retido na coluna de CaM-Agarose. Um polipeptídeo acima da fodrina também ficou retido na coluna de CaM-Agarose. O polipeptídeo de 50 KDa que ficou retido na coluna de fosfocelulose e foi proteolizado por calpaína é a subunidade  $\alpha$  de CaM-quinase II, como demonstrado por imunoblot utilizando anti-CaM-quinase. Este polipeptídeo sofreu fosforilação endógena durante a preparação e no decorrer desta se tornou inativa, perdendo a

capacidade de autofosforilação e de fosforilar outros polipeptídeos da fração  
PC.

## 8-SUMMARY

This work consists in polypeptides fraction characterization containing  $Mg^{2+}$ -ATPase activity obtained from the supernatant 38.900 g the rats brain supernatant using a phosphocellulose column (Santos, 1997). It was observed in this fraction one principal polypeptide whose molecular weight is higher than myosin II heavy chain, other polypeptide above this and several polypeptides with molecular weight between 45-66 kDa. The principal polypeptide exhibited cosedimentation with actin, in 12.000 g, in the absence of ATP. The proteolysis test with calpain shown the degradation of two polypeptides among 66-45 kDa and the polypeptides of high molecular weight, with the arising of approximately 130 kDa fragment, further on others join the front of bromofenol. The principal polypeptide and the 130 kDa fragment were marked by specific antibody to fodrin  $\alpha$  subunit. Corroborating these dates, the principal polypeptide was retained in the CaM-Agarose. The polypeptide above the fodrin was also retained in the CaM-Agarose. The 50 kDa polypeptide that was retained in the phosphocellulose column and was also proteolyzed by calpain is the  $\alpha$  subunit of CaM Kinase II, as demonstrated by immunoblot utilizing anti-CaM kinase II. This polypeptide suffered endogenous phosphorylation during the preparation and it was converted in inactive one, loosing its

capacity of autophosphorylation and to phosphorylate the others PC  
fraction's polypeptides.

## 8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Watson, J. D. 1997. *Biologia Molecular da Célula*. 3ª edição. Artes Médicas Sul LTDA.
- Amos, L. A. 1987. Kinesin from pig studied by electron microscopy. *J. Cell. Sci.* 87: 105-111.
- Bement, W. M.; Wirth, J. A.; Mooseker, M. S. 1994. Cloning and mRNA expression of human unconventional myosin-IC: a homolog of ameboid myosins-I with a single IQ motif and an SH3 domain. *J. Mol. Biol.* 243: 356-63.
- Bennett, V. & Stenbuck, P. J. 1979a. Identification and partial purification of ankyrin, the high affinity membrane attachment site for human erythrocyte spectrin. *J. Biol. Chem.* 254: 2533-2541.
- Bennett, V. & Stenbuck, P. J. 1979b. The membrane attachment protein spectrin is associated with band 3 in human erythrocytes membranes. *Nature* 280: 468-473.
- Bennett, V. 1990. Spectrin-based membrane skeleton: A multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm. *Physiol. Rev.* 70: 1029-1065.

- Bittner, M.; Kupferer, P.; Morris, C. F. 1980. Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Anal. Biochem.* 102: 459-471.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brenner, S. L. & Brinkley, B. R. 1981. Tubulin assembly sites and the organization of microtubule arrays in mammalian cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 46: 241-254.
- Burridge, K.; Kelly, T.; Mangeat, P. 1982. Nonerythrocyte spectrins: actin-membrane attachment proteins occurring in many cell types. *J. Cell Biol.* 95: 478-486.
- Burton, P. R. & Paige, J. L. 1981. Polarity of axoplasmic microtubules in the olfactory nerve of the frog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 3269-3273.
- Calvert, R.; Bennett, P.; Gratzer, W. B. 1980. Properties and structural role of the subunits of human spectrin. *Eur. J. Biochem.* 107: 355-361.
- Carraway, K. L. & Carraway, C. A. C. 1989. Membrane-cytoskeleton interactions in animal cells. *Biochim. et Biophys. Acta.* 988: 147-171.
- Cassimeris, L. U.; Walker, R. A.; Pryer, N. K.; Salmon, E. D. 1987. Dynamic instability of microtubules. *Bioessays.* 7: 149-154.
- Cheney, R.E. & Mooseker, M.S. 1992. Unconventional myosins. *Curr Op. Cell. Biol.* 4: 27-35.
- Cheney, R. E.; Riley, M. A.; Mooseker, M. S. 1993. Phylogenetic analysis of the myosin superfamily. *Cell Motil. Cytoskelet.* 24: 215-23.
- Coelho, M.V. 1988. Regulação de ATPase e Proteína-Quinase por Ca / Calmodulina em citosol de cérebro de rato. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

- Coelho, M. V. 1995. Miosina V é alvo de duas enzimas mediadoras de íons cálcio: calpaína e CaM-quinase II. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- Coelho, M.V. & Larson, R. E. 1993. Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphorylation of the tail domain of myosin-V, a calmodulin-binding myosin in vertebrate brain. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26: 465-472.
- Cole, D. G. & Scholey, J. M. 1995. Structural variations among the kinesins. *Trends Cell Biol.* 5: 259-62.
- Collins, J. & Borysenko, C. 1984. The 110.000 dalton actin and calmodulin binding protein from intestinal brush border is a myosin-like ATPase. *J. Biol. Chem.* 259: 14128-35.
- Connolly, J. A. & Kalnins, V. I. 1980. The distribution of tau and HMW microtubule-associated proteins in different cell types. *Experimental Cell Research.* 127: 341-350.
- Dahl, J. L. & Hokin, L. E. 1974. The sodium-potassium adenosinetriphosphatase. *Ann. Rev. Biochem.* 43: 327-356.
- Endow, S. A.; Henikoff, S.; Soler-Niedziela, L. 1990. Mediation of meiotic and early mitotic chromossome segregation in *Drosophila* by a protein related to kinesin. *Nature.* 345: 81-3.
- Endow, S.A. & Titus, M.A. 1992. Genetic Approaches to molecular motors. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 29-66.
- Enos, A. P. & Morris, N. R. 1990. Mutation of a gene that encodes a kinesin-like protein blocks nuclear division in *A. nidulans*. *Cell.* 60: 1019-27.
- Espíndola, F. S.; Espreáfico, E. M.; Coelho, M. V.; Martins, A. R.; Costa, F. R. C.; Mooseker, M. S.; Larson, R. E. 1992. Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: A novel calmodulin-binding myosin. *J. Cell Biol.* 118 (2): 359-68.

- Espreáfico, E.M.; Cheney, R.E.; Matteoli, M.; Nascimento, A.A.C.; De Camilli, P.U.; Larson, R.E.; Mooseker, M.S. 1992. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin V(p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J. Cell Biol.* 199: 1541-1557.
- Fillingame, R. H. 1980. The proton-translocating pumps of oxidative phosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 1079-1113.
- Fulton, A. B. & L'Ecuyer, T. 1993. Cotranslational assembly of some cytoskeletal proteins: implications and prospects. *J. Cell Science.* 105: 867-871.
- Gibbons, I. R. 1965. Chemical dissection of the cilia. *Arch. Biol. (Liège)* 76: 317-52.
- Gibbons, I. R. 1981. Cilia and flagella of eucaryotes. *J. Cell Biol.* 91: 107-24.
- Gibbons I. R.; Gibbons, B. H.; Mocz, G.; Asai, D. J. 1991. Multiple nucleotide-binding sites in the sequence of dynein  $\beta$  heavy chain. *Nature.* 352: 640-643.
- Gibson, F.; Walsh, J.; Mburu, P.; Varela, A.; Brown, K. A.; et al. 1995. A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene *shaker-1*. *Nature.* 374: 62-4.
- Glenney, J. R.; Glenney, P. Jr.; Osborn, M.; Weber, K. 1982a. An F-actin and calmodulin-binding protein from isolated intestinal brush border has a morphology related to spectrin. *Cell.* 28: 843-854.
- Glenney, J. R.; Glenney, P. Jr.; Weber, K. 1982b. F-actin binding and cross-linking properties of porcine brain fodrin, a spectrin related molecule. *J. Biol. Chem.* 257: 9781-9787
- Goldstein, L.S.B. 1991. The kinesin superfamily: tails of functional redundancy. *Trends Cell Biol.* 1: 93-98.

- Goodman, S. R. & Shiffer, K. A. 1983. The spectrin membrane skeleton of normal and abnormal human erythrocytes: a review. *Am. J. Physiol.* 244 (*Cell Physiol.* 13): C121-C141.
- Goodman, S. R.; Shiffer, K. S.; Coleman, D. B.; Whitfield, C. F. 1984. Erythrocyte membrane skeletal protein 4.1: a brief review. In: *The Red Cell: Proceedings of the Sixth Ann Arbor Conference*, edited by G. Brewer. New York: Liss, 415-439.
- Goodman, S. R. & Zagon, I. S. 1986. The neural cell spectrin skeleton: a review. *Am. J. Physiol.* 250: 347-360
- Goodman, S. R. & Weidner, S. A. 1980. Binding of spectrin  $\alpha_2\beta_2$  tetramers to human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 255: 8002-8086.
- Goodson, H. V. & Spudich, J. A. 1993. Molecular evolution of the myosin family: Relationships derived from comparisons of aminoacid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 659-63.
- Griffith, L. M. & Pollard, T. D. 1982. The interaction of actin filaments with microtubules and microtubule-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 257: 9143-9151.
- Gulick, A. M. & Rayment, I. 1997. Structural studies on myosin II: Communication between distant protein domains. *BioEssays.* 19: 561-569.
- Hagan, I. & Yamagida, M. 1990. Novel potential mitotic motor protein encoded by fission yeast *cut 7<sup>+</sup>* gene. *Nature.* 347: 563-6.
- Hall, D. H. & Hedgecock, E. M. 1991. Kinesin related gene *unc-104* is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans*. *Cell.* 65: 837-47.
- Harris, H. W. & Lux, S. E. 1980. Structural characterization of the phosphorylation sites of human erythrocyte spectrin. *J. Biol. Chem.* 255: 11512-11520.

- Hasson, T.; Heintzelman, M. B.; Santos-Sacchi, J.; Corey, D. P.; Mooseker, M. S. 1995. Expression in cochlea and retina of myosin VIIa, the gene product defective in Usher Syndrome type 1B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 9815-9.
- Heidemann, S. R.; Landers, J. M.; Hamborg, M. A. 1981. Polarity orientation of axonal microtubules. *J. Cell Biol.* 91: 661-665.
- Heinonen, J.K. & Lahti, R.J. 1981. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal. Biochem.* 113: 313-317.
- Hennessey, E. S.; Drummond, D. R.; Sparrow, J. C. 1993. Molecular genetics of actin function. *Biochem. J.* 282: 657-671.
- Hirokawa, N.; Pfister, K. K.; Yorifuji, H.; Wagner, M. C.; Brady, S. T.; Bloom, G. S. 1989. Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. *Cell.* 56: 867-878.
- Holzbaur, E. L. F. & Vallee, R. B. 1994. Dyneins: Molecular structure and cellular function. *Ann. Rev. Cell Biol.* 10: 339-72.
- Jay, D. & Cantley, L. 1986. Structural aspects of the red cell anion exchange protein. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 511-538.
- Jennings, M. L. 1985. Kinetics and mechanism of anion transport in red blood cells. *Ann. Rev. Physiol.* 47: 519-533.
- Johnston, R. G.; Prendergast, J. A.; Singer, R. A. 1991. The *Saccharomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J. Cell Biol.* 113: 539-51.
- Jonhson, K.A. 1985. Pathways of the microtubule-dynein ATPase and the structure of dynein: A comparison with actomyosin. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14: 161-188.
- Kabsch, W. & Vandekerckhove, J. 1992. Structure and function of actin. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21: 49-76.

- Korn, E. D. 1982. Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol. Rev.* 62: 672-737.
- Korn, E.D. & Hammer, III. J.A. 1988. Myosin of nonmuscle cells. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17: 23-46.
- Kuznetsov, S. A. & Gelfand, V. I. 1986. Bovine brain kinesin is a microtubule-activated ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 8530-4.
- Kuznetsov, S. A.; Vaisberg, E. A.; Shanina, N. A.; Magretova, N. N.; Chernyak, V. Y.; Gelfand, V. I. 1988. The quaternary structure of bovine brain kinesin. *EMBO J.* 7: 353-356.
- Kwiatkowski, A. & King, M. M. 1989. Autophosphorylation of the type II calmodulin-dependent protein kinase is essential for formation of a proteolytic fragment with catalytic activity. Implications for long-term synaptic potentiation. *Biochemistry.* 28: 5380-5385.
- Laemmli, U. K. & Favre, M. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 80: 575-599.
- Larson, R. E.; Espíndola, F. S.; Espreáfico, E. M. 1990. Calmodulin-binding proteins and calcium/calmodulin regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. *J. Neurochem.* 54: 1288-94.
- Larson, R. E.; Ferro, J. A.; Queiroz, E. A. 1986. Isolation and purification of actomyosin ATPase from mammalian brain. *J. Neuros. Methods.* 16: 47-58.
- Larson, R. E.; Pitta, D. E.; Ferro, J. A. 1988. A novel 190 KDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21: 213-17.
- Lassing, I. & Lindberg, U. 1985. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature.* 314: 472-474.

- Le Guellec, R.; Paris, J.; Couturier, A.; Roghi, C.; Philippe, M. 1991. Cloning by differential screening of a *Xenopus* cDNA that encodes a kinesin-related protein. *Mol. Cell. Biol.* 11: 3395-98.
- Leterrier, J. F.; Liem, R. K. H.; Shelanski, M. L. 1982. Interaction between neurofilaments and microtubule-associated proteins: A possible mechanism for intraorganellar bridging. *J. Cell Biol.* 95: 982-986.
- Levine, J. & Willard, M. 1981. Fodrin: axonally transported polypeptides associated with the internal periphery of many cells. *J. Cell Biol.* 90: 631-643.
- Lin, S. X. H. & Collins, C. A. 1992. Immunolocalization of cytoplasmic dynein to lysosomes in cultured cells. *J. Cell Science.* 101: 125-137.
- MacLennan, D. H.; Brandl, C. J.; Korczak, B.; Green, N. M. 1985. Amino acid sequence of a  $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature.* 316: 696-700.
- Matthies, H. J. G.; Miller, R. J.; Palfrey, H. C. 1993. Calmodulin binding to and cAMP-dependent phosphorylation of kinesin light chains modulate kinesin ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 268: 11176-87.
- McIntosh, J. R. 1984. Mechanisms of mitosis. *Trends Biochem. Sci.* 9: 195-198.
- Meluh, P. B. & Rose, M. D. 1990. KAR3, a kinesin-related gene required for yeast nuclear fusion. *Cell,* 60: 1029-41.
- Mercer, J. A.; Seperack, P. K.; Strobel, M. C.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A. 1991. Novel myosin heavy chain encoded by murine *dilute* coat colour locus. *Nature.* 349: 709-13.
- Mitchison, T. J. 1992. Compare and contrast actin filaments and microtubules. *Mol. Biol. Cell.* 3: 1309-1315.

- Montell, C. & Rubin, G. M. 1988. The *Drosophila nina C* locus encodes two photoreceptor cell specific proteins with domains homologous to protein kinases and the myosin heavy chain head. *Cell*. 52: 757-72.
- Mooseker, M. 1993. A multitude of myosins. *Curr. Biol.* 3: 245-248.
- Mooseker, M. S. & Cheney, R. E. 1995. Unconventional myosins. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 11: 633-675.
- Mooseker, M. S.; Wolenski, J. S.; Coleman, T. R.; Hayden, S. M.; Cheney, R. E. 1991. Structural and functional dissection of a membrane-bound mechanoenzyme: brush border myosin-I. In *Ordering the Membrane-Cytoskeleton Trilayer. Current Topics in Membranes*, ed. MS Mooseker, JS Morrow, 38: 31-55. New York: Academic.
- Morrow, J. S.; Speicher, D. W.; Knowles, W. J.; Hsu, C. J.; Marchesi, V. T. 1980. Identification of functional domains of human erythrocyte spectrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 6592-6596.
- Mullins, R. D.; Kelleher, J. F.; Pollard, T. D. 1996. Actin' like actin? *Trends Cell Biol.* 6: 208-212.
- Nairn, A. C.; Hemmings, H. C.; Greengard, P. 1985. Protein kinases in the brain. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 931-976.
- Nascimento, A. A. C.; Cheney, R. E.; Tauhata, S. B. F.; Larson, R. E.; Mooseker, M. S. 1996. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. *J. Biol. Chem.* 271: 17561-17569.
- Niggli, V. & Burger, M. M. 1987. Interaction of the cytoskeleton with the plasma membrane. *J. Membrane Biol.* 100: 97-121.
- Ogawa, K. 1991. Four ATP binding sites in the midregion of the b heavy chain of dynein. *Nature.* 352: 643-45.
- Otsuka, A. J.; Jeyaprakash, A.; Garcia-Anoveros, J.; Tang, L. Z.; Fisk, G.; Harsthorne, T.; Franco, R.; Born, T. 1991. The *C. elegans unc-104* gene encodes a putative kinesin heavy chain-like protein. *Neuron.* 6: 113-22.

- Paschal, B. M. & Vallee, R. B. 1987. Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. *Nature*. 330: 181-183.
- Patussi, E. V. 1996. Caracterização parcial de uma fração enriquecida em atividade ATP/GTPase obtida a partir de testículo de coelho. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia.
- Pollard, T. D. 1982. Myosin purification and characterization. *Meth. Cell Biol.* 24: 333-71.
- Pollard, T. D. & Cooper, J. A. 1982. Methods to characterize actin filament networks. *Meth. Enzymol.* 85: 211-233.
- Pollard, T. D.; Doberstein, S. K.; Zot, H. G. 1991. Myosin I. *Ann. Rev. Physiol.* 53: 653-81.
- Pollard, T. D & Korn, E. D. 1973. Acanthamoeba myosin I: Isolation from *Acanthamoeba castellani* of an enzyme similar to muscle myosin. *J. Biol. Chem.* 248: 4682-90.
- Pratt, M. M.; Hisanaga, S.; Begg, D. A. 1984. An improved purification method for cytoplasmic dynein. *J. Cell. Biochem.* 26: 19-33.
- Reinhard, J.; Scheel, A. A.; Diekman, D.; Hall, A.; Ruppert, C.; Bähler, M. 1995. A novel type of myosin implicated in signalling by rho family GTPases. *EMBO J.* 14: 697-704.
- Salmon, E. D. & Wadsworth, P. 1986. Fluorescence studies of tubulin and microtubule dynamics in living cells. In *Applications of Fluorescence in the Biomedical sciences* (ed. Taylor, D. L.; Waggoner, A. S.; Murphy, R. F.; Lanni, F.; Binge, R. R.), 377-403. Alan R. Liss, New York.
- Santos, A. C. S. 1997. Purificação e caracterização parcial de uma ATPase de encéfalo de rata. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia.
- Saraste, M.; Sibbald, P. R.; Wittinghofer, A. 1990. The P-Loop - A common motif in ATP- GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 15: 430-434.

- Sattilaro, R. F.; Dentler, W. L.; LeCluyse, E. L. 1981. *J. Cell Biol.* 90: 467-473.
- Scholey, J.M. 1990. Multiple microtubule motors. *Nature.* 343: 118-120.
- Scholey, J. M.; Heuser, J.; Yang, J. T.; Goldstein, L. S. B. 1989. Identification of globular mechanochemical heads of kinesin. *Nature.* 338: 355-357.
- Scholey, J. M.; Porter, M. E.; Grissom, P. M.; McIntosh, J. R. 1985. Identification of kinesin in sea urchin eggs, and evidence for its localization in the mitotic spindle. *Nature.* 318: 483-486.
- Schroer, T. A. 1994. Structure, function and regulation of cytoplasmic dynein. *Curr. Opinion Cell Biol.* 6: 69-73.
- Shen, B. W.; Josephs, R.; Steck, T. L. 1984. Ultrastructure of unit fragments of the skeleton of the human erythrocyte membrane. *J. Cell Biol.* 99: 810-821
- Shotton, D. M.; Burke, B. E.; Branton, D. 1979. The molecular structure of human erythrocyte spectrin. *J. Mol. Biol.* 131: 303-329.
- Shpetner, H. S.; Paschal, B. M.; Vallee, R. B. 1988. Characterization of the microtubule-activated ATPase of brain cytoplasmic dynein (MAP 1C). *J. Cell Biol.* 107: 1001-1009.
- Speicher, D. W. 1986. The present status of erythrocyte spectrin structure: the 106-residue repetitive structure is a basic feature of an entire class of proteins. *J. Cell Biochem.* 30: 245-258.
- Speicher, D. W.; Davis, G.; Marchesi, V. T. 1983. Structure of human erythrocyte spectrin. II. The sequence of the alpha-I domain. *J. Biol. Chem.* 258: 14938-14947.
- Speicher, D. W.; Davis, G.; Yurchenco, P. D.; Marchesi, V. T. 1983. Structure of human erythrocyte spectrin. Isolation of the alpha-1 domain and its cyanogen bromide peptides. *J. Biol. Chem.* 258: 14931-14937.

- Speicher, D. W. & Marchesi, V. T. 1984. Erythrocyte spectrin is composed of many homologous triple helical segments. *Nature*. 311: 177-180.
- Speicher, D. W.; Morrow, J. S.; Knowles, W. J.; Marchesi, V. T. 1982. A structural model of human erythrocyte spectrin. Alignment of chemical and functional domains. *J. Biol. Chem.* 257: 9093-9101.
- Studier, F.W. 1973. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J.Mol. Biol.* 79: 237-248.
- Titus, M. A.; Warrick, H. M.; Spudich, J. A. 1989. Multiple actin-based motor genes in *Dictyostelium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 9446-50.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- Tyler, J. M.; Hargreaves, W. R.; Branton, D. 1979. Purification of two spectrin-binding proteins: biochemical and electron microscopic evidence for site-specific reassociation between spectrin and bands 2.1 and 4.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 5192-5196.
- Vale, R. D.; Reese, T. S.; Sheetz, M. P. 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell.* 42: 39-50.
- Vallee, R. 1993. Molecular analysis of the microtubule motor dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 8769-8772.
- Vallee, R. B. & Shpetner, H. S. 1990. Motor proteins of cytoplasmic microtubules. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 909-932.
- Vallee, R. B.; Shpetner, H. S.; Paschal, B. M. 1989. The role of dynein in retrograde axonal transport. *TINS.* 12: 66-70.
- Walker, J. E.; Saraste M.; Runswick, M. G.; Gay, N. J. 1982. Distantly related sequences in the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1: 945-51.

- Wallin, M. & Strömberg, E. 1995. Cold-stable and cold-adapted microtubules. *In. Rev. Citol.* 157: 1-31.
- Wang, C.; Ngai, P. K.; Walsh, M. P.; Wang, J. H. 1987.  $\text{Ca}^{2+}$  and calmodulin-dependent stimulation of smooth muscle actomyosin  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase by fodrin. *Biochemistry.* 26: 1110-1117.
- Warrick, H.M. & Spudick, J.A. 1987. Myosin structure and function in cell motility. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3: 379-421.
- Way, M. & Weeds, A. 1990. Cytoskeletal ups and downs. *Nature.* 344: 292-294.
- Weil, D.; Blanchard, S.; Kaplan, J.; Gullford, P.; Gibson, F.; et al. 1995. Defective myosin VII-A gene responsible for Usher Syndrome type 1B. *Nature.* 374: 60-1.
- Yang, J. T.; Saxton, W. M.; Stewart, R. J.; Raff, E. C.; Goldstein, L. S. B. 1989. Evidence that the head of kinesin is sufficient for force generation and motility in vitro. *Science.* 249: 42-47.
- Zhang, P.; Knowles, B. A.; Goldstein, L. S. B.; Hawley, R. S. 1990. A kinesin-like protein required for distributive chromosome segregation in *Drosophila*. *Cell.* 62: 1053-62.