



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

PRECIPITAÇÃO DE MIOSINAS IIA E IIB DE RIM POR CONGELAMENTO

Aluno: Decivaldo dos Santos Dias

Orientador: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

UBERLÂNDIA – MG

FEVEREIRO - 2010



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

PRECIPITAÇÃO DE MIOSINAS IIA E IIB DE RIM POR CONGELAMENTO

Aluno: Decivaldo dos Santos Dias

Orientador: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

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

UBERLÂNDIA – MG

FEVEREIRO – 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

D541p Dias, Decivaldo dos Santos, 1975-
Precipitação de miosinas IIA e IIB de rim por congelamento
[manuscrito] / Decivaldo dos Santos Dias. - 2010.
79 f. : il.

Orientador:.Milton Vieira Coelho.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Proteínas - Teses. 2. Miosinas - Teses. I. Coelho,
Milton Vieira.
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação
em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.112



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

PRECIPITAÇÃO DE MIOSINAS IIA E IIB DE RIM POR CONGELAMENTO

Aluno: Decivaldo dos Santos Dias

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Milton Vieira Coelho

Examinadores:

Dra. Ana Graci Brito Madurro

Dra. Enilza Maria Espreafico

Dr. Marcelo Valle de Sousa

Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Data de Defesa: 10 / 02 / 2010

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

Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

Uberlândia, ____/____/____



“A espera foi horrível, agora que sei é bem pior”.

“Ou você morre como herói, ou vive o bastante para se tornar vilão”.

“Introduza um pouco de anarquia, altere a ordem estabelecida e tudo vira
caos”.

“A loucura é como a gravidade, só precisa de um empurrão”.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Rita dos Santos Dias e Delcídio Vieira Dias pela amizade, companheirismo e estímulo.

Aos meus filhos Luís Eduardo Alves Dias e Laura Beatriz Alves Dias pelo sorriso inocente.

Aos meus irmãos: Delson, Dinalda, Dinalva, Djalma, Divaldo e Dernevaldo meu eterno agradecimento por todo apoio, amizade e companheirismo.

A todos os meus familiares e amigos que me ajudaram nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao professor e mestre, Milton Vieira Coelho, a mais sincera gratidão pelo apoio e paciência durante a minha formação científica.

Aos companheiros e colegas de laboratório: Ademilton (Papi), Rogério (Rogê); Gabriel (Docinho), Vinícius (Vivi), Hugo Christiano e Dona Maura, pela ajuda e apoio durante a execução de grande parte deste trabalho. A todos, os meus sinceros agradecimentos.

Aos funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

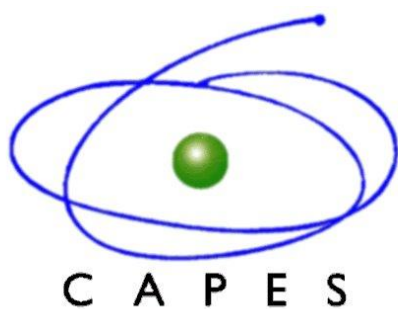
À secretária do Instituto de Genética e Bioquímica, Marlene, pela cooperação e esforço para a obtenção de materiais importantes para a execução deste trabalho.

Aos professores Dr. Foued Salmen Espíndola e o Dr. Cameron que sempre se dispôs a ajudar na minha formação científica.

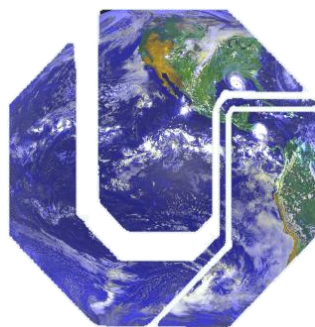
Ao professor Dr. Marcelo Valle de Sousa e ao Colega Gabriel C. Nunes da Cruz do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas – LBQP da Universidade de Brasília – UnB, pela ajuda na identificação dos polipeptídeos desse trabalho.

Aos professores do Instituto de Genética e Bioquímica por fornecerem conhecimentos em forma de disciplinas.

ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO COM O APOIO DAS SEGUINTE
INSTITUIÇÕES:



Fundação de Amparo à Pesquisa do
Estado de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL
DE UBERLÂNDIA

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO E OBJETIVO	1
--------------------------------------	----------

CAPÍTULO I	2
-------------------------	----------

FUNAMENTAÇÃO TEÓRICA: MIOSINAS.

GENERAL SUMMARY	3
------------------------------	----------

RESUMO GERAL	4
---------------------------	----------

INTRODUÇÃO GERAL.....	5
------------------------------	----------

Miosina de Classe I	7
---------------------------	---

Miosina de Classe II	9
----------------------------	---

Miosina de Classe III	12
-----------------------------	----

Miosina de Classe IV.....	13
---------------------------	----

Miosina de Classe V.....	13
--------------------------	----

Miosina de Classe VI.....	16
---------------------------	----

Miosina de Classe VII.....	17
----------------------------	----

Miosina de Classe IX.....	18
---------------------------	----

Miosina de Classe X.....	19
--------------------------	----

Miosina de Classe VIII, XI e XIII	20
---	----

Miosina de Classe XII, XIV, XV, XVI e XVIII	21
---	----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
---	-----------

CAPÍTULO II	43
--------------------------	----

PRECIPITAÇÃO DE MIOSINAS IIA E IIB DE RIM POR CONGELAMENTO.

Abstract	44
Resumo	45
Introdução	46
Material e Métodos	47
Resultados e Discussão	52
Conclusão	62
Referências Bibliográficas	63

ANEXOS	70
---------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Diagrama de miosina II	10
---	----

=====

CAPÍTULO II

Figura 1: SDS-PAGE da preparação de actomiosina de rim de rato.....	54
--	----

Figura 2: p200 é imunologicamente relacionado com miosina II.....	55
--	----

Figura 3: Atividade Mg- e K/EDTA-ATPase da fração P4 de rim de rato	57
--	----

Figura 4: Purificação de p200 em coluna de DEAE-sepharose.....	58
---	----

Figura 5: Ligação e eluição de P_i e ATP de coluna de DEAE-sepharose.....	59
--	----

Figura 6: p200 co-sedimenta com actina de modo ATP-sensível	61
--	----

Tabela I: Bandas de proteínas analisadas por MALDI-TOF MS e Identificadas por procura no NCBI Nonredundant Protein Database Usando Mascot.....	62
---	----

ANEXOS

Anexo I: Fluxograma da purificação de miosina de rim de rato	71
Anexo II: Purificação da atividade K/EDTA-ATPase de miosina de rim de rato	72
Anexo III: Efeito de inibidores na atividade Mg-ATPase de miosina de rim de rato	73
Anexo IV: Espectros gerados para os polipeptídeos p200, p18 e p15	74
Anexo V: Peptídeos derivados de p200 que foram pareados para miosina IIA.....	75
Anexo VI: Peptídeos derivados de p200 que foram pareados para miosina IIB.....	76
Anexo VII: Peptídeos derivados de p18 que foram pareados para miosina IIA.....	77
Anexo VIII: Peptídeos derivados de p15 que foram pareados para cadeia leve de miosina	78
Anexo IX: Marcação de p200 com anticorpos específicos para miosinas IIA e IIB.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

P200 – polipeptídeo de 200 kDa

ATP – Adenosina 5' trifosfato

ATPase – Adenosina trifosfatase

P_i – Fosfato inorgânico

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

EGTA – Ácido N, N, N', N' -tetraacético etileno glicol-bis (β-aminoetil éter)

NBT – nitro azul tetrazólio

BCIP – 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

kDa – Unidade de massa correspondente a 1000 Da (dalton)

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

APRESENTAÇÃO E OBJETIVO

Nosso laboratório tem como linha de pesquisa caracterização de ATPases, que são enzimas que hidrolisam a molécula de adenosina trifosfato (ATP) e acopla a energia liberada à realização de algum trabalho celular. Durante o mestrado tivemos como projeto de estudo a caracterização de miosina II de testículo de rato, obtida a partir de precipitação por congelamento.

No capítulo 1 trazemos a fundamentação teórica deste trabalho com um levantamento geral sobre miosinas. As miosinas constitui uma superfamília de proteínas motoras, que são organizadas em classes. Trazemos as principais características das classes de miosinas conhecidas, fazendo um apanhado dos estudos já realizados.

No capítulo 2 descrevemos a precipitação de um polipeptídeo de rim de rato, que apresentou algumas características de miosinas, como alta atividade K/EDTA-ATPase. Este polipeptídeo foi precipitado a partir do congelamento de fração solúvel de rim de rato, apresentando massa molecular, em SDS-PAGE, de aproximadamente 200 kDa (p200). O processo de precipitação de miosina por congelamento foi anteriormente descrito para miosina II e V, sendo o processo de precipitação de miosina um passo importante na purificação dessas ATPases. O polipeptídeo de rim de rato, precipitado por congelamento, foi identificado por espectrometria de massa, como sendo isoformas de miosina II não muscular.

O objetivo deste trabalho foi utilizar o método de congelamento e descongelamento de fração solúvel para precipitar miosina de rim de rato.

CAPÍTULO I

Fundamentação teórica: miosinas

GENERAL SUMMARY

Myosins, a family of motor proteins involved in movement along of actin filaments plays a fundamental role in cell motility. Myosin constitute a superfamily with over 20 classes, wich is ubiquitous distributed in eukaryotic cells. Some myosins are known only the primary structure and others by recombinant protein. Some of this protein already were purified like full length protein and have been biochemically characterized, as myosin I, II, V and VI. Myosins share some common biochemical properties: ATPase activity in the presence of EDTA and high potassium concentration (K/EDTA-ATPase activity) and low Mg-ATPase activity that is markedly increased by the interaction with actin. Precipitation of actomyosin constitutes an important step to purification of full length myosins. Actomyosin preparation is obtained starting from the precipitation soluble fraction of brain, both in low or high ionic strength buffer and this process allow the purification of myosin II and V. Myosin precipitation (II and V) is assumed to result from its interaction with actin and vesicles. We have obtained actomyosin precipitation starting from freezing of soluble fraction from brain or rat testis. In this work, we shown the purification of myosin IIA and IIB from kidney starting from actomyosin obtained by freezing the soluble fraction of rat kidney.

RESUMO GERAL

Miosinas são ATPases que realizam trabalho celular translocando-se sobre microfilamentos de actina. Constituem uma superfamília com mais de 20 classes. São amplamente distribuídas em todas as células eucarióticas. Algumas são conhecidas apenas a estrutura primária através de seqüência gênica, outras como proteínas expressas através de sistemas recombinantes. Algumas dessas miosinas já foram purificadas como proteínas nativas e encontram-se bem caracterizadas bioquimicamente, como as miosinas I, II, V e VI. Apresentam como características bioquímicas: atividade ATPase na presença de EDTA e alta concentração de potássio (atividade K/EDTA-ATPase) e uma baixa atividade Mg-ATPase, que é altamente estimulada por F-actina. A precipitação de actomiosina é um passo importante para a purificação de miosinas nativas. Preparação de actomiosina é obtida a partir da precipitação de fração solúvel de cérebro tanto em baixa quanto em alta força iônica e esse processo de precipitação permite a purificação de miosina II ou V. É postulado que essa precipitação de miosina (II ou V) seja resultado de sua interação com actina e vesículas. Temos obtido a precipitação de actomiosina a partir do congelamento de fração solúvel de cérebro ou testículo de rato. Neste trabalho mostramos a purificação de miosina IIA e IIB de rim, partindo de actomiosina precipitada através do congelamento de fração solúvel.

INTRODUÇÃO GERAL

As células são estruturas altamente complexas que assumem as mais variadas formas para desenvolver suas funções vitais à manutenção da vida. As células eucarióticas tem desenvolvido métodos altamente especializados de transporte e movimento para desenvolverem suas funções tão eficientemente quanto possível. O transporte de vesículas, pequenas organelas, complexos multiprotéicos e RNA são rapidamente movidos entre diferentes compartimentos celulares usando uma variedade de proteínas motoras que se movem ao longo de uma rede de filamentos de actina ou microtúbulos. O citoesqueleto consiste de uma complexa rede de proteínas responsáveis por muitos processos celulares como citocinese, motilidade e adesão celular. Para desenvolver essas funções o citoesqueleto deve ser altamente dinâmico e ser capaz de se reorganizar rapidamente em regiões específicas da célula, para assim responder a algum sinal extracelular. Nessa complexa rede de estruturas celulares, as miosinas são partes importantes do citoesqueleto e tem um papel fundamental na manutenção celular. Com apenas três classes de miosinas (miosina I, II e V), leveduras parecem apresentar o mínimo número de miosinas requeridas para a sobrevivência de uma célula eucariótica (Brown, 1997).

As miosinas constituem uma das maiores e mais divergentes família de proteínas em células eucarióticas. Baseado em análise do domínio motor, as miosinas compõem uma superfamília que apresenta pelo menos 20 classes (Krendel e Mooseker, 2005). Contudo, análises realizadas com base no sequenciamento genômico sugere pelo menos cerca de 40 classes de miosinas

(Ricards e Cavalier-Smith, 2005). Por outro lado, dados filogenéticos apresentam pelo menos 35 classes de miosinas (Odrionitz e Kollmar, 2007). O termo miosina é usado para designar uma superfamília de proteínas motoras capazes de translocarem sobre microfilamentos de actina ou de transportarem vesículas ou organelas fixando-se a filamentos de actina. São proteínas com atividade ATPase capazes de hidrolisar a molécula de ATP e utilizar a energia liberada para promover trabalho sobre os microfilamentos de actina. Membros da superfamília das miosinas são definidos pela presença de uma cadeia pesada com um domínio catalítico conservado de aproximadamente 80 kDa (também denominado de cabeça). Em muitas miosinas o domínio catalítico é acompanhado por uma região em α -hélice ligante de cadeias leves ou calmodulina, ou de proteínas semelhantes a calmodulina (Hoyt et al, 1997), que consiste de um ou mais motivos IQ (sequência repetida de isoleucina e glutamina), região essa também denominada pescoço. Após o domínio pescoço, segue-se o domínio denominado cauda, que é capaz de ligar a uma carga a ser transportada ou ainda interagir com caudas de outras miosinas. O domínio cauda é a região mais divergente entre as diferentes classes de miosinas, o que confere às miosinas diferentes funções celulares (Hoyt et al, 1997, Buss et al, 2004). Esses três domínios: cabeça, pescoço e cauda constituem o modelo básico de uma molécula de miosina.

Nas últimas décadas muitas miosinas foram identificadas a partir de sequenciamento genético. Estudos com miosinas expressas indicam que elas não possuem a habilidade de formarem filamentos espessos, contudo exercem funções críticas nos processos contráteis ou de motilidade celular (Krendel e Mooseker, 2005; Yoshimura et al, 2001). Algumas dessas miosinas já foram

purificadas como miosina de classe I, II, V e VI, enquanto outras são conhecidas através de expressão gênica ou de sua sequência genética. Essas moléculas também compõem um grupo denominado de motores moleculares, que possuem como propriedade a capacidade de promover trabalho no interior celular.

Miosina de classe II é a mais familiar das miosinas devido ser extensamente estudada no processo de contração muscular. Miosina de tecido muscular estriado esquelético, miosina II de músculo liso e miosina II de células não musculares são denominadas miosinas convencionais, as demais miosinas são denominadas não convencionais. Uma característica evidente de todas as miosinas já caracterizadas é a habilidade de ligar-se reversivelmente ao filamento de actina e hidrolizar o complexo MgATP (atividade Mg-ATPase). Em geral, a atividade Mg-ATPase de miosina sozinha é muito baixa, contudo essa atividade é aumentada na presença de actina filamentosa (F-actina). O análogo *in vitro* da contração muscular é a estimulação da atividade Mg-ATPase na presença de F-actina. Outra característica de miosinas é possuírem atividade ATPase na presença de alta concentração de potássio e ausência de cátions divalentes (atividade K/EDTA-ATPase). Algumas dessas características são exploradas no estudo dessa superfamília de proteínas motoras.

Miosina de Classe I

Miosina I foi a primeira das miosinas não convencionais a ser purificada. Essa classe de miosina caracteriza-se por serem monoméricas (Coluccio, 1994; Coluccio, 1997; Balish et al, 1999). Foi identificada originalmente em

Acanthamoeba castellanii por Pollard e Korn na década de 70 como uma proteína de baixo peso molecular com atividade Mg-ATPase estimulada por F-actina. Constituem um amplo grupo de miosinas não convencionais. São encontradas desde protista, fungos a vertebrados (Coluccio, 1997). Miosina I tem sido identificada em muitos eucariotos superiores (Conzelman e Mooseker, 1987; Coluccio, 1994; Balish et al, 1999). A miosina I presente em vertebrados consiste de uma única cadeia pesada com uma massa molecular de aproximadamente 110 a 130 kDa (Balish et al, 1999; Coluccio, 1994; Coluccio, 1997, Krendel e Mooseker, 2005).

Miosina I apresenta três regiões funcionais: um domínio cabeça localizado na porção amino-terminal da molécula, um domínio pescoço que pode conter de um a seis sítios ligantes de calmodulina e um domínio cauda localizado na porção carboxi-terminal da molécula, o qual está implicado na interação com a carga a ser transportada (Coluccio, 1994; Coluccio, 1997; Lieto-Trivedi e Coluccio, 2008). Apresentam três isoformas denominadas IA, IB e IC, sendo amplamente distribuídas em vertebrados (Barylko et al, 1992; Ruppert et al, 1995; Jontes et al, 1997; Balish et al, 1999). Miosinas de classe I são diversas em estrutura, regulação e função (De La Cruz e Ostap, 2004). São responsáveis pela ultraestrutura das microvilosidades intestinais (Mooseker et al, 1989), estão implicadas na regulação da transcrição do DNA (de Lanerolle et al, 2005), na adesão e motilidade no sistema imune (Kim et al, 2006). A regulação da atividade ATPase de miosina I é variada e inclui a fosforilação da cadeia pesada (Hammer et al, 1983; Albanesi et al, 1983) e a ligação de cálcio nas cadeias leves, que pode inibir ou estimular a sua atividade ATPase (Perreault-Micale et al, 2000; Geeves et al, 2000).

Miosina de Classe II

Miosina II foi a primeira miosina a ser purificada de tecido muscular estriado, e é considerada o modelo convencional de miosina. Apresenta como características ser uma proteína composta por um par de cadeias pesadas (aproximadamente 200 kDa) e dois pares de cadeias leves (aproximadamente 15 a 20 kDa). Um dímero de duas cadeias pesadas de miosina associado com dois pares de cadeias leves forma a molécula funcional de miosina (Sellers, 2000). Miosina II é encontrada em células de músculo esquelético, cardíaco e músculo liso, bem como no citoplasma de células não musculares como por exemplo em plaquetas e leucócitos (Freedman 1999, Sellers 2000). As demais classes de miosinas são ditas não convencionais. Embora a dicotomia convencional ou não-convencional seja puramente artificial em termos de estrutura e evolução, ela é usada mais por questões históricas. Em vertebrados há mais de 15 isoformas de cadeia pesada de miosina II, as quais são geradas por diferentes genes quanto por *splicing* alternativo do pre-RNA que as codificam (Conti e Aldestein, 2008).

Em mamíferos, três isoformas de miosina II não muscular são conhecidas e são codificadas por três genes específicos. Em humanos essas isoformas são codificadas pelos genes: MYH9 codifica a isoforma IIA, MYH10 codifica a isoforma IIB e MYH14 codifica a isoforma IIC, que estão localizados nos diferentes cromossomos (22, 17 e 19), respectivamente (Simons et al, 1991; Franke et al, 2007). Deve-se ressaltar que miosina II não muscular é muito similar a miosina II de músculo liso (Sellers, 1991; Trybus, 1991). Muitas células contêm duas ou mais isoformas de cadeia pesada de miosina, contudo em plaquetas é encontrada somente a isoforma IIA, enquanto que a isoforma IIB é mais

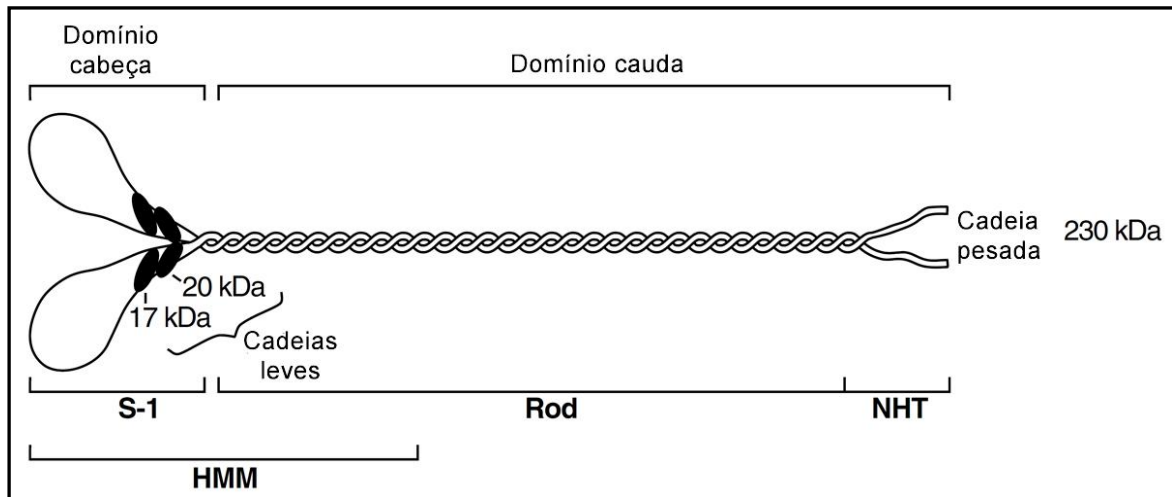


Fig. 1. Diagrama mostrando a molécula de miosina II com o domínio cabeça globular (que contém os sítios ligantes de F-actina e ATP), domínio cauda com a região formadora de filamentos em super hélice de α -hélice e a região não formadora de α -hélice (**NHT**). São também mostrados os domínios proteolíticos **S-1**, **Rod** e **HMM** (meromiosina pesada). Adaptado de Conti e Adelstein, 2008.

enriquecida em cérebro (Murakami et al., 1991). Muito pouco é conhecido sobre as funções das isoformas de miosina II nos diferentes tecidos, embora já se encontre bem documentadas mutações em miosina IIA como um dos fatores precursores de algumas doenças. Uma simples mutação na sequência do gene MYH9 que codifica miosina-IIA não muscular pode levar a macrotrombocitopenias, que é uma doença caracterizada pela formação de plaquetas gigantes (Heath et al, 2001).

A contração muscular resulta da interação cíclica entre os filamentos de actina e miosina. Em baixos níveis de cálcio (10^{-7} M) o músculo está relaxado. A contração inicia-se quando os níveis de cálcio aumenta para cerca de 10^{-6} M. Em músculo esquelético de vertebrados, esta regulação é devido a interação do

complexo protéico troponina-tropomiosina, que se liga ao filamento de actina e bloqueia a interação cíclica entre actina e miosina na ausência de cálcio (Perry, 1979; Adelstein et al, 1980). Em músculo liso e em células não musculares, a regulação de miosina por cálcio dá-se através da fosforilação da cadeia leve de 20 kDa por uma cinase de cadeia leve de miosina dependente de calmodulina (Adelstein et al, 1980, Pato e Adelstein, 1980). *In vitro*, a fosforilação das cadeias leves de ~20 kDa é capaz de aumentar tanto a sua atividade Mg-ATPase na presença de F-actina, quanto a sua motilidade nos microfilamentos de actina (Sellers et al, 1985; Trybus et al, 1994). A fosforilação também tem um papel importante em miosinas II de músculo liso e de tecido não muscular. A fosforilação permite que a miosina II seja capaz de formar filamentos bipolares, por interação através dos domínios cauda, possibilitando à célula promover os processos de motilidade e contração (Adelstein e Conti, 1975; Collins e Korn, 1980; Kamm e Stull, 1985; Mene et al, 1989; Sellers, 1991; Conti e Adelstein, 2008).

A cadeia leve de ~17 kDa ainda não apresenta função bem caracterizada, contudo ela parece ser importante para a interação de miosina com os filamentos de actina. É uma proteína da superfamília de proteínas ligantes de cálcio, similar a calmodulina (Ho e Chisholm, 1997). Estão implicadas nos processos de sinalização por cálcio. Contudo, a cadeia leve essencial (LC17 ou ELC) de miosina II parece não ser um ligante de cálcio (Lenz et al, 1989; Trybus, 1994; Hernandez et al, 2007), sendo observado uma potencial participação da ELC em ativação de miosina II por cálcio apenas em miosina II de molusco (Kwon et al, 1990). Cadeia leve essencial de miosina apresenta isoformas dependente do tecido muscular ou não muscular em estudo (Lenz et al, 1989; Hernandez et al,

2007). São conhecidas duas isoformas de LC17, que apresentam como diferencial entre as isoformas a substituição de um aminoácido na posição 142 da molécula. A isoforma LC17a possui um ácido glutâmico, enquanto que a isoforma LC17b tem uma alanina na posição correspondente da molécula (Hasegawa et al, 1992). Estudos *in vitro* têm demonstrado que mutação em LC17 diminui a atividade de miosina na presença de F-actina, sugerindo um efeito fisiológico na interação miosina-actina (Chen et al, 1995; Ho e Chisholm, 1997).

Miosina de Classe III

Miosinas de classe III foram originalmente identificadas em *Drosophila* (Montell et al, 1988). Essa miosina é expressa em células fotoreceptoras de *Drosophila* como duas proteínas com massas moleculares de 132 ou 174 kDa (Montell e Rubin, 1988, Krendel e Mooseker, 2005). Estudos posteriores revelaram a presença de miosina III também em vertebrados, sendo expressa predominantemente em células sensoriais, tanto em vertebrados quanto em invertebrados (Montell e Rubin, 1988; Batelle et al, 1998). Em vertebrados, miosina III apresenta duas isoformas, uma longa denominada IIIA e uma curta denominada IIIB (Dosé et al, 2003). Estudos sugerem que miosina III seja monomérica (Dosé et al, 2003). Miosina III distingue-se de outras miosinas por apresentar um domínio cinase na sua porção N-terminal. Contudo, compartilha estruturas conservadas de outras miosinas como um domínio motor com o sítio ligante de ATP e actina, bem como um domínio pescoço com motivos IQ e sítios ligantes de calmodulina. Em vertebrados, miosina III pode conter um ou mais

motivos IQ ao longo do domínio cauda, além da localização usual no domínio pescoço (Les Erickson et al, 2003).

Miosina de Classe IV

Miosina de classe IV foi identificada originalmente em *Acanthamoeba*, como um polipeptídeo de massa molecular de 177 kDa que apresentava muitas características pertinentes as miosinas (Horowitz e Hammer III, 1990). Assim como as demais miosinas, apresenta um domínio motor ligante de actina e ATP, um domínio pescoço com um único motivo IQ e um domínio cauda (Horowitz e Hammer III, 1990). Ainda não são bem conhecidas as funções desempenhas por miosina de classe IV.

Miosina de Classe V

Miosina V é uma das mais amplamente distribuídas classe da superfamília de miosinas, sendo encontrada nos mais diversos organismos, desde leveduras a seres humanos (Larson, 1996). Miosina V foi originalmente identificada em cérebro como uma nova proteína ligante de calmodulina com atividade ATPase, sendo inicialmente denominada como p190 por apresentar mobilidade relativa em gel de aproximadamente 190 kDa (Larson et al, 1988). Foi então purificada como proteína nativa, o que contribuiu para uma melhor caracterização e compreensão

das funções dessa miosina (Espindola et al, 1992; Coelho e Larson, 1993; Cheney et al, 1993; Nascimento et al, 1996). A partir da determinação de sua estrutura primária, p190 foi então classificado como miosina V (Espreafico et al, 1992). São conhecidas três isoformas para essa proteína que foram encontradas em tecidos distintos, sendo elas as isoformas Va, Vb e Vc (Rodriguez e Cheney, 2002; Bridgman, 2004).

Miosina V é uma proteína multimérica composta por duas cadeias pesadas com cerca de 212 kDa (Espreafico et al, 1992, Cheney et al, 1993). Miosina V apresenta um cabeça globular, na porção N-terminal da molécula, que possui o sítio ligante de actina e ATP, cuja determinação da estrutura primária dessa miosina mostrou ser um domínio altamente conservado entre os organismos (Larson, 1996). Apresenta também um pescoço que contém seis motivos IQ nos quais se ligam cadeias leves ou calmodulina. Ensaios de cosedimentação com F-actina sugere que cada cadeia pesada de miosina V liga quatro calmodulinas, uma cadeia leve de ~17 kDa e uma cadeia leve de ~23 kDa (Cheney et al, 1993). Miosina V contém um domínio cauda na região C-terminal apresentando regiões globulares em sua estrutura, que além de ser responsável pela dimerização da molécula parece interagir com a carga a ser transportada (Cheney et al, 1993; Larson, 1996; Kendrel e Mooseker, 2005; Espindola et al, 2008).

Em vertebrados, miosina V está subdividida em três subclasses: miosina Va presente em cérebro (Espindola et al, 1992; Cheney et al, 1993; Nascimento et al, 1996), miosina Vb presente em tecido epitelial e cérebro (Lapierre et al, 2001) e miosina Vc presente em tecidos glandulares e epiteliais como pâncreas, próstata e fígado (Rodriguez e Cheney, 2002; Lapierre et al, 2001; Bridgman,

2004; Marchelletta et al, 2008). Estudos mostram que miosina V é uma molécula processiva (caminha, similar a um bípede) que realiza movimento sobre um único filamento de actina em direção a superfície celular (Veigel et al, 2002; Vilfa et al, 2005; Clemen et a, 2005).

Estudos com camundongos que apresentam mutação para o gene que codifica miosina V (camundongos *dilute*), tem mostrado que esses animais apresentam uma diminuição da coloração da pelagem, devido à deficiência no transporte de melanossomos (Mercer et al, 1991). Essa característica é similar ao observado para a síndrome de Griscelli (em humanos), que é uma doença hereditária caracterizada por deficiência autoimune e albinismo parcial (Provance et al, 1996; Lapierre et al, 2001; Menasche et al, 2003; Bridgiman, 2004). O movimento de melanossomas, para distâncias longas no interior celular, parece ser feito por motores moleculares baseados em microtúbulos. Por outro lado, miosina V apresenta uma localização em região mais periférica da célula, assim na ausência de miosina V para efetuar o transporte dessas vesículas, o movimento ocorre para frente e para trás ao longo dos microtúbulos não chegando a periferia celular (Wu et al, 1998). Estudos têm evidenciado a importância fisiológica de miosina V no transporte de vesículas e organelas sobre os microfilamentos de actina, e que esse transporte parece ser via interação com o domínio cauda da molécula de miosina V (Nascimento et al, 1997; Schott et al, 1999; Lapierre et al, 2001; Menasche et al, 2003; Bridgman, 2004).

Todas as miosinas de classe V de vertebrados apresentam em sua cadeia pesada uma sequência PEST, localizado no domínio cauda. A sequência PEST é uma região rica em aminoácidos prolina, ácido glutâmico, serina e treonina. Esta sequência é encontrada em muitas proteínas que apresentam uma alta taxa de

renovação proteica ou *turnover* (Rogers et al, 1986). Tem sido mostrado que a sequência PEST é um importante sítio para proteólise mediado por proteossoma 26S e por calpaína, uma protease dependente de cálcio (Rechsteiner e Rogers, 1996).

Miosina de Classe VI

Miosina VI foi originalmente descoberta em *Drosophila melanogaster* e identificada como o primeiro membro de uma nova classe de miosina (Kellerman e Miller, 1992) e posteriormente identificada também em mamíferos (Hasson e Mooseker, 1994). Os filamentos de actina, assim como os microtúbulos, são polarizados no sentido de sua polimerização, com uma extremidade mais (+) voltada para a periferia celular, e uma extremidade menos (-) voltada para o centro celular (Wells et al, 1999; De La Cruz e Ostap, 2001; Hasson, 2003). Miosina VI é a única miosina atualmente conhecida que se move em direção à extremidade (-) do filamento de actina (Wells et al, 1999; De La Cruz e Ostap, 2001; Hasson, 2003). Miosina VI apresenta uma massa molecular em torno de 140 kDa (Hasson e Mooseker, 1994. Yoshimura et al, 2001; Krendel e Mooseker, 2005). Miosina VI apresenta a estrutura básica das miosinas com uma cabeça na qual estão presentes os sítios ligantes de ATP e actina, um curto pescoço que possui um único motivo IQ ligante de cadeias leves ou calmodulina, sendo que entre o domínio motor e o domínio pescoço há uma inserção de 53 aminoácidos a qual parece ser responsável pelo movimento reverso da molécula de miosina VI (Wells et al, 1999; Lister et al, 2004; Krendel e Mooseker, 2005). A cauda possui

uma região globular na porção terminal sugerindo, a princípio, estar envolvida na dimerização da molécula (Wells et al, 1999; Kendrel e Mooseker, 2005). Embora seja monomérica, miosina VI é funcionalmente ativa como um dímero de cadeias pesadas. A dimerização da molécula ocorre a partir da ligação da porção globular do domínio cauda com a carga a ser transportada, sendo essa dimerização mediada pela proteína Dab2 (Yu et al, 2009).

Em células de mamíferos são conhecidas quatro isoformas de miosina VI. Uma contendo uma longa inserção de aproximadamente 23 a 31 aminoácidos entre a porção em α -hélice e a porção globular do domínio cauda, outra com uma pequena inserção de aproximadamente nove aminoácidos dentro do domínio globular, outra com ambas as inserções e outra que não apresenta nenhuma das inserções (Buss et al, 2001). As isoformas com inserções longas são expressas principalmente em tecidos polarizados como rim, fígado e intestino delgado, o que sugere que miosina VI apresenta importância fisiológica nos processos de endocitose e exocitose (Buss et al, 2004, Arden et al, 2007). Em células de mamíferos, miosina VI tem aparente função no transporte de endossomos, manutenção da morfologia e secreção de vesículas pelo complexo de Golgi (Warner et al, 2003).

Miosina de Classe VII

Miosina VII foi inicialmente identificada em camundongos tipo *shaker-1*, os quais apresentavam mutação, em um gene recessivo, que causava surdez. Em humanos, mutações no gene que codifica miosina VII é responsável pela

síndrome de Usher tipo 1B, doença caracterizada por surdez congênita, disfunção vestibular e retinite pigmentosa (Gibson et al, 1995; Hasson et al, 1995). Miosinas de classe VII são compostas por um domínio motor ligante de actina e ATP na porção N-terminal da molécula, um domínio pescoço com quatro ou cinco motivos IQ e um longo domínio cauda com vários subdomínios (Kiehart et al, 2004). O domínio cauda da cadeia pesada de miosina apresenta dois subdomínios MyTH4 (subdomínio homólogo ao domínio cauda de miosina 4), um subdomínio SH3 e dois subdomínios FERM [tradução livre: “ezerina”, radixina e moesina] (Pearson et al, 2000; Titus, 2005, Krendel e Mooseker, 2005). Os subdomínios MyTH4 e FERM parecem ser importantes para a interação de miosina VII com componentes juncionais (interação célula-célula) de estereocílios (Titus, 2005, Krendel e Mooseker, 2005). Possuem uma massa molecular de ~240 kDa e são preditas formarem dímeros de cadeias pesadas (Chen et al, 2001; Krendel e Mooseker, 2005; Yang et al, 2006). São encontradas em diversos organismos, apresentando duas isoformas VIIA e VIIB (Hasson e Mooseker, 1996). Mutações no gene que codifica miosina VIIA são responsáveis por doenças hereditárias em camundongos e humanos (Gibson et al, 1995; Hasson et al, 1995; Hasson, 1996). Em humanos, mutações em miosina VIIA está relacionada com a perda auditiva e cegueira progressiva (Hasson et al, 1996).

Miosina de Classe IX

Miosina de classe IX foi inicialmente descoberta em estudos para novas miosinas, usando PCR (Wirth et al, 1993; Bement et al, 1994). Sendo também

encontradas em mamíferos (Bement et al, 1994; Reinhard et al, 1995). Miosina IX é um motor molecular que contém em seu domínio cauda um sítio estimulante da atividade GTPase de pequenas proteínas G da família Rho (Rho-GAP) e um domínio ligante de zinco (Reinhard et al, 1995). Com uma região no domínio motor homóloga a um domínio associado a Ras (Redowicz, 2007). Apresenta de quatro a cinco motivos IQ. É considerada um monômero de cadeia pesada, mas que apresenta processividade, assim como miosina V, mas a uma velocidade aproximadamente 10 vezes menor que miosina V (O'Connell e Mosseker, 2003). Apresenta uma massa molecular entre 230 a 290 kDa (Gorman et al., 1999; Wirth et al., 1996, Krendel e Mooseker, 2005). Em humanos são conhecidos dois genes que codificam as isoformas: IXA com uma massa molecular de ~290 kDa e a IXB com uma massa de ~250 kDa, que diferem entre si no número de motivos IQ (Wirth et al., 1996). A presença de um domínio Rho-GAP ativo e uma localização cortical dessa miosina, sugere uma possível participação em processos de sinalização nos quais ocorre a participação do citoesqueleto de actina (Bahler et al, 2000; Wirth et al., 1996). Miosina IX é expressa tanto em vertebrados quanto em invertebrados (Thompson e Langford, 2002).

Miosina de Classe X

Miosina X foi primeiramente identificada em aparelho auditivo de sapo e posteriormente em mamíferos (Solc et al, 1994). Miosina X apresenta uma massa molecular de ~230 kDa com um domínio motor, um domínio pescoço contendo três motivos IQ e um domínio cauda contendo três domínios

homólogos a “plekstrin”: domínios estes geralmente encontrados em proteínas que estão envolvidas com transdução de sinal (Berg et al, 2000). O domínio cauda de miosina X também apresenta uma sequência PEST em geral presente em proteínas que apresentam clivagem por proteases dependentes de cálcio semelhante a calpaína, sendo observado a presença de polipeptídeos gerados quando miosina X é incubada com calpaína (Rechsteiner e Rogers, 1996; Berg et al, 2000).

Miosina de Classe VIII, XI e XIII

Miosina de classe VIII foi identificada em plantas (Knight e Kendrick-Jones, 1993), posteriormente foram identificados mais seis membros dessa classe. São preditas como proteínas diméricas com uma cadeia pesada em torno de 130 kDa (Reichelt, *et al*, 1999), podem apresentar de três a quatro motivos IQ. A função dessa miosina ainda não está bem caracterizada.

Miosina de classe XI foi encontrada primeiramente em algas verdes e posteriormente em plantas superiores (Yokota e Shimmen, 1994; Yokota et al, 1999). Possuem uma cadeia pesada em torno de 170 a 240 kDa e são estruturalmente semelhantes a miosina V, apresentando de cinco a seis motivos IQ e apresentando processividade em ensaios de motilidade *in vitro* (Kinkema e Schiefelbein, 1994; Tominaga et al, 2003). Assim como miosina V, miosina XI parece estar envolvida no transporte de vesículas e organelas em células de plantas (Yokota e Shimmen, 1994; Yokota et al, 1999).

Miosina de classe XIII foi identificada em algas verdes, *Acetabularia cliftonii* e são conhecidos apenas dois genes que codificam essa miosina (Cope et al, 1996). Miosina XIII apresenta uma massa molecular de ~100 kDa e assim como todas as miosinas apresenta um domínio motor ligante de actina e ATP, um domínio pescoço contendo de três a cinco motivos IQ e um domínio cauda. Assim como miosina de classe I, miosina de classe XIII possui um domínio cauda curto e parece ser um monômero de cadeia pesada, que parece estar envolvida no transporte de vesículas em células vegetais (Cope et al, 1996; Vugrek et al, 2003). Miosinas de classe VIII, XI e XIII ainda não estão bem caracterizadas e essas miosinas parecem ser exclusivas de plantas, pois só foram encontradas em células vegetais (Sellers, 2000).

Miosina de Classe XII, XIV, XV, XVI e XVIII

Miosina de classe XII foi identificada em *Caenorhabditis elegans* pelo projeto genoma (Baker e Titus, 1997). Apresenta uma massa molecular de ~300 kDa, apresenta dois motivos IQ, contudo não se sabe se esta miosina é capaz de formar um dímero de duas cadeias pesadas e ainda não é conhecida a função dessa miosina (Baker e Titus, 1997; Sellers, 2000).

Miosina de classe XIV foi identificada em *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum* e são conhecidos sete membros dessa classe (Heintzelman e Schwartzman, 1997; Hettmann et al, 2000). Possuem uma massa molecular de ~120 kDa, não possuem um domínio pescoço bem definido e também não

apresentam motivos IQ comum de miosinas não convencionais e um domínio cauda altamente variável (Heintzelman e Schwartzman, 1997). Embora essas miosinas estejam presentes apenas nesses parasitas, ainda não está bem documentado se esta classe de miosina está envolvida com a invasão celular por esses parasitas (Heintzelman e Schwartzman, 1997).

Miosina de classe XV foi identificada tanto em humanos quanto em camundongos do tipo *shaker 2* (Probst et al, 1998; Wang et al, 1998), cuja mutação em miosina XV era responsável por causar surdez tanto em humanos quanto em camundongos. Miosina XV apresenta uma das maiores cadeias pesadas que possui uma massa molecular predita de ~390 kDa (Liang et al, 1998, Krendel e Mooseker, 2005). Esta miosina apresenta o domínio cauda semelhante ao domínio cauda de miosina VII, o que sugere que essas miosinas possam desempenhar funções celulares semelhantes (Liang et al, 1999).

Miosina de classe XVI foi originalmente descrita em rato apresentando duas isoformas A e B e possuem uma massa molecular de ~210 kDa. Miosina XVI é caracterizada por apresentar uma região N-terminal com uma sequência repetida de oito “ankyrin” (sequência de aminoácidos: alanina, asparagina, lisina, tirosina, arginina, isoleucina e asparagina). É encontrada predominantemente em células neuronais e parece estar envolvida em processos de sinalização e migração celular (Patel et al, 2001).

Miosina de classe XVIII apresenta duas isoformas, uma presente em camundongos (XVIII A) e outra em humanos (XVIII B). Foram descobertas em células hematopoiéticas de camundongos (Furasawa et al, 2000) e por

sequenciamento de DNA derivado de tecido muscular esquelético de humanos (Salamon et al, 2003). Apresenta uma massa molecular de ~200 kDa e por estar presente em células estriadas postula-se que essa miosina possa estar envolvida na transcrição gênica para várias proteínas musculares (Salamon et al, 2003).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adelstein RS, Conti MA, Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity, *Nature* 256 (1975) 597–598.

Adelstein RS, Conti MA, Pato MD, Regulation of myosin light chain kinase by reversible phosphorylation and calcium-calmodulin, *Ann N Y Acad Sci* 356 (1980) 142–150.

Adelstein RS, Eisenberg E, Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction, *Annu Rev Biochem* 49 (1980) 921–956.

Albanesi JP, Hammer JA 3rd, Korn ED, The interaction of F-actin with phosphorylated and unphosphorylated myosins IA and IB from *Acanthamoeba castellanii*, *J Biol Chem* 258 (1983) 10176–10181.

Arden SD, Puri C, Au JS, Kendrick-Jones J, Buss F, Myosin VI is required for targeted membrane transport during cytokinesis, *Mol Biol Cell* 18 (2007) 4750–4761.

Baines IC, Korn ED, Localization of myosin IC and myosin II in *Acanthamoeba castellanii* by indirect immunofluorescence and immunogold electron microscopy, *J Cell Biol* 111 (1990) 1895–1904.

Bahler, M, Are class III and class IX myosins motorized signalling molecules?, *Biochim Biophys Acta* 1496 (2000) 52–59.

Baker JP, Titus MA, A family of unconventional myosins from the nematode *Caenorhabditis elegans*, *J Mol Biol* 272 (1997) 523–535.

Balish MF, Moeller III EF, Coluccio LM, Overlapping distribution of the 130 and 110 kDa myosin I isoforms on rat liver membranes, *Arch Biochem Biophys* 370 (1999) 285–293.

Barylko B, Wagner MC, Reizes O, Albanesi JP, Purification and characterization of a mammalian myosin I, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 490–494.

Battelle BA, Andrews AW, Calman BG, Sellers JR, Greenberg RM, Smith WC, A Myosin III from *Limulus* Eyes Is a Clock-Regulated Phosphoprotein, *J Neurosci* 18 (1998) 4548–4559.

Bement WM, Hasson T, Wirth JA, Cheney RE, Mooseker MS, Identification and overlapping expression of multiple unconventional myosin genes in vertebrate cell types, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 6549–6553. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 11767.

Berg JS, Derfler BH, Pennisi CM, Corey DP, Cheney RE, Myosin-X, A novel myosin with pleckstrin homology domains, associates with regions of dynamic actin. *J Cell Sci* 113 (2000) 3439–3451.

Bridgman PC, Myosin-dependent transport in neurons, *J Neur* 58 (2004) 164–174.

Brown SS. Myosins in yeast, *Curr Opin Cell Biol* 9 (1997) 44–48.

Brown ME, Bridgman PC, Myosin function in nervous and sensory systems, *J Neurobiol* 58 (2004) 118–130.

Buss F, Spudich G, Kendrick-Jones J. Myosin VI: cellular functions and motor properties, *Annu Rev Cell Dev Biol* 20 (2004) 649–676.

Buss F, Luzio JP, Kendrick-Jones J, Myosin VI, a new force in clathrin mediated endocytosis, *FEBS Lett* 508 (2001) 295–299.

Buss F, Arden SD, Lindsay M, Luzio JP, Kendrick-Jones J, Myosin VI isoform localized to clathrin-coated vesicles with a role in clathrin-mediated endocytosis, *EMBO J* 20 (2001) 3676–3684.

Chen TL, Kowalczyk PA, Ho G, Chisholm RL, Targeted disruption of the Dictyostelium myosin essential light chain gene produces cells defective in cytokinesis and morphogenesis, *J Cell Sci* 108 (1995) 3207–3218.

Chen ZY, Hasson T, Zhang DS, Schwender BJ, Derfler BH, Mooseker MS, Corey DP, Myosin-VIIb, a novel unconventional myosin, is a constituent of microvilli in transporting epithelia, *Genomics* 72 (2001) 285–296.

Cheney RE, O'Shea MK, Heuser JE, Coelho MV, Wolenski JS, Espreafico EM, Forscher P, Larson RE, Mooseker MS, Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity, *Cell* 75 (1993) 13–23.

Clemen AEM, Vilfan M, Jaud J, Zhang J, Barmann M, Rief M, Force-dependent stepping kinetics of myosin V, *Biophys J* 88 (2005) 4402–4410.

Coelho MV, Larson RE, Ca²⁺-dependent phosphorylation of the tail domain of myosin-V, a calmodulin-binding myosin in vertebrate brain, *Braz J Med Biol Res* 26 (1993) 465–472.

Collins JH, Korn ED, Actin activation of Ca²⁺-sensitive Mg²⁺-ATPase activity of *Acanthamoeba* myosin II is enhanced by dephosphorylation of its heavy chains, *J Biol Chem* 255 (1980) 8011–8014.

Coluccio LM, Bretscher A, Reassociation of microvillar core proteins: making a microvillar core in vitro, *J Cell Biol* 108 (1989) 495–502.

Coluccio LM, Differential calmodulin binding to three myosin-1 isoforms from liver, *J Cell Sci* 107 (1994) 2279–2284.

Coluccio LM, Myosin I, *Am J Physiol* 273 (1997):C347–359.

Coluccio LM, Geeves MA, Transient kinetic analysis of the 130-kDa myosin I (MYR-1 gene product) from rat liver. A myosin I designed for maintenance of tension?, *J Biol Chem* 274 (1999) 21575–21580.

Conti MA, Adelstein RS, Nonmuscle myosin II moves in new directions, *J Cell Sci* 121 (2008) 11–18.

Conzelman KA, Mooseker MS, The 110-kd protein-calmodulin complex of the intestinal microvillus is an actin-activated MgATPase, *J Cell Biol* 105 (1987) 313–324.

Cope MJ, Whisstock J, Rayment I, Kendrick-Jones J, Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function, *Structure* 4 (1996) 969–987.

de Lanerolle P, Johnson T, Hofmann WA. Actin and myosin I in the nucleus: what next?, *Nat Struct Mol Biol* 12(2005) 742–746.

De La Cruz EM, Ostap EM, Sweeney HL, Kinetic mechanism and regulation of myosin VI, *J Biol Chem* 276 (2001) 32373–32381.

De La Cruz EM, Ostap EM, Relating biochemistry and function in the myosin superfamily, *Curr Opin Cell Biol* 16 (2004) 61–67.

Dosé AC, Hillman DW, Wong C, Sohlberg L, Lin-Jones J, Burnside B, Myo3A, one of two class III myosin genes expressed in vertebrate retina, is localized to the calycal processes of rod and cone photoreceptors and is expressed in the sacculus, *Mol Biol Cell* 14 (2003) 1058–1073.

Espindola FS, Espreafico EM, Coelho MV, Martins AR, Costa FR, Mooseker MS, Larson RE, Biochemical and immunological characterization of p190 calmodulin complex from vertebrate brain: A novel calmodulin-binding myosin, *J Cell Biol* 118 (1992) 359–368.

Espindola FS, Banzi SR, Calabria LK, Custódio RJ, Oliveira RA, Procópio LD, Lima AB, Cunha-Junior JP, Coelho MV, Guedes IM, Pellizzon CH, Larson RE, Espreafico EM, Localization of myosin-Va in subpopulations of cells in rat endocrine organs, *Cell Tissue Res* 333 (2008) 263–279.

Espreafico EM, Cheney RE, Matteoli M, Nascimento AA, De Camilli PV, Larson RE, Mooseker MS, Primary structure and cellular localization of chicken Brain Myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains, *J. Cell Biol.*, 119 (1992) 1541–1557.

Fath KR, Trimbur GM, Burgess DR, Molecular motors are differentially distributed on Golgi membranes from polarized epithelial cells, *J Cell Biol* 126 (1994) 661–75.
Franke JD, Montague RA, Rickoll WL, Kiehart DP, An MYH9 human disease model in flies: site-directed mutagenesis of the *Drosophila* non-muscle myosin II results in hypomorphic alleles with dominant character, *Hum Mol Genet* 16 (2007) 3160–3173.

Furusawa T, Ikawa S, Yanai N, Obinata M, Isolation of a novel PDZ-containing myosin from haematopoietic cells supportive bone marrow stromal cell lines, *Biochem Biophys Res Commun* 270 (2000) 67–75.

Geeves MA, Perreault-Micale C, Coluccio LM, Kinetic analyses of a truncated mammalian myosin I suggest a novel isomerization event preceding nucleotide binding, *J Biol Chem* 275 (2000) 21624–21630.

Gibson F, Walsh J, Mburu P, Varela A, Brown KA, Antonio M, Beisel KW, Steel KP, Brown SD, A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1, *Nature* 374 (1995) 62–64.

Gorman SW, Haider NB, Grieshammer U, Swiderski RE, Kim E, Welch JW, Searby C, Leng S, Carmi R, Sheffield VC, Duhl DM, The cloning and developmental expression of unconventional myosin IXA (MYO9A) a gene in the Bardet-Biedl syndrome (BBS4) region at chromosome 15q22-q23, *Genomics* 59 (1999) 150–160.

Hammer JA 3rd, Albanesi JP, Korn ED, Purification and characterization of a myosin I heavy chain kinase from *Acanthamoeba castellanii*, J Biol Chem 258 (1983) 10168–10175.

Hasegawa Y, Ueda Y, Watanabe M, Morita F, Studies on aminoacid sequences of two isoforms of 17-kDa essential light chain of smooth muscle myosin from porcine aorta media, J Biochem 111 (1992) 798–803.

Hasson T, Mooseker MS, Porcine myosin-VI: characterization of a new mammalian unconventional myosin, J Cell Biol 127 (1994) 425–440.

Hasson T, Heintzelman MB, Santos-Sacchi J, Corey DP, Mooseker MS. A, Expression in cochlea and retina of myosin VIIa, the gene product defective in Usher syndrome type 1B, Proc Natl Acad Sci US 92 (1995) 9815–9819.

Hasson T, Mooseker MS, Vertebrate unconventional myosins, J Biol Chem 271 (1996) 16431–16434.

Hasson T, Molecular motors: sensing a function for myosin-VIIa, Curr Biol 9 (1999) R838–841.

Hasson T, Skowron JF, Gilbert DJ, Avraham KB, Perry WL, Bement WM, Anderson BL, Sherr EH, Chen ZY, Greene LA, Ward DC, Corey DP, Mooseker MS, Copeland NG, Jenkins NA. Mapping of unconventional myosins in mouse and human, Genomics 36 (1996) 431–439.

Hasson T, Myosin VI: two distinct roles in endocytosis, J Cell Sci 116 (2003) 3453–3461.

Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, Rozenfeld-Granot G, Carlsson LE, Savige J, Denison JC, Gregory MC, White JG, Barker DF, Greinacher A, Epstein CJ, Glucksman MJ, Martignetti JA, Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes, *Am J Hum Genet* 69 (2001) 1033–1045.

Heintzelman MB, Schwartzman JD, A novel class of unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*, *J Mol Biol* 271 (1997) 139–146.

Hernandez OM, Jones M, Guzman G, Szczesna-Cordary D, Myosin essential light chain in health and disease, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292 (2007) H1643–H654.

Hettmann C, Herm A, Geiter A, Frank B, Schwarz E, Soldati T, Soldati D, A dibasic motif in the tail of a class XIV apicomplexan myosin is an essential determinant of plasma membrane localization, *Mol Biol Cell* 11 (2000) 1385–1400.

Ho G, Chisholm RL, Substitution mutations in the myosin essential light chain lead to reduced actin-activated ATPase despite stoichiometric binding to the heavy chain, *J Biol Chem* 272 (1997) 4522–4527.

Horowitz JA, Hammer JA 3rd, A new *Acanthamoeba* myosin heavy chain. Cloning of the gene and immunological identification of the polypeptide, *J Biol Chem* 265 (1990) 20646–20652.

Hoyt MA, Hyman AA, Bähler M, Motor proteins of the eukaryotic cytoskeleton, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 12747–12748.

Iwaki M, Tanaka H, Iwane AH, Katayama E, Ikebe M, Yanagida T, Cargo-binding makes a wild-type single-headed myosin-VI move processively, *Biophys J* 90 (2006) 3643–3652.

Jontes JD, Milligan RA, Pollard TD, Ostap EM, Kinetic characterization of brush border myosin-I ATPase, *PNAS* 94 (1997) 14332–14337.

Jontes JD, Milligan RA, Brush Border Myosin-I Structure and ADP-dependent Conformational Changes Revealed by Cryoelectron Microscopy and Image Analysis, *J Cell Biol* 139 (1997) 683–693.

Kamm KE, Stull JT. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25 (1985) 593–620.

Kellerman KA, Miller KG, An unconventional myosin heavy chain gene from *Drosophila melanogaster*, *J Cell Biol* 119 (1992) 823–834.

Kiehart DP, Franke JD, Chee MK, Montague RA, Chen TL, Roote J, Ashburner M, *Drosophila* crinkled, mutations of which disrupt morphogenesis and cause lethality, encodes fly myosin VIIA, *Genetics* 168 (2004) 1337–1352.

Kinkema M, Schiefelbein J, A Myosin from a Higher Plant has Structural Similarities to Class V Myosins, *J Mol Biol* 239 (1994) 591–597.

Kim SV, Mehal WZ, Dong X, Heinrich V, Pypaert M, Mellman I, Dembo M, Mooseker MS, Wu D, Flavell RA, Modulation of Cell Adhesion and Motility in the Immune System by Myo1f, *Science* 314 (2006) 136–139.

Knight AE, Kendrick-Jones J, A myosin-like protein from a higher plant, *J Mol Biol* 231(1993) 148–154.

Krendel M, Mooseker MS, Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiol* 20 (2005) 239–251.

Kwon H, Goodwin EB, Nyitray L, Berliner E, O'Neill-Hennessey E, Melandri FD, Szent-Györgyi AG, Isolation of the regulatory domain of scallop myosin: role of the essential light chain in calcium binding, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 4771–4775.

Lapierre LA, Kumar R, Hales CM, Navarre J, Bhartur SG, Burnette JO, Provance DW Jr, Mercer JA, Bähler M, Goldenring JR, Myosin Vb Is Associated with Plasma Membrane Recycling Systems, *Mol Biol Cell* 12 (2001) 1843–1857.

Larson RE, Pitta DE, Ferro JA, A novel 190 kDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin, *Braz J Med Biol Res* 21 (1988) 213–217.

Larson RE, Myosin-V: a class of unconventional molecular motors, *Braz J Med Biol Res* 29 (1996) 309–318.

Lenz S, Lohse P, Seidel U, Arnold HH, The alkali light chains of human smooth and nonmuscle myosins are encoded by a single gene. Tissue-specific expression by alternative splicing pathways, *J Biol Chem* 264 (1989) 9009–9015.

Les Erickson F, Corsa AC, Dose AC, Burnside B, Localization of a Class III Myosin to Filopodia Tips in Transfected HeLa Cells Requires an Actin-binding Site in its Tail Domain, *Mol Biol Cell* 14 (2003) 4173–4180

Liang Y, Wang A, Belyantseva IA, Anderson DW, Probst FJ, Barber TD, Miller W, Touchman JW, Jin L, Sullivan SL, Sellers JR, Camper SA, Lloyd RV, Kachar B, Friedman TB, Fridell RA, Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker 2, *Genomics* 61 (1999) 243–258.

Lieto-Trivedi A, Coluccio LM, Calcium, nucleotide, and actin affect the interaction of mammalian Myo1c with its light chain calmodulin, *Biochemistry* 2008 Sep 23 (2008) 10218–10226.

Lister I, Schimitz S, Walker M, Trinick J, Buss F, Veigel C, Kendrick-Jones J, A monomeric myosin VI with a large working stroke, *EMBO J* 23 (2004) 1729–1738.

Marchelletta RR, Jacobs DT, Schechter JE, Cheney RE, Hamm-Alvarez SF, The class V myosin motor, myosin 5c, localizes to mature secretory vesicles and facilitates exocytosis in lacrimal acini, *Am J Physiol Cell Physiol* 295 (2008) C13–C28.

Ménasché G, Ho CH, Sanal O, Feldmann J, Tezcan I, Ersoy F, Houdusse A, Fischer A, de Saint Basile G., Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (GS3) or a MYO5A F-exon deletion (GS1), *J Clin Invest* 112 (2003) 450–456.

Mercer JA, Seperack PK, Strobel MC, Copeland NG, Jenkins NA, Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus, *Nature* 349 (1991) 709–713.

Mene P, Simonson MS, Dunn MJ, Physiology of the mesangial cell, *Physiol Rev* 69 (1989) 1347–1424.

Michael A. Geeves, Cynthia Perreault-Micale, and Lynne M. Coluccio, Kinetic Analyses of a Truncated Mammalian Myosin I Suggest a Novel Isomerization Event Preceding Nucleotide Binding, *J Biol Chem* 275 (2000) 21624–21630.

Montell C, Rubin GM, The *Drosophila* ninaC locus encodes two photoreceptor cell specific proteins with domains homologous to protein kinases and the myosin heavy chain head, *Cell* 52 (1988) 757–772.

Mooseker MS, Tilney LG, Organization of an actin filament-membrane complex. Filament polarity and membrane attachment in the microvilli of intestinal epithelial cells, *J Cell Biol* 67 (1975) 725–743.

Mooseker MS, Conzelman KA, Coleman TR, Heuser JE, Sheetz MP, Characterization of Intestinal Microvillar Membrane Disks: Detergent-resistant Membrane Sheets Enriched in Associated Brush Border Myosin I (110K-Calmodulin), *J Cell Biol* 109 (1989) 1159–1161.

Murakami N, Mehta P, Elzinga M, Studies on the distribution of cellular myosin with antibodies to isoform-specific synthetic peptides, *FEBS Lett* 278 (1991) 23–25.

Nascimento AA, Cheney RE, Tauhata SB, Larson RE, Mooseker MS, Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V, J Biol Chem 271 (1996) 17561–17569.

O'Connell CB, Mooseker MS, Native Myosin-IXb is a plus-, not a minus-end-directed motor, Nat Cell Biol 5 (2003) 171–172.

Odronitz F, Kollmar M, Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species, Genome Biol 8 (2007) R196.

Patel KG, Liu C, Cameron PL, Cameron RS, Myr 8, a novel unconventional myosin expressed during brain development associates with the protein phosphatase catalytic subunits 1a and 1g1, J Neurosci 21 (2001) 7954–7968.

Pato MD, Adelstein RS, Dephosphorylation of the 20,000-dalton light chain of myosin by two different phosphatases from smooth muscle, J Biol Chem 255 (1980) 6535–6538.

Pearson MA, Reczek D, Bretscher A, Karplus PA, Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain, Cell 101 (2000) 259–270.

Perreault-Micale C, Shushan AD, Coluccio LM, Truncation of a Mammalian Myosin I Results in Loss of Ca²⁺-sensitive Motility, J Biol Chem 275 (2000) 21618.

Perry SV, Grand RJA, Mechanism of Contraction And The Specialized Protein Components Of Smooth Muscle, Br Med Bull 35 (1979) 219–226.

Pollard TD, Korn ED, Acanthamoeba myosin. I. Isolation from *Acanthamoeba castellanii* of an enzyme similar to muscle myosin, J Biol Chem 248 (1973) 4682–4690.

Post PL, Bokoch GM, Mooseker MS, Human myosin IXb is a mechanochemically active motor and a GAP for rho, J Cell Sci 111 (1998) 941–950.

Probst FJ, Fridell RA, Raphael Y, Saunders TL, Wang A, Liang Y, Morell RJ, Touchman JW, Lyons RH, Noben-Trauth K, Friedman TB, Camper SA, Correction of deafness in shaker-2 mice by an unconventional myosin in a BAC transgene, Science 280 (1998) 1444–1447.

Provance DW Jr, Wei M, Ipe V, Mercer JA, Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution, Proc Natl Acad Sci U S A 93 (1996) 14554–14558.

Rechsteiner M, Rogers SW, PEST sequences and regulation by proteolysis, Trends Biochem Sci 21 (1996) 267–71.

Redowicz MJ, Unconventional myosins in muscle, Eur J Cell Biol 86 (2007) 549–558.

Reichelt S, Knight AE, Hodge TP, Baluska F, Samaj J, Volkmann D, Kendrick-Jones J, Characterization of the unconventional myosin VIII in plant cells and its localization at the post-cytokinetic cell wall, Plant J 19 (1999) 555–567.

Reinhard J, Scheel AA, Diekmann D, Hall A, Ruppert C, Bähler M, A novel type of myosin implicated in signalling by rho family GTPases, *EMBO J* 14 (1995) 697–704.

Richards TA, Cavalier-Smith T, Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes, *Nature* 436 (2005) 1113–1118.

Rodriguez OC, Cheney RE, Human myosin-Vc is a novel class V myosin expressed in epithelial cells, *J Cell Sci* 115 (2002) 991–1004.

Rogers S, Wells R, Rechsteiner M, Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis, *Science* 234 (1986) 364–368.

Ruppert C, Godel J, Müller RT, Kroschewski R, Reinhard J, Bähler M, Localization of the rat myosin I molecules myr 1 and myr 2 and in vivo targeting of their tail domains, *J Cell Sci* 108 (1995) 3775–3786.

Salamon M, Millino C, Raffaello A, Mongillo M, Sandri C, Bean C, Negrisola E, Pallavicini A, Valle G, Zaccolo M, Schiaffino S, Lanfranchi G, Human MYO18B, a novel unconventional myosin heavy chain expressed in striated muscles moves into the myonuclei upon differentiation. *J Mol Biol* 326 (2003) 137–149.

Sellers JR, Spudich JA, Sheetz MP, Light chain phosphorylation regulates the movement of smooth muscle myosin on actin filaments, *J Cell Biol* 101 (1985) 1897–1902.

Sellers JR, Regulation of cytoplasmic and smooth muscle myosin, *Curr Opin Cell Biol* 3 (1991) 98–104.

Sellers JR, Myosins: a diverse superfamily, *Biochim Biophys Acta* 1496 (2000) 3–22.

Simons M, Wang M, McBride OW, Kawamoto S, Yamakawa K, Gdula D, Adelstein RS, Weir L, Human nonmuscle myosin heavy chains are encoded by two genes located on different chromosomes, *Circ Res* 69 (1991) 530–539.

Scordilis SP, Adelstein RS, A comparative study of the myosin light chain kinases from myoblast and muscle sources. Studies on the kinases from proliferative rat myoblasts in culture, rat thigh muscle, and rabbit skeletal muscle, *J Biol Chem* 253 (1978) 9041–9048.

Solc CK, Derfler BH, Duyk GM, Corey DP, PCR screen of a Bull-frog inner ear library reveals a novel class of myosins (class X), *Audit Neurosci* 1 (1994) 63–75.

Schott D, Ho J, Pruyne D, Bretscher A, The COOHterminal domain of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting, *J Cell Biol* 147 (1999) 791–807.

Titus MA, A class VII unconventional myosin is required for phagocytosis, *Curr Biol* 9 (1999) 1297–1303.

Titus MA, A conserved role for myosin VII in adhesion, *Novartis Found Symp* 269 (2005) 16-24; discussion 24-34, 223–230.

Tominaga M, Kojima H, Yokota E, Orii H, Nakamori R, Katayama E, Anson M, Shimmen T, Oiwa K, Higher plant myosin XI moves processively on actin with 35 nm steps at high velocity, *The EMBO Journal* 22 (2003) 1263–1272.

Thompson RF, Langford GM, Myosin superfamily evolutionary history, *Anat Rec* 268 (2002) 276–289.

Trybus KM, Assembly of cytoplasmic and smooth muscle myosins, *Curr Opin Cell Biol* 3 (1991) 105–111.

Trybus KM, Waller GS, Chatman TA, Coupling of ATPase activity and motility in smooth muscle myosin is mediated by the regulatory light chain, *J Cell Biol* 124 (1994) 963–969.

Trybus KM, Regulation of expressed truncated smooth muscle myosins. Role of the essential light chain and tail length, *J Biol Chem* 269 (1994) 20819–20822.

Tuxworth RI, Weber I, Wessels D, Addicks GC, Soll DR, Gerisch G, Titus MA, A role for myosin VII in dynamic cell adhesion, *Curr Biol* 11 (2001) 318–329.

Veigel C, Wang F, Bartoo ML, Sellers JR, Molloy JE, The gated gait of the processive molecular motor, myosin V, *Nat Cell Biol* 4 (2002) 59–65.

Vilfand A, Elastic Lever-Arm Model for Myosin V, *Biophys J* 88 (2005) 3792–3805.

Vugrek O, Sawitzky H, Menzel D, Class XIII myosins from the green alga *Acetabularia*: driving force in organelle transport and tip growth?, *J Muscle Res Cell Motil* 24 (2003) 87–97.

Wang A, Liang Y, Fridell RA, Probst FJ, Wilcox ER, Touchman JW, Morton CC, Morell RJ, Noben-Trauth K, Camper SA, Friedman TB, Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3, *Science* 280 (1998) 1447–1451.

Warner CL, Stewart A, Luzio JP, Steel KP, Libby RT, Kendrick-Jones J, Buss F, Loss of myosin VI reduces secretion and the size of the Golgi in fibroblasts from Snell's waltzer mice, *EMBO J* 22 (2003) 569–579.

Wells AL, Lin AW, Chen LQ, Safer D, Cain SM, Hasson T, Carragher BO, Milligan RA, Sweeney HL, Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards, *Nature* 401 (1999) 505–508.

Wirth JA, Bement WB, Schwartz MF, Cheney RC, Mooseker MS. Identification of a ninth class of myosins expressed in human leukocytes, liver and other tissues. *Mol. Biol. Cell* 4 (1993) (Supplement) 42a. Abstr.

Wirth JA, Jensen KA, Post PL, Bement WM, Mooseker MS, Human myosin-IXb, an unconventional myosin with a chimerin-like rho/rac GTPase-activating protein domain in its tail, *J Cell Sci* 109 (1996) 653–661.

Wu X, Bowers B, Rao K, Wei Q, Hammer JA III, Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function in vivo, *J Cell Biol* 143 (1998) 1–20.

Yang Y, Kovács M, Xu Q, Anderson JB, Sellers JR, Myosin VIIB from *Drosophila* is a high duty ratio motor, *J Biol Chem* 280 (2005) 32061–32068.

Yokota E, Shimmen T, Isolation and chracterization of plant myosin from lily pollen tubes of lily, *Protoplasma* 177 (1994) 153–162

Yokota E, Yukawa C, Muto S, Sonobe S, Shimmen T, Biochemical and Immunocytochemical Characterization of Two Types of Myosins in Cultured Tobacco Bright Yellow-2 Cells, *Plant Physiol.* 121 (1999) 525–534.

Yoshimura M, Homma K, Saito J, Inoue A, Ikebe R, Ikebe M, Dual regulation of mammalian myosin VI motor function, *J Biol Chem* 276 (2001) 39600–39607.

Yu C, Feng W, Wei Z, Miyanoiri Y, Wen W, Zhao Y, Zhang M, Myosin VI undergoes cargo-mediated dimerization, *Cell* 138 (2009) 537–548.

CAPÍTULO II

Precipitação de miosina IIA e IIB de rim por congelamento

Abstract

Actomyosin precipitation is a critical step in the purification of myosins. In this work, the objective was to precipitate rat kidney actomyosin by freezing and thawing of the soluble fraction and isolate myosin. Kidney was homogenized in imidazole buffer, centrifuged at 45,000g for 30 min and the supernatant was frozen at -20 °C for 48 hours. The supernatant was thawed at 4°C, centrifuged at 45,000g for 30 min and the precipitate washed twice with imidazole buffer pH 7.0 (with and without triton X-100, respectively). The resulting precipitate presented a polypeptide profile in SDS-PAGE characteristic of actomyosin and expressed Mg- and K/EDTA-ATPase activity. The actomyosin complex was solubilized with ATP and Mg and the main polypeptide, p200, was purified in a DEAE-Sepharose column. p200 was marked with anti-myosin II, co-sedimented with F-actin in the absence, but not in the presence, of ATP and was identified by MS/MS with a high Mascot score for myosin IIA. The analysis identified peptides exclusive of myosin IIB, but detected no peptides exclusive of myosin IIC.

Keywords: actomyosin, ATPase, kidney, myosin IIA, precipitation, rat.

Resumo

Precipitação de actomiosina é um passo crítico na purificação de miosinas. Neste trabalho, nosso objetivo foi precipitar actomiosina de rim de rato pelo congelamento e descongelamento de fração solúvel e isolar miosina. Os rins foram homogeneizados em solução tampão imidazol, centrifugada a 45.000g por 30 min e o sobrenadante foi congelado a -20 °C por pelo menos 48h. O sobrenadante foi descongelado a 4 °C, centrifugado a 45.000g por 30 min e o precipitado foi lavado duas vezes em tampão imidazol pH 7,5 (com ou sem triton X-100, respectivamente). O precipitado resultante apresentou um perfil característico ao de actomiosina e expressou alta atividade Mg e K/EDTA-ATPase. O complexo actomiosina foi solubilizado com ATP e Mg e o principal polipeptídeo, p200, foi purificado em coluna de DEAE-Sepharose. p200 foi marcado com anticorpo anti-miosina II, cosedimenta com F-actina na ausência, mas não na presença, de ATP e foi identificado por MS/MS com alto Mascot score para miosina IIA. A análise identificou polipeptídeos exclusivos de miosina IIB, mas não foi detectado nenhum polipeptídeo exclusivo de miosina IIC.

Palavras Chave: actomiosina, ATPase, rim, miosina IIA, precipitação, rato.

1. Introdução

Miosina II não muscular forma filamentos em baixa força iônica e compartilha várias propriedades biológicas com miosina II de músculo esquelético, cardíaco e músculo liso [1]. Elas são hexâmeros compostos por um par de cadeias pesadas de ~200 kDa e dois pares de cadeias leves, ~20 e ~17 kDa. A cadeia pesada consiste de uma região N-terminal globular (denominada cabeça) que liga actina e hidrolisa ATP e uma região C-terminal extensiva (denominada cauda) que é capaz de interagir com a cauda de outra cadeia pesada para formar uma estrutura rígida [2]. O domínio onde as cadeias leves se ligam está localizado entre o domínio cabeça e o domínio cauda. Miosina não muscular é amplamente expressa em células eucarióticas e está envolvida em vários processos celulares como citocinese [3,4], adesão celular [5] e transporte de vesículas [6].

Até o momento, três isoformas de cadeia pesada de miosina II não muscular foram identificadas em vertebrados, denominadas miosina IIA, IIB e IIC [7,8,9,10]. Embora muitas células expressem todas as isoformas de miosina II, algumas células, assim como plaquetas, expressam somente miosina IIA [11,12]. Em rim humano, o gene que codifica a cadeia pesada de miosina IIA é expresso em tecido fetal ou adulto [13] e mutações neste gene estão associadas com diferentes síndromes com ou sem associação com doenças renais [14,15,16,17,18]. Miosina IIA é expressa principalmente por células podocitárias e constitui o principal componente do aparato contrátil de actina-miosina nos “pés” dos podócitos [13].

A isoforma renal de miosina II ainda não foi bem caracterizada e a caracterização de isoformas de miosina II não muscular, em geral, é realizada com parte da proteína expressa em sistemas recombinantes [10,19,20,21] uma vez que não há um método efetivo para a purificação dessa proteína. Como a molécula nativa de miosina II, proteína completa, é difícil de ser feita em sistemas recombinantes, a purificação de miosina II nativa de rim poderá contribuir para uma melhor compreensão da estrutura/função relacionadas a esse motor molecular. A precipitação de actomiosina é um estágio comum em método de purificação. Miosina V de cérebro é precipitada seletivamente pelo tratamento de fração solúvel de cérebro com 600 mM de NaCl [22,23], enquanto que miosina II de cérebro é precipitada dialisando fração solúvel de cérebro contra solução tampão contendo baixa força iônica [24]. O congelamento de fração solúvel de cérebro [25], testículo e músculo [26] também causa a precipitação de actomiosina. Neste trabalho, nós isolamos miosina IIA partindo de actomiosina obtida pelo congelamento de fração solúvel de rim de rato.

2. Materiais e métodos

2.1. materiais

Anti-coelho IgG(Fc) conjugada com fosfatase alcalina gerado em cabra, nitro azul tetrazólio (NBT), 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP), Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), Ácido N,N,N',N'-tetraacético etileno glicol-bis (β -aminoetil éter) (EGTA), dodecil sulfato de sódio (SDS), ditiotretol (DTT), ácido trifluoracético (TFA), adenosina 5' trifosfato (ATP), bicarbonato de amônio

(NH_4HCO_3), ponceau, tampões, reagentes para eletroforese e inibidores de proteases foram adquiridos da Sigma Chemical Co. Tripsina foi adquirida da Promega. Membranas de nitrocelulose e resinas foram adquiridas da Pharmacia. Todas os reagentes eram de grau analítico e as soluções foram preparadas com água Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, MA).

2.2. Purificação de miosina de rim de rato

Actomiosina de rim foi obtida como descrito para actomiosina de testículos [26] e cérebro [25] com algumas modificações. Os rins foram homogeneizados (0,5g de rim/mL) em tampão de extração (Imidazol-HCl 50 mM pH 7,0, EGTA 10 mM, EDTA 10 mM, sacarose 250 mM, benzamidina 1,0 mM e DTT 1,0 mM) usando um homogeneizador portátil tipo “mixer”. O homogeneizado de rins foi centrifugado a 45.000g por 30 min e o sobrenadante (S1) foi recuperado e congelado a -20 °C por pelo menos 48 horas. A fração S1 foi descongelada a 4 °C e centrifugada a 45.000g por 30 min. A fração precipitada (P2) foi homogeneizada em tampão-I (imidazol 20 mM pH 8,5 EDTA e EGTA 0,1 mM, benzamidina 1 mM e DTT 1 mM) contendo triton X-100 a 0,1% (v/v) e centrifugada a 45.000g por 30 min. O precipitado (P3) foi homogeneizada em tampão-I e imediatamente centrifugada a 45.000g por 30 min. O precipitado (P4) foi homogeneizada em tampão-I contendo ATP e MgCl_2 10 mM usando um homogeneizador de vidro tipo *potter* e então centrifugada a 55.000g por 30 min. A fração solúvel foi usada para isolar miosina de rim. Soluções geladas foram usadas até esta fase, com as homogeneizações realizadas em banho de gelo e as centrifugações realizadas a 4 °C. A fração S5 foi aplicada em coluna DEAE-Sepharose (1,0 x 12 cm)

previamente equilibrada com tampão-I contendo ATP e MgCl_2 1,0 mM. A coluna foi eluída com tampão-I contendo 150 mM de NaCl e subsequentemente com gradiente de 150 a 300 mM de NaCl em tampão-I, e foram coletadas frações de 2,0 mL. O fluxo da coluna foi mantido a 0,5 mL/min e todo procedimento foi conduzido a 27 °C.

2.3. Ensaio de sedimentação com actina

O ensaio de co-sedimentação foi realizado em baixa velocidade de centrifugação, como descrito por Pollard e Cooper [27]. No ensaio, foram usados 220 µg do polipeptídeo de alto peso molecular do *pool* da coluna DEAE-Sepharose e/ou 170 µM de F-actina, purificada de músculo de coelho, foi adicionado e ensaiado na presença ou ausência de 1,0 mM de ATP. As reações foram incubadas em banho de gelo por 15 minutos, e então, centrifugadas a 15.000g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o precipitado foi homogeneizado em igual volume do sobrenadante em tampão imidazol 20 mM pH 7,0, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM e DTT 0,1 mM.

2.4. Ensaio para atividade ATPase

A atividade ATPase foi determinada pela medida do fosfato inorgânico liberado do ATP usando o método espectrofotométrico de Heinonen e Lahti [28]. A reação foi realizada a 37 °C e o volume final foi de 200 µL. A atividade Mg-ATPase foi ensaiada em tampão imidazol 25 mM pH 7,5, EDTA 1,0 mM, DTT 1,0 mM, KCl 60 mM, MgCl_2 2,0 mM e ATP 1,0 mM. A atividade K/EDTA-ATPase foi

ensaiada em tampão imidazol 25 mM pH 7,5, EDTA 1,0 mM, DTT 1,0 mM e ATP 1,0 mM, com 60 (controle) ou 600 mM de KCl. As reações foram iniciadas com a adição de ATP e interrompidas com a adição da solução de dosagem de P_i . Foi feito um branco para cada amostra com a adição de ATP após a solução de dosagem de P_i . As medidas foram feitas em duplicatas.

2.5. Digestão proteica e espectrometria de massa(MS).

As bandas dos polipeptídeos (p200, p18 e p15) foram recortadas do gel SDS e descoradas usando 50% de acetonitrila e 25 mM de NH_4HCO_3 por três a quatro vezes e lavadas por 10 min com 100% de acetonitrila. Os géis foram secos por 30 min usando o sistema: Speed Vac system (Savant, Farmingdale, NY). A redução das proteínas foi realizada com 10 mM de DTT a 56 °C por 1h acompanhada por alquilação com 55 mM de iodoacetamida em camara escura a 25 °C, e subsequentemente secadas com o sistema Speed Vac. Os peptídeos proteolizados por tripsina para cada banda foram obtidos usando a escala de sequenciamento modificado para tripsina (Promega, Madison, WI). A digestão foi realizada *overnight* a 37 °C e interrompida pela adição de 1 µL de TFA a 2%. Cada amostra foi preparada em uma placa AnchorChipTM (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) conforme o método modificado por Zhang et al. [29]. Um microlitro do sobrenadante das digestões do gel foi aplicado em um pocinho e deixado para secar completamente. Então um 1 µL de solução matriz recém preparada (0,5 mg/mL ácido α -ciano-4-hidroxicinnamico em 0,1% de TFA e 90% de acetonitrila) foi aplicado no mesmo pocinho e deixado secar. As amostras foram desalinizadas com gotas de 2 µL de 0,1% de TFA depositada sobre a

matriz. Após 10 s, a solução remanescente foi removida com uma pipeta. O espectro de massa foi obtido em um Autoflex II MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) da Universidade de Brasília (UnB) em extração retardada e modo de reflexão. Os espectros foram processados usando o FlexAnalysis 2.4 and BioTools 3.0 software tools (Bruker Daltonics). As massas dos peptídeos (MH^+) foram gravadas no intervalo de 700-3500 Da. A calibração interna foi feita usando o pico de íons conhecidos para autólise da tripsina (842,50 e 2211,09).

2.6. Identificação de proteínas.

A lista de picos foi usada para procura em banco de dados usando o BioTools 3.0 (Bruker Daltonics) conectado com Mascot (<http://www.matrixscience.com>) [30] contra o banco de dados de proteínas NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD). Massas monoisotópicas dos peptídeos tripticos foram usados para identificar as proteínas por Peptide Mass Fingerprinting (PMF). O erro de tolerância para a massa dos peptídeos foi menor que 100 ppm e nenhuma restrição foi imposta para a massa da proteína ou linhagem filogenética. As pesquisas que não apresentaram nenhum resultado foram então restringidas para “Rodentia”. Outros parâmetros de busca foram de uma clivagem perdida; oxidação da metionina, carbamidometilação da cisteína e acetilação N-terminal (proteína) com modificações variáveis. Os achados foram considerados significativos se os escores para a proteína excediam os valores de significância calculado pelo Mascot software assumindo o p -value <0,05.

2.7. Outros métodos

O perfil eletroforético dos polipeptídeos foi obtido por meio de SDS-PAGE realizados em minigéis 10% ou em gradiente 5-24% com o sistema de tampão descontínuo de Laemmli and Favre [31]. O *Western blot* foi realizado conforme descrito por Towbin et al [32]. A membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo policlonal específico para miosina II [33] diluído 1:2000. Ela foi então corada com ponceau e o padrão de massa molecular foi marcado por perfuração. O *Western blot* foi revelado usando imunoglobulina anti coelho conjugada com fosfatase alcalina (diluído 1:5000). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford [34], usando soroalbumina bovina como padrão.

3. Resultados e Discussão

O complexo actomiosina tem sido precipitado de frações solúveis de vários tecidos tanto sob baixa [24,35,36,37] como alta força iônica [22,23]. Precipitação de actomiosina constitui um passo crítico na purificação de algumas miosinas nativas [38]. Portanto, o desenvolvimento de métodos de precipitação de actomiosina é importante para a purificação e caracterização de miosinas nativas de diferentes tecidos. Nós temos mostrado que o congelamento de fração solúvel de cérebro [25], testículos e músculo [26] causa a precipitação de actomiosina. Miosina de testículos purificada a partir de actomiosina precipitada por congelamento expressa atividade Mg-ATPase estimulada por F-actina [26] mostrando que o congelamento da fração solúvel não causa a perda de sua atividade enzimática. O congelamento de fração citosólica de rim de rato também

causa a precipitação de um polipeptídeo com mobilidade similar a cadeia pesada de miosina II (Fig. 1). Embora esse polipeptídeo apareça fracamente visível na fração citosólica (S1), ele aparece como a principal banda na fração precipitada por congelamento (P2). O processo de congelamento também causa a precipitação de um polipeptídeo com mobilidade relativa similar a actina, mas a maioria dos polipeptídeos não foram precipitados após o congelamento dessa fração, permanecendo na fração S2. O tratamento da fração P2 com triton X-100 solubilizou muitos dos polipeptídeos contaminantes desta fração. Somente os polipeptídeos similares a miosina e actina, com exceção de três polipeptídeos de baixo peso molecular, aparecem na fração P4 (Fig. 1). Portanto, a fração P4 apresenta um perfil de polipeptídeos em SDS-PAGE corado com Commassie blue característico de actomiosina e este resultado sugere que o método de congelamento foi efetivo e específico para a precipitação de actomiosina de rim de rato. Geralmente o complexo actomiosina é solubilizado com ATP e Mg [22,23,24,38], então a fração P4 foi incubada com ATP/Mg. Os polipeptídeos similares a miosina e actina e os de baixo peso molecular foram solubilizados neste ensaio (Fig. 1) sugerindo que estes polipeptídeos estão relacionados com miosina e actina.

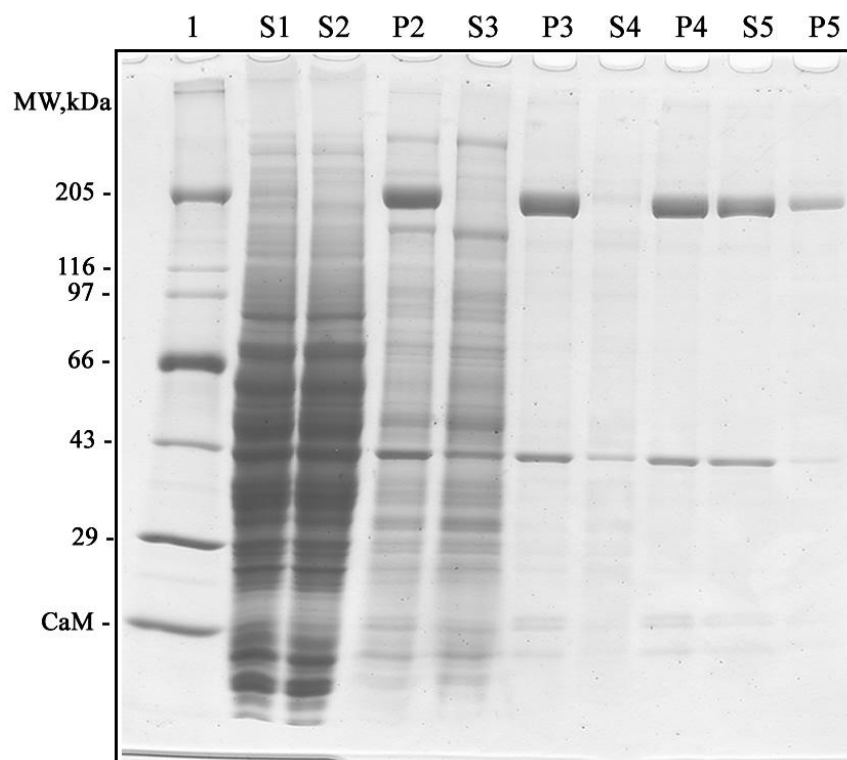


Fig. 1. SDS-PAGE da preparação de actomiosina de rim de rato. As amostras (1,0 μ L de S1, S2, 5 μ L de P2, P3, P4 e P5; 7,0 μ L de S3, S4 e S5) foram aplicadas em gel gradiente 5-22% e o gel foi corado com Commassie Blue R-250. Linha 1– marcadores de massa molecular: cadeia pesada de miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), actina (43 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). CaM: calmodulina (17,8 kDa).

Alguns experimentos foram conduzidos para verificar se o polipeptídeo de alto peso molecular realmente correspondia a miosina. Primeiro investigou-se se este polipeptídeo era imunologicamente relacionado à miosina II. A fração S1 e S5 e o *pool* da eluição com gradiente foram separadas em SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose e sondados usando anticorpo gerado contra cadeia pesada de miosina II de cérebro [33]. O anticorpo

reconheceu o polipeptídeo de alto peso molecular em ambas as frações S1, S5 e no pool (Fig. 2). Nota-se que, embora a fração S1 contenha vários polipeptídeos, somente aquele com mobilidade relativa similar a cadeia pesada de miosina (fracamente corado em SDS-PAGE) reage com o anticorpo.

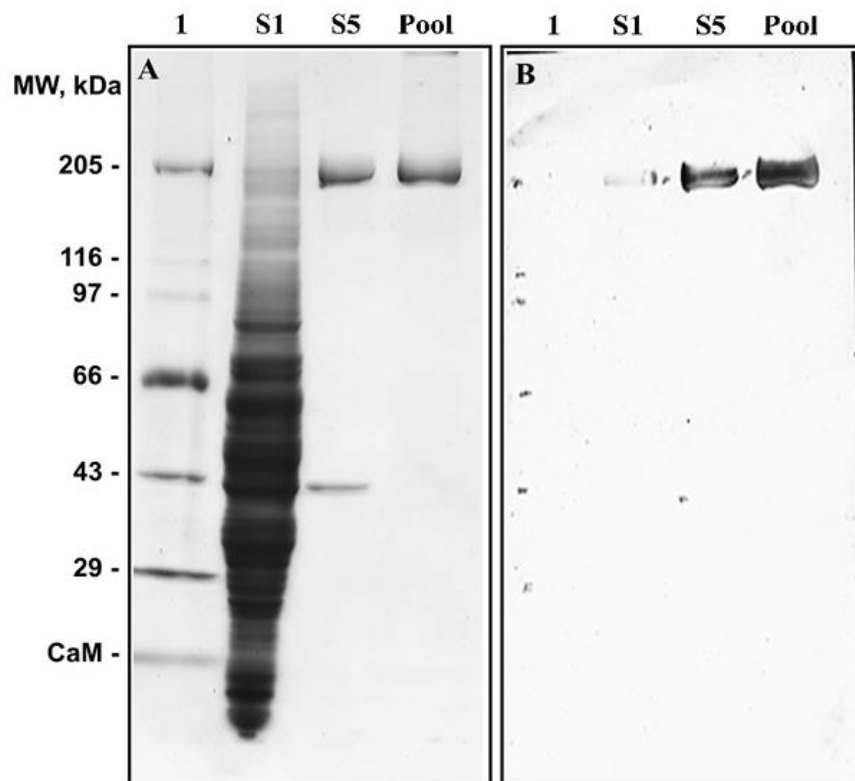


Fig. 2. p200 é imunologicamente relacionado com miosina II. O Western blot dos polipeptídeos das frações S1, S5 e pool DEAE-Sepharose (frações 18 a 24) foram separados em SDS-PAGE (A), transferidos para membrana de nitrocelulose e sondados com anti-miosina II (B). Linha 1— marcadores de massa molecular: cadeia pesada de miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), actina (43 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). CaM: calmodulina (17,8 kDa).

A atividade K/EDTA-ATPase (atividade na ausência de cátions divalentes e presença de alto sal) é uma característica de miosinas [39]. Embora a atividade

K/EDTA-ATPase seja uma condição não fisiológica, ela serve como um teste simples para a atividade relacionada com miosinas. A presença de atividade K/EDTA-ATPase, aproximadamente 100 nmol P_i /mg/min na fração P4 de rim de rato (Fig. 3), junto com o ensaio com anticorpo específico para miosina indica que o polipeptídeo de alto peso molecular desta fração corresponde a cadeia pesada de miosina. Tipicamente, a atividade Mg-ATPase de miosina isolada é muito baixa e é consideravelmente aumentada pela interação com actina [1]. Portanto, a presença de alta atividade Mg-ATPase, cerca de 150 nmol P_i /mg/min, observada na fração P4 de rim de rato (Fig. 3) sugere que o polipeptídeo de 43 kDa nesta fração é realmente actina e, ademais, que esta molécula está presente pelo menos parcialmente na forma de F-actina. Estes resultados mostram que, além de ser efetivo na precipitação de actomiosina de rim de rato, o método de congelamento preserva a atividade ATPase de miosina. A atividade ATPase para a fração S5 mostrou um branco extremamente alto (dado não mostrado) sugerindo que o ATP foi hidrolisado em ADP e P_i durante o processo de solubilização.

Buscando para separar a miosina de actina, a fração solubilizada com ATP/Mg foi aplicada em coluna DEAE-sepharose e eluída com NaCl 150 mM e, subsequentemente, com gradiente de 150 a 300 mM de NaCl. Miosina livre de actina foi recuperada com gradiente de 150 a 300 mM de NaCl (Fig. 4). Nota-se que dois polipeptídeos de baixo peso molecular co-purificam com miosina (p18 e p15). Estes polipeptídeos também co-purificaram com miosina de rim de rato quando a fração S5 foi aplicada em uma coluna gel de filtração Sephacryl-S400 (dado não mostrado) indicando que eles interagem com miosina. Nas frações eluídas com 150 mM de NaCl, somente um polipeptídeo de aproximadamente 70

kDa foi observado. Ele aparece fracamente corado em gel corado com Commassie blue (dado não mostrado). Esta fração apresenta alta absorbância a 260 nm e possui alta quantidade de fosfato quando dosado pelo método de Heinonen and Lahti (dado não mostrado). Possivelmente o ATP (e ADP) presente na fração S5 são os responsáveis pela alta absorbância a 260 nm e que o fosfato seja gerado pela hidrólise do ATP pela miosina. Em ensaio de ligação na

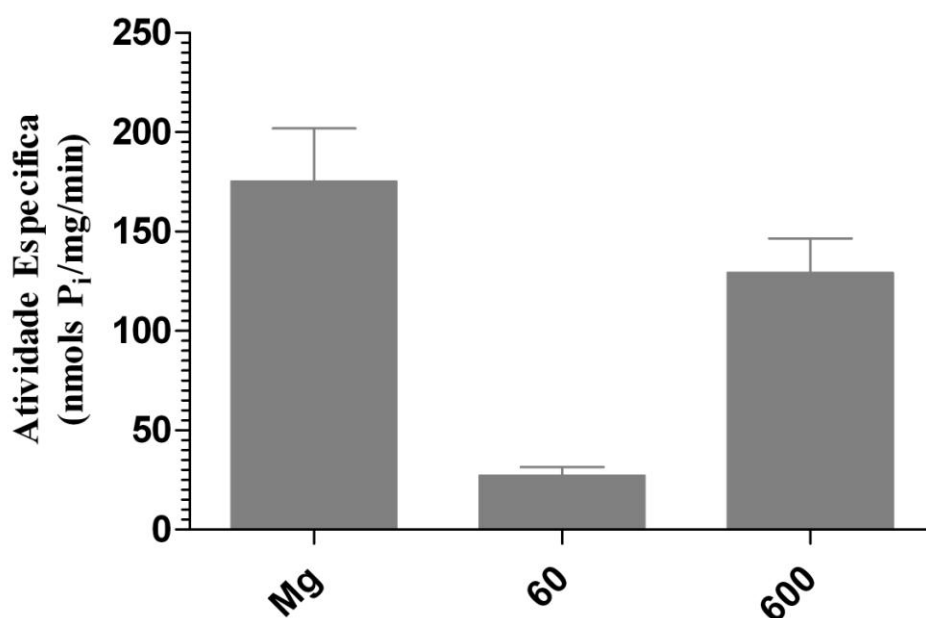


Fig. 3. Atividade Mg- e K/EDTA-ATPase da fração P4 de rim de rato. 25 μ g de P4 de rim de rato foram incubados por 20 min a 37 °C em meio de reação contendo imidazol 25 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, KCl 60 mM, $MgCl_2$ 2 mM e ATP 1 mM (atividade Mg-ATPase), ou em meio contendo imidazol 25 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, ATP 1 mM, KCl 60 ou 600 mM (atividade K/EDTA-ATPase). A reação foi iniciada com a adição de 1 mM de ATP e interrompida com a adição da solução de dosagem. Os resultados representam a média de quatro experimentos.

coluna, ambos ATP e P_i ficaram retidos e foram eluídos com 150 mM de NaCl, corroborando a afirmação prévia (Fig. 5). Nota-se que ambos ATP e P_i não foram eluídos com 300 mM de NaCl. Portanto, a eluição da coluna com 150 mM de NaCl antes do gradiente de 150 a 300 mM de NaCl é importante para remover ATP e P_i da preparação de miosina.

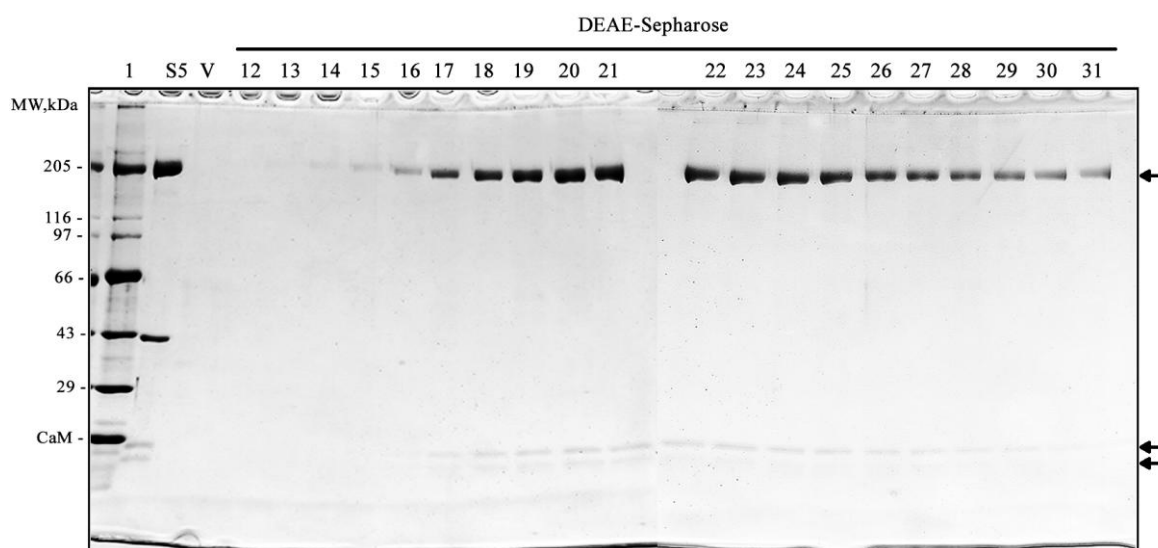


Fig. 4. Purificação de p200 em coluna de DEAE-sepharose. A fração S5 foi aplicada em coluna de DEAE-sepharose e, após eluição com 150 mM de NaCl, foi eluída com gradiente de NaCl de 150 a 300 mM e foram coletadas frações de 2 mL. 5,0 μ L de S5 e 20 μ L das frações foram separados em gel gradiente 5-22%. A figura mostra a eluição de p200 e os polipeptídeos de baixo peso molecular (p18 e p15), indicados pelas setas. O gel foi corado com Commassie Blue R-250. Linha 1– marcadores de massa molecular: cadeia pesada de miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), actina (43 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). CaM: calmodulina (17,8 kDa).

A miosina purificada de rim de rato (frações 18 a 24) foi usada em ensaio de co-sedimentação com F-actina. Similar a frações de miosinas de outros tecidos, miosina isolada de rim de rato co-sedimentou com F-actina quando o

ensaio foi realizado na ausência de ATP, mas não quando a incubação foi conduzida na presença de ATP (Fig. 6). Nota-se que nesse gel, os dois polipeptídeos de baixo peso molecular não foram separados e eles migram junto com a frente do gel.

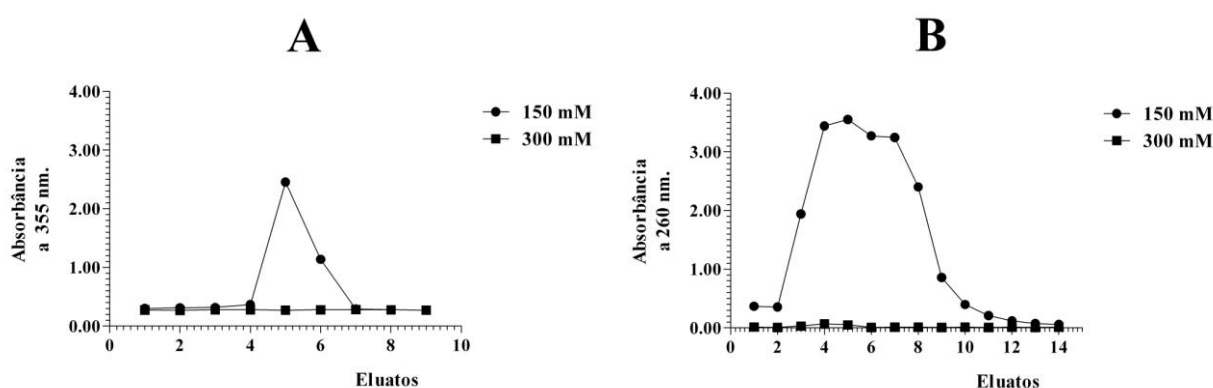


Fig. 5. Ligação e eluição de P_i e ATP de coluna de DEAE-sepharose. Tampão-I contendo ATP 8 mM, P_i 2 mM e $MgCl_2$ 10 mM (A), ou ATP 10 mM e $MgCl_2$ 10 mM (B) foi aplicado em coluna de DEAE-sepharose (sob as mesmas condições descritas em material e métodos) e eluído com tampão-I contendo 150 ou 300 mM de NaCl e foram coletadas frações de 2 mL. P_i foi dosado pelo método Heinonen e Lahti [28] e ATP foi quantificado a 260 nm.

Células de camundongo adultos parecem expressar as cadeias pesadas de miosina IIA, IIB e IIC [10]. Para confirmar que o polipeptídeo de alto peso molecular corresponde a cadeia pesada de miosina e identificar a isoforma de miosina precipitada durante o processo de congelamento, o *pool* da coluna DEAE-sepharose (frações 18 a 24) foi separado em gel SDS-PAGE e o polipeptídeo de alto peso molecular foi cortado e usado para digestão em gel

com tripsina e análise por MS/MS. O mesmo procedimento foi feito para os polipeptídeos de baixo peso molecular. O polipeptídeo de alto peso molecular foi identificado com alto Mascot score e com uma sequência de cobertura maior que 30% para miosina IIA (Tab. 1). Análise por MS/MS também mostrou a presença de miosina IIB (Tab. 1). Neste caso, o Mascot score foi aproximadamente três vezes menor e com uma sequência de cobertura de 22%, mas foram identificados peptídeos exclusivos para a isoforma IIB. Não foi detectado peptídeos exclusivos para a isoforma IIC. Um dos polipeptídeos de baixo peso molecular (p15) foi identificado como sendo cadeia leve de miosina, isoforma 3, (Tab. 1). O outro polipeptídeo de baixo peso molecular foi identificado também como sendo miosina IIA (p18). Possivelmente, este polipeptídeo resulte da degradação de miosina IIA por protease durante o processo de purificação.

Miosina IIA é expressa em rim e constitui o maior componente do aparato contrátil actina-miosina em podócitos e desenvolve importante função celular neste tecido [13]. Mutações no gene *myh9*, o qual codifica a cadeia pesada de miosina IIA, resulta em defeitos renais em humanos e não são compensados pela presença de miosina IIB e IIC [40]. Nossos resultados mostram que a isoforma de miosina IIA de citosol de rim foi precipitada pelo processo de congelamento. Embora miosina IIC também esteja presente em células renais [10], essa isoforma não foi detectada em miosina purificada (frações da DEAE-sepharose). O processo de congelamento não causa a perda de atividade K/EDTA-ATPase ou Mg-ATPase de miosina de rim de rato. Após a solubilização com ATP e Mg, ambas as atividades desapareceram. As condições de solubilização sugerem que algum processo de fosforilação de proteína esteja envolvido na inibição da atividade

ATPase. Se esta hipótese for verdadeira, o ensaio com fosfatase poderá restaurar a atividade ATPase para a miosina

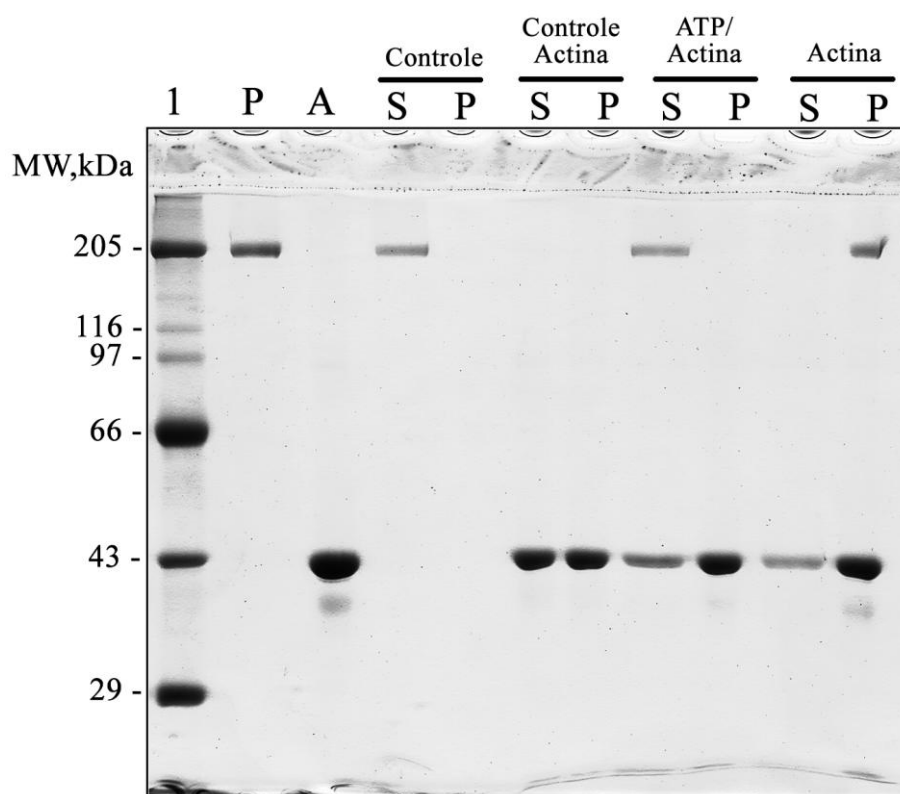


Fig. 6. p200 co-sedimenta com actina de modo ATP-sensível. Sedimentação com actina em baixa velocidade foi ensaiada conforme descrito em material e métodos e analisado em SDS-PAGE 10 %. **S** e **P** indicam, respectivamente, sobrenadante e precipitado em cada ensaio. Linha 2–*pool* da eluição da coluna de DEAE-sepharose com gradiente de sal; linha 3–F-actina de músculo de coelho; linha 4–p200 controle; linha 5–F-actina controle; linha 6–F-actina mais p200 na presença de 1 mM de ATP; linha 7–F-actina mais p200 na ausência de ATP. Linha 1– marcadores de massa molecular: cadeia pesada de miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), actina (43 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). CaM: calmodulina (17,8 kDa).

purificada. Neste trabalho, nos purificamos miosina de rim de rato usando actomiosina precipitada por congelamento e a miosina purificada foi identificada como sendo as isoformas IIA e IIB. Este trabalho constitui a primeira purificação de uma isoforma nativa de miosina de rim de rato.

Tabela I. Bandas de proteínas analisadas por MALDI-TOF MS e Identificadas por procura no NCBI Nonredundant Protein Database Usando Mascot.

Bandas	Identificação Proteica	Organismo/ Proteína ID	Cobertura (%)/ Mascot Score	Número de Pepitídeos Pareados	pI (teor.)/Mr (teor.) kDa
p200	Miosina, cadeia pesada polipeptídeo 9, não muscular. Miosina-IIA.	<i>Rattus norvegicus</i> / gi 149066032	33/205	59	5,54/226,273
	Miosina, cadeia pesada polipeptídeo 10, não muscular. Miosina-IIB.	<i>Rattus norvegicus</i> / gi 13928704	22/74	37	5,49/ 228,824
p18	Miosina, cadeia pesada polipeptídeo 9, não muscular. Miosina-IIA	<i>Rattus norvegicus</i> / gi 149066032	22/84	38	5,54/226,273
p15	Proteína Myl6. Cadeia leve essencial, isoforma 3.	<i>Rattus norvegicus</i> / gi 183986294	55/94	11	4,56/17,002

4. Conclusão

Actomiosina foi precipitada por congelamento de citosol de rim de rato e o complexo actomiosina expressou atividade Mg- e K/EDTA-ATPase. Miosina II foi isolada a partir do complexo actomiosina e identificada por MS/MS como isoforma de miosina IIA. Isoforma IIB também estava presente, mas a isoforma de miosina IIC não foi detectada na fração de miosina purificada. Este método pode ser

importante para ajudar numa melhor compreensão da estrutura/função relacionada a isoforma de miosina IIA de rim de rato.

Referências

- [1] J.R. Sellers, *Myosins*, Second ed., Oxford University Press, Oxford, 1999.
- [2] J.R. Sellers, *Biochim. Biophys. Acta.* 1496 (2000) 3–22.
- [3] D.N. Robinson, J.A. Spudich, Mechanics and regulation of cytokinesis, *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 (2004) 182–188.
- [4] F. Matsumura, Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes, *Trends Cell Biol.* 15 (2005) 371–377.
- [5] A. Müsch, D. Cohen, E. Rodriguez-Boulán, Myosin II is involved in the production of constitutive transport vesicles from the TGN, *J. Cell Biol.* 138 (1997) 291–306.
- [6] T. Togo, R.A. Steinhardt, Nonmuscle myosin IIA and IIB have distinct functions in the exocytosis-dependent process of cell membrane repair, *Mol. Biol. Cell.* 15 (2004) 688–695.

- [7] Y. Katsuragawa, M. Yanagisawa, A. Inoue, T. Masaki, Two distinct nonmuscle myosin-heavy-chain mRNAs are differentially expressed in various chicken tissues. Identification of a novel gene family of vertebrate non-sarcomeric myosin heavy chains, *Eur. J. Biochem.* 84 (1989) 611–616.
- [8] R.V. Shohet, M.A. Conti, S. Kawamoto, Y.A. Preston, D.A. Brill, R.S. Adelstein, Cloning of the cDNA encoding the myosin heavy chain of a vertebrate cellular myosin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 (1989) 7726–7730.
- [9] M. Takahashi, S. Kawamoto, R.S. Adelstein, Evidence for inserted sequences in the head region of nonmuscle myosin specific to the nervous system. Cloning of the cDNA encoding the myosin heavy chain-B isoform of vertebrate nonmuscle myosin, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 17864–17871.
- [10] E. Golomb, X. Ma, S.S. Jana, Y.A. Preston, S. Kawamoto, N.G. Shoham, E. Goldin, M.A. Conti, J.R. Sellers, R.S. Adelstein, Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 2800–2808.
- [11] P. Maupin, C.L. Phillips, R.S. Adelstein, T.D. Pollard, Differential localization of myosin-II isozymes in human cultured cells and blood cells, *J. Cell. Sci.* 107 (1994) 3077–3090.
- [12] A. Toren, G. Rozenfeld-Granot, B. Rocca, C. Epstein, N. Amariglio, F. Laghi, R. Landolfi, F. Brok-Simoni, L. Carlsson, G. Rechavi, A. Greinacher,

Autosomal dominant giant platelet syndromes: A hint of the same genetic defect as in Fechtner syndrome owing to a similar linkage to chromosome 22q11–13, *Blood* 96 (2000) 3447–3451.

[13] C. Arrondel, N. Vodovar, B. Knebelmann, J.P. Grünfeld, M.C. Gubler, C. Antignac, L. Heidet, Expression of the nonmuscle myosin heavy chain IIA in the human kidney and screening for MYH9 mutations in Epstein and Fechtner syndromes, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13 (2002) 65–74.

[14] M. Seri, R. Cusano, S. Gangarossa, G. Caridi, D. Bordo, C. Lo Nigro, G.M. Ghiggeri, R. Ravazzolo, M. Savino, M. Del Vecchio, M. d'Apolito, A. Iolascon, L.L. Zelante, A. Savoia, C.L. Balduini, P. Noris, U. Magrini, S. Belletti, K.E. Heath, M. Babcock, M.J. Glucksman, E. Aliprandis, N. Bizzaro, R.J. Desnick, J.A. Martignetti, Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium, *Nat. Genet.* 26 (2000) 103–105.

[15] M.J. Kelley, W. Jawien, T.L. Ortel, J.F. Korczak, Mutation of MYH9, encoding non-muscle myosin heavy chain A, in May-Hegglin anomaly, *Nat. Genet.* 26 (2000) 106–108.

[16] S. Kunishima, T. Matsushita, T. Kojima, N. Amemiya, Y.M. Choi, N. Hosaka, M. Inoue, Y. Jung, S. Mamiya, K. Matsumoto, Y. Miyajima, G. Zhang, C. Ruan, K. Saito, K.S. Song, H.J. Yoon, T. Kamiya, H. Saito, Identification of six novel MYH9 mutations and genotype-phenotype relationships in autosomal

dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions, *J. Hum. Genet.* 46 (2001) 722–729.

- [17] S. Kunishima, M. Hamaguchi, H. Saito, Differential expression of wild-type and mutant NMMHC-IIA polypeptides in blood cells suggests cell-specific regulation mechanisms in MYH9 disorders, *Blood* 111 (2008) 3015–3023.
- [18] B.I. Freedman, P.J. Hicks, M.A. Bostrom, M.E. Cunningham, Y. Liu, J. Divers, J.B. Kopp, C.A. Winkler, G.W. Nelson, C.D. Langefeld, D.W. Bowden, Polymorphisms in the non-muscle myosin heavy chain 9 gene (MYH9) are strongly associated with end-stage renal disease historically attributed to hypertension in African Americans, *Kidney Int.* 75 (2009) 736–45.
- [19] M.D. Pato, J.R. Sellers, Y.A. Preston, E.V. Harvey, R.S. Adelstein, Baculovirus Expression of Chicken Nonmuscle Heavy Meromyosin II-B, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 2689–2695.
- [20] M. Kovács, F. Wang, A. Hu, Y. Zhang, J.R. Sellers, Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 38132–38140.
- [21] F. Wang, M. Kovács, A. Hu, J. Limouze, E.V. Harvey, J.R. Sellers, Kinetic Mechanism of Non-muscle Myosin IIB: Functional Adaptations for Tension Generation and Maintenance, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 27439–27448.

- [22] M.V. Coelho, R.E. Larson, Ca(2+)-dependent phosphorylation of the tail domain of myosin-V, a calmodulin-binding myosin in vertebrate brain, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26 (1993) 465–472.
- [23] R.E. Cheney, M.K. O'Shea, J.E. Heuser, M.V. Coelho, J.S. Wolenski, E.M. Espreafico, P. Forscher, R.E. Larson, M.S. Mooseker, Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity, *Cell* 75 (1993) 13–23.
- [24] F.S. Espindola, E.M. Espreafico, M.V. Coelho, A.R. Martins, F.R. Costa, M.S. Mooseker, R.E. Larson, Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: a novel calmodulin-binding myosin, *J. Cell Biol.* 118 (1992) 359–368.
- [25] H.C.S. Melo, M.V. Coelho, A new method to precipitate myosin V from rat brain soluble fraction, *Acta Biochim. Pol.* 54 (2007) 575–581.
- [26] D.dos S. Dias, M.V. Coelho, Purification and partial characterization of myosin II from rat testis, *Int. J. Biol. Macromol.* 41 (2007) 475–480.
- [27] T.D. Pollard, J.A. Cooper, Methods to characterize actin filament networks, *Methods Enzymol.* 85 (1982) 211–233.
- [28] J.K. Heinonen, R.J. Lahti, A New and Convenient Colorimetric Determination of Inorganic Orthophosphate and Its Application to the Assay of Inorganic Pyrophosphatase, *Anal. Biochem.* 113 (1981) 313–317.

- [29] X. Zhang, L. Shi, S. Shu, Y. Wang, K. Zhao, N. Xu, S. Liu, P. Roepstorff, An improved method of sample preparation on AnchorChip targets for MALDI-MS and MS/MS and its application in the liver proteome project, *Proteomics* 7 (2007) 2340–2349.
- [30] D.N. Perkins, D.J. Pappin, D.M. Creasy, J.S. Cottrell, Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data, *Electrophoresis* 20 (1999) 3551–3567.
- [31] U.K. Laemmli, M. Favre, Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events, *J. Mol. Biol.* 80 (1973) 575–599.
- [32] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 (1979) 4350–4354.
- [33] R.E. Larson, F.S. Espindola, E.M. Espreafico, Calmodulin-regulated enzyme activities associated with brain actomyosin, *J. Neurochem.* 54 (1990) 1288–1294.
- [34] M.M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.

- [35] J.M. Scholey, R.C. Smith, D. Drenckhahn, U. Groschel-Stewart, J. Kendrick-Jones, Thymus myosin. Isolation and characterization of myosin from calf thymus and thymic lymphocytes, and studies on the effect of phosphorylation of its Mr = 20,000 light chain, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 7737–7745.
- [36] B. Barylko, P. Tooth, J. Kendrick-Jones, Proteolytic fragmentation of brain myosin and localization of the heavy-chain phosphorylation site, *Eur. J. Biochem.* 158 (1986) 271–282.
- [37] B. Barylko, M.C. Wagner, O. Reizes, J.P. Albanesi, Purification and Characterization of a Mammalian Myosin I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 (1992) 490–494.
- [38] R.E. Cheney, Purification and assay of myosin V, *Methods Enzymol.* 298 (1998) 3–18.
- [39] H.M. Warrick, J.A. Spudich, Myosin structure and function in cell motility, *Annu. Rev. Cell Biol.* 3 (1987) 379–421.
- [40] K.E. Heath, A. Campos-Barros, A. Toren, G. Rozenfeld-Granot, L.E. Carlsson, J. Savige, J.C. Denison, M.C. Gregory, J.G. White, D.F. Barker, A. Greinacher, C.J. Epstein, M.J. Glucksman, J.A. Martignetti, Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes, *Am. J. Hum. Genet.* 69 (2001) 1033–45.

ANEXOS

Anexo-I. Fluxograma da purificação de miosina de rim de rato.

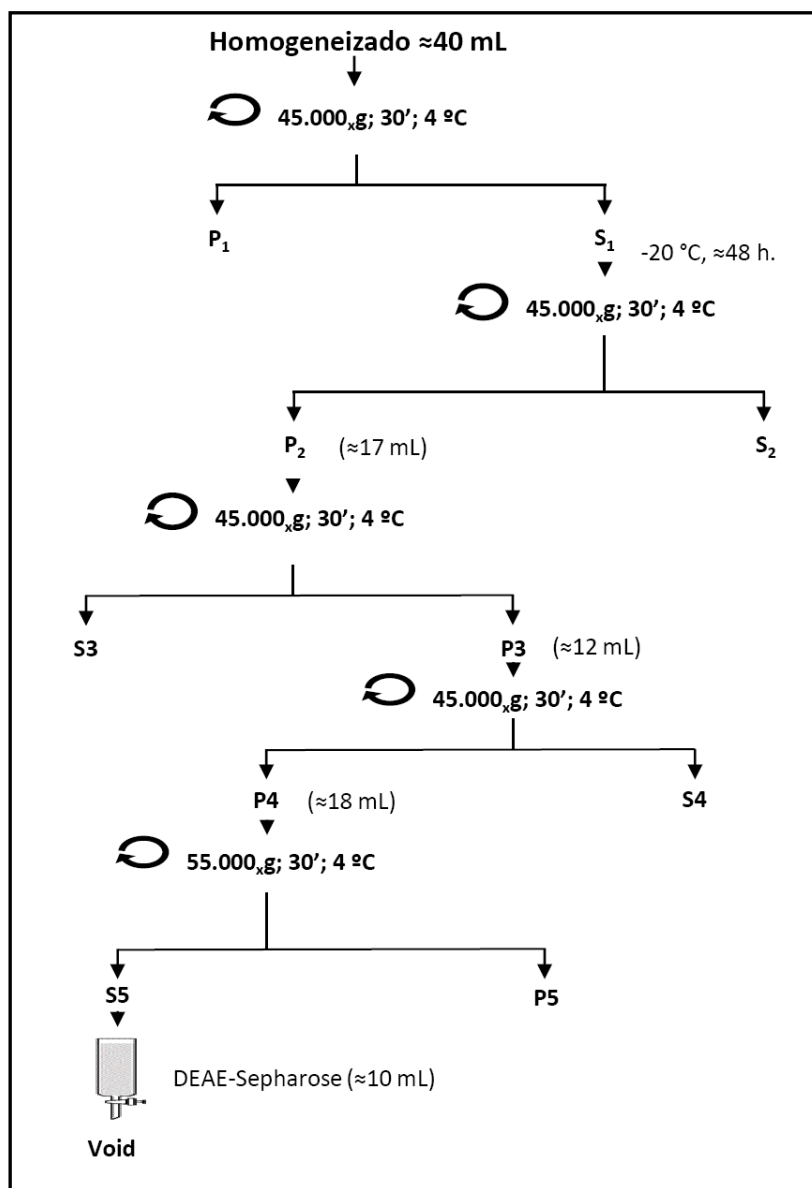


Fig. 1. Fluxograma da purificação de miosina II de rim de rato. Para uma preparação foi usado cerca de 20g de rim de rato. Os órgãos foram extraídos e mantidos em solução de KCl 150 mM em banho de gelo até o término da extração. Após a homogeneização em tampão de extração usando homogeneizador portátil tipo “mixer”, o homogeneizado foi centrifugado e a fração sobrenadante foi então congelada por no mínimo 48 horas a -20 °C.

Anexo-II. Purificação da atividade K/EDTA-ATPase de miosina de rim de rato.

Tabela-II. Purificação da atividade K/EDTA-ATPase para miosina de rim de rato

<i>Frações</i>	<i>Volume total (mL)</i>	<i>Concentração protéica (mg/mL)</i>	<i>Proteína total (mg)</i>	<i>Atividade total (nmolsP/min.)</i>	<i>Atividade específica (nmolsP/mg/min.)</i>	<i>Rendimento (%)</i>	<i>Purificação (x)</i>
S1	41	14,919	611,683	1775,164	2,902	100	1
S2	38	14,823	563,276	942,302	1,673	92,086	0,576
P2	17	3,564	60,581	1348,081	22,252	9,904	7,668
S3	16	2,493	39,887	52,576	1,318	6,521	0,454
P3	12	1,266	15,194	1240,234	81,625	2,484	28,126
S4	11	0,542	5,963	97,767	16,397	0,975	5,650
P4	18	0,558	10,051	1246,739	124,045	1,643	42,743

20 µL (de S1 a P3) ou 25 µL (de S4 e P4) foram incubados por 20 min a 37 °C em meio de reação contendo imidazol 25 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, ATP 1 mM, KCl 60 ou 600 mM. A reação foi iniciada com a adição de 1 mM de ATP e interrompida com a adição da solução de dosagem. Os resultados representam a média das diferenças entre 600 e 60 mM de KCl para três experimentos.

A tabela II mostra o rendimento e o grau de purificação relativo a atividade não fisiológica característica de miosinas: K/EDTA-ATPase. Observamos que até a fração precipitada P4, obtivemos um rendimento de 1,5 % com um grau de purificação para a atividade K/EDTA-ATPase de aproximadamente 42 vezes.

Anexo-III. Efeito de inibidores na atividade Mg-ATPase de miosina de rim de rato.

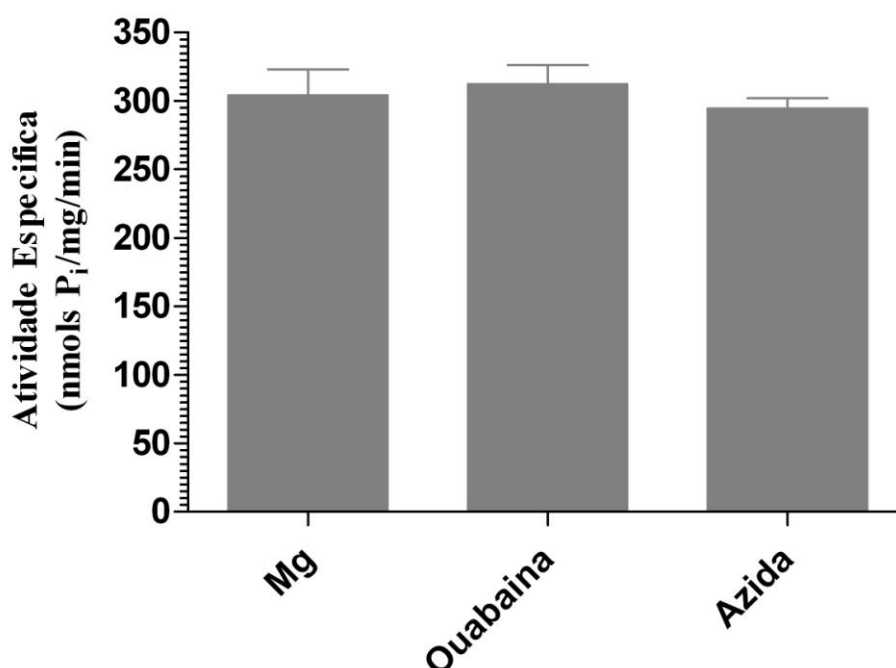


Fig. 2. Efeito de inibidores na atividade Mg-ATPase da fração P4 de rim de rato. Cerca de 15 μ g de P4 de rim de rato foram incubados por 10 min a 37 °C em meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, KCl 60 mM, $MgCl_2$ 2 mM e ATP 1 mM, contendo ouabaína ou azida 1 mM. A reação foi iniciada com a adição de 1 mM de ATP e interrompida com a adição da solução de dosagem de P_i . Os resultados representam a média de três experimentos.

A Figura 2 mostra o efeito de inibidor específico para Na/K-ATPase (ouabaina) e um inibidor da F_1F_0 -ATP sintase (azida)., Notamos que não houve inibição da atividade Mg-ATPase da fração P4, quando esta foi incubada com aqueles inibidores. Mostrando que a atividade Mg-ATPase presente na fração P4 possa ser relativa a miosina e que parte da actina presente nesta fração encontra-se na forma filamentar (F-actina).

Anexo-IV. Espectros gerados para os polipeptídeos p200, p18 e p15

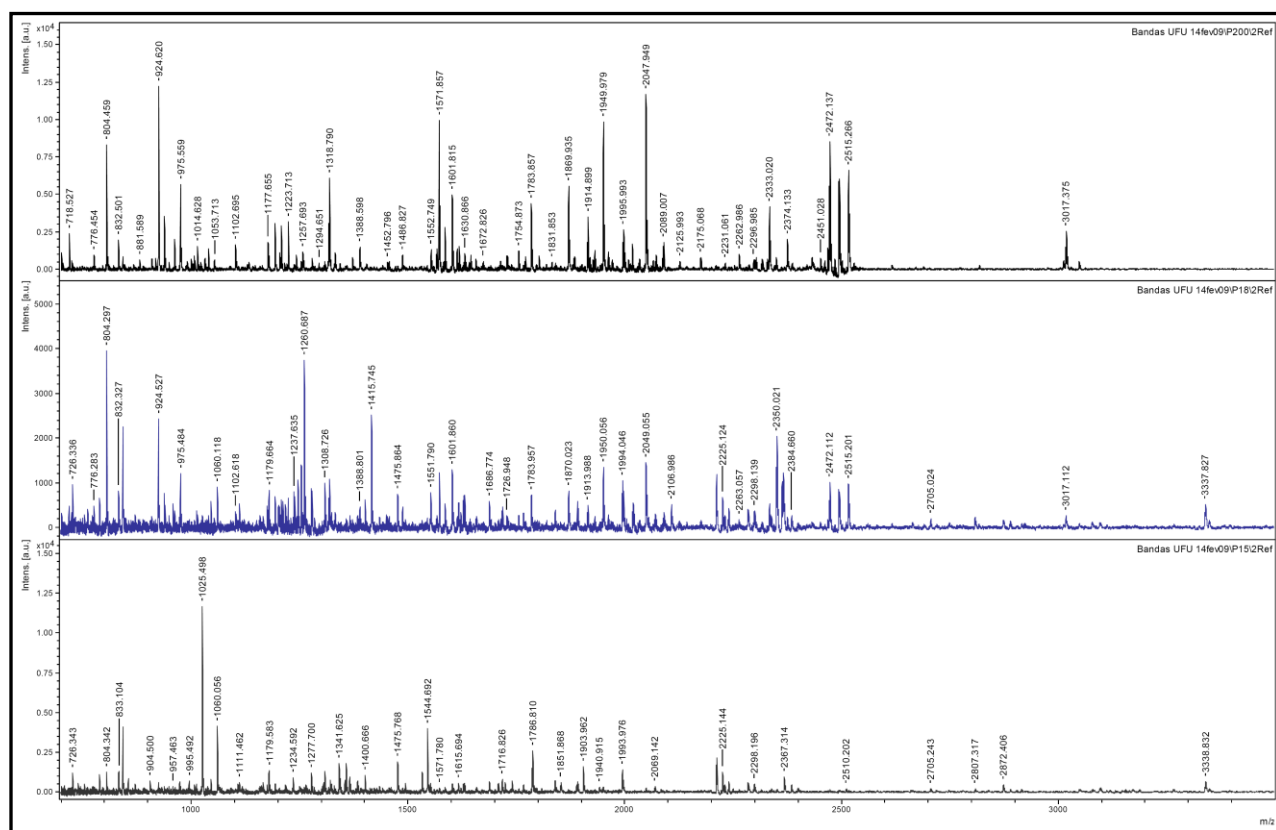


Fig. 3. Espectros gerados para p200, p18 e p15 de rim de rato. Os peptídeos purificados em coluna DEAE-Sepharose foram separados em SDS-PAGE, digeridos com tripsina e submetidos a espectrometria de massa usando MALDI-TOF MS. A partir do espectro gerado as massas dos peptídeos foram submetidas a procura no banco de dados do NCBI.

Anexo-V. Peptídeos derivados de p200 que foram pareados para miosina IIA.

1	MAQQAADKYL	YVDKNFINNP	LAQADWAAK	LVWVPSTKNG	FEPASLKEEV
51	GEEAIVELVE	NGKKVKVNKD	DIQKMNP ~~PKF~~	SKVEDMAELT	CLNEASVLHN
101	LKERYYSGLI	YTYSGLFCVV	INPYKNLPIY	SEEIVDMYKG	KKRHEMPPHI
151	YAITDTAYRS	MMQDREDQSI	LCTGESGAGK	TENTKKVIQY	LAHVASSHKS
201	KKDQGELERQ	LLQANPILEA	FGNAKTVKND	NSSRFGKFIR	INFDVNGYIV
251	GANIETYLLE	KSRAIRQAKE	ERTFHIFYYL	LSGAGEHLKT	DLLLEPYNKY
301	RFLSNGHVTI	PGQQDKDMFQ	ETMEAMRIMG	IPEDeqMGLL	RVISGVLQLG
351	NIVFKKERNT	DQASMPDNTA	AQKVSHLLGI	NVTDFTRGIL	TPRIKVGGRDY
401	VQKAQTKEQA	DFAIEALAKA	TYERMFRWL	LRINKALDKT	KRQGASFIGI
451	LDIAGFEIFD	LNSFEQLCIN	YTNEKLQQLF	NHTMFILEQE	EYQREGIEWN
501	FIDFGLDLQP	CIDLIEKPAG	PPGILALLDE	ECWFPKATDK	SFVEKVVQEQ
551	GTHPKFQKPK	QLKDKADFCI	IHYAGKVDYK	ADEWLMKNMD	PLNDNIATLL
601	HQSSDKFVSE	LWKDVDRIIG	LDQVAGMSET	ALPGAFKTRK	GMFRTVGQLY
651	KEQLAKLMAT	LRNTNPNFVR	CIIPNHEKKA	GKLDPHLVLD	QLRCNGVLEG
701	IRICRQGFPN	RVVFQEFRQR	YEILTPNSIP	KGFMDGKQAC	VLMIKALELD
751	SNLYRIGQSK	VFFRAGVLAH	LEERDLKIT	DVIIGFQACC	RGYLARKAFA
801	KRQQQLTAMK	VLQRNCAAYL	RLRNWQWWRL	FTKVKPLLS	IRHEDELLAK
851	EAELTKVREK	HLAAENRLTE	METMQSQLMA	EKLQLEQLQ	AETELCAEAE
901	ELRARLTAKK	QELEEICHDL	EARVEEEER	CQYLQAEKKK	MQQNIQEELE
951	QLEEEESARQ	KLQLEKVTTE	AKLKKLEEDQ	IIMEDQNCKL	AKEKKLLEDR
1001	VAEFTTNLME	EEEKSKSLAK	LKNKHEAMIT	DLEERLRREE	KQRQELEKTR
1051	RKLEGDSTD	SDQIAELQAA	IAELKMQLAK	KEEELQAALA	RVEEEAAQKN
1101	MALKKIRELE	TQISELQEDL	ESERACRNKA	EKQKRDLGEE	LEALKTELED
1151	TLDSTAAQQE	LRSKREQEVS	ILKKTLEDEA	KTHEAQIQEM	RQKHSQAVEE
1201	LAEQLEQTKR	VKATLEKAKQ	TLENERGELA	NEVKALLQ GK	GDSEHKRKKV
1251	EAQLQELQVK	FSEGERVRTE	LADKVS KLQV	ELDSVTGLLN	QSDSKSSKLT
1301	KDFSALSQL	QDTQELLQEE	NRQKLSLSTK	LKQMEDEKNS	FREQLEEEEEE
1351	AKRNLEKQIA	TLHAQVTD MK	KKMEDGVGCL	ETAEAKRRL	QKDLEGLSQR
1401	LEEKVAAYDK	LEKTKTRLQQ	ELDDLVLVDL	HQRQSVSNLE	KKQKKFDQLL
1451	AEEKTISAKY	AEERDRAEAE	AREKETKALS	LARALEEAME	QKAELERLNK
1501	QFRTEMEDLM	SSKDDVGKSV	HELEKSKRAL	EQQVEEMKTQ	LEELEDELQA
1551	TEDAKLRLEV	NLQAMKAQFE	RDLQGRDEQS	EEKKKQLVRQ	VREMEAELED
1601	ERKQRSIAMA	ARKKLEMDLK	DLEAHIDTAN	KNREEAIKQL	RKLQAQMKDC
1651	MRELDLTRAS	REEILAQAKE	NEKKLKSMEA	EMIQLQEELA	AAERAKRQAQ
1701	QERDELADEI	ANSSGKGALA	LEEKRRLEAR	IAQLEEEEEE	EQGNTELIND
1751	RLKKANLQID	QINTDLNLER	SHAQKNENAR	QQLERQNKEL	KAKLQEMESA
1801	VKSKYKASIA	ALEAKIAQLE	EQLDNETKER	QAASKQVRRR	EKKLKDVLLQ
1851	VEDERRNAEQ	FKDQADKAST	RLKQLKRQLE	EAEQEAQRAN	ASRRKLQREL
1901	EDATETADAM	NREVSSLKNK	LRRGDMFPVV	TRRIVRKG TG	DCSDEEVDGK
1951	ADGADAKAAE				

Fig. 4. Peptídeos pareados para miosina IIA. Os peptídeos gerados por digestão com tripsina foram submetidos a identificação em banco de dados no NCBI. Em negrito encontram-se os peptídeos que parearam positivamente para a isoforma IIA de miosina, para a espécie *Rattus norvegicus*.

Anexo-VI. Peptídeos derivados de p200 que foram pareados para miosina IIB.

1	MAQRTGLEDP	ERYLFVDRAV	IYNPATQADW	TAKKLVWIPS	ERHGFEAASI
51	KEERGDEVMV	ELAENGKKAM	VNKDDIQKMN	PPKFSKVEDM	AELTCLNEAS
101	VLHNLKDRYY	SGLIYTYSGL	FCVVINPYKN	LPIYSENIIE	MYRGKKRHEK
151	PPHIYAISES	AYRCMLQDRK	DQSILCTGES	GAGKTENTKK	VIQYLAHVAS
201	SHKGRKDHNI	PGELERQLLQ	ANPILESFGN	AKTVKNDNSS	RFGKFIRINF
251	DVTGYIVGAN	IETYLLEKSR	AVRQAKDERT	FHIFYQLLSG	AGEHLKSDLL
301	LEGFNNYRFL	SNGYIPIPGQ	QDKDNFQETM	EAMHIMGFSH	EEILSMLKVV
351	SSVLQFGNIS	FKKERNTDQA	SMPENTVAQK	LCHLLGMNVM	EFTRAILTPR
401	IKVGRDYVQK	AQTKEQADFA	VEALAKATYE	RLFRWL VHRI	NKALDRTRKQ
451	GTSFIGILDI	AGFEIFELNS	FEQLCINYTN	EKLQQLFNHT	MFILEQEYYQ
501	REGIEWNFID	FGLDLQPCID	LIERPANPPG	VLALLDEECW	FPKATDKTFV
551	EKLQVEQGS	SKFQKPRQLK	DKADFCIIHY	AGKVDYKADE	WLMKNMDPLN
601	DNVATLLHQS	SDRFVAELWK	DVDRIVGLDQ	VTGMTETAFG	SAYKTKKGMF
651	RNVGQLYKES	LTCLMATLRN	TNPNEVRCII	PNHEKRAGKL	DPHLVLDQLR
701	CNGVLEGIRI	CRQGFPNRIV	FQEFRQRYEI	LTPNAIPKGF	MDGKQACERM
751	IRALELDPNL	YRIGQSKIFF	RAGVLAHLEE	ERDLKITDII	IFFQAVCRGY
801	LARKAFKKQ	QQLSALKVLQ	RNCAAYLKL	HWQWVRVFTK	VKPLLQVTRQ
851	EEELQAKDEE	LLKVKEKQTK	VEGELEEMER	KHQQLLEEK	ILAEQLQAE
901	ELFAEAEEMR	ARLAAKKQEL	EEILHDLES	VEGEEERNQI	LQNEKKKMQA
951	HIQDLEEQLD	EEGARQKLQ	LEKVTAEAKI	KKMEEVLLL	EDQNSKFIKE
1001	KKLMEDRIAE	CSSQLAEFEE	KAKNLAKIRN	KQEVMSIDLE	ERLKKEEKTR
1051	QELEKAKRKL	DGETTDLQDQ	IAELQAQVDE	LKVQLTKKEE	ELQALARGD
1101	DETLHKNNAL	KVARELQAQI	AELQEDFESE	KASRNKAEKQ	KRDLSEEELEA
1151	LKTELEDTL	TTAAQQELRT	KREQEVAELK	KALEDETKNH	EAQIQDMRQR
1201	HATALEELSE	QLEQAKRFKA	NLEKNKQGLE	TDN KELACEV	KVLQOVKAES
1251	EHKRKKLDAQ	VQELHAKVSE	GDRLRVELAE	KANKLQNELD	NVSTLLEEAE
1301	KKGMKFADDA	AGLESQLODT	QELLQEETRQ	KLNLSSRIRQ	LEEEKNSLQE
1351	QEEEEEEARK	NLEKQVLALQ	SQLADTKKKV	DDDLGTIEGL	EEAKKKLLKD
1401	VEALSQRLEE	KVLAYDKLEK	TKNRLQQELD	DLTVDLDHQR	QIVSNLEKKQ
1451	KKFDQLLAE	KGISARYAEE	RDRAEAEARE	KET KALSLAR	ALEEALAEKE
1501	EFERQNKQLR	ADMEDLMSSK	DDVGKNVHEL	EKSKRALEQQ	VEEMRTQLEE
1551	LEDELQATED	AKLRLEVNMQ	AMKAQFERDL	QTRDEQNEEK	KRLLLKQVRE
1601	LEAELEDERK	QRALAVASKK	KMEIDLKDLE	AQIEAANKAR	DEVIKQLRKL
1651	QAQMKDYQRE	LEEARASRDE	IFAQSKSEK	KLKSLEAEIL	QLQEELASSE
1701	RARRHAEQER	DELADEIANS	ASGKSALLDE	KRR LEARIAQ	LEEELEEEQS
1751	NMELLNDRFR	KTTLQVDTLN	TELAAERSAA	QKSDNARQQL	ERQNKELKAK
1801	LQELEGAVKS	KFKATISALE	AKIGQLEEQL	EQEAKERAAA	NKLVRRTTEK
1851	LKEIFMQVED	ERRHADQYKE	QMEKANARMK	QLKRQLEEAE	EEATRANASR
1901	RKLQRELDDA	TEANEGLSRE	VSTLKNRLRR	GGPISFSSSR	SGRRQLHIEG
1951	ASLELSDDDT	ESKTSVNET	QPPQSE		

Fig. 5. Peptídeos pareados para miosina IIB. Os peptídeos gerados por digestão com tripsina foram submetidos a identificação em banco de dados no NCBI. Em negrito encontram-se os peptídeos que parearam positivamente para a isoforma IIB de miosina, para a espécie *Rattus norvegicus*.

Anexo-VII. Peptídeos derivados de p18 que foram pareados para miosina IIA.

1	MAQQAADKYL	YVDKNFINNP	LAQADWAAKK	LVWVPSTKNG	FEPASLKEEV
51	GEEAIVELVE	NGKKVKVNKD	DIQKMNPPEF	SKVEDMAELT	CLNEASVLHN
101	LKERYYSGLI	YTYSGLFCVV	INPYKNLPIY	SEEIVDMYKG	KKRHEMPPHI
151	YAITDTAYRS	MMQDREDQSI	LCTGESGAGK	TENTKKVIQY	LAHVASSHKS
201	KKDQGELERQ	LLQANPILEA	FGNAKTVKND	NSSRFGKFIR	INFDVNGYIV
251	GANIETYLLE	KSRAIRQAKE	ERTFHIFYYL	LSGAGEHLKT	DLLEPYNKY
301	RFLSNGHVTI	PGQQDKDMFQ	ETMEAMRIMG	IPEDEQMGLL	RVISGVLQLG
351	NIVFKKERNT	DQASMPDNTA	AQKVSHLLGI	NVTDFTRGIL	TPRIKVGDRY
401	VQKAQTKEQA	DFAIEALAKA	TYERMFRWL	LRINKALDKT	KRQGASFIGI
451	LDIAGFEIFD	LNSFEQLCIN	YTNEKLQQLF	NHTMFILEQE	EYQREGIEWN
501	FIDFGLDLQP	CIDLIEKPAG	PPGILALLDE	ECWFPGKATD	SFVEKVVQEQ
551	GTHPKFQKPK	QLKDKADFCI	IHYAGKVDYK	ADEWLMKNMD	PLNDNIATLL
601	HQSSDKFVSE	LWKDVDRIIG	LDQVAGMSET	ALPGAFFTRK	GMFRTVQGOLY
651	KEQLAKLMAT	LRNTNPNFVR	CIIPNHEKKA	GKLDPHLVLD	QLRCNGVLEG
701	IRICRQGFPN	RVVFQEFRQR	YEILTPNSIP	KGFMDGKQAC	VLMIKALELD
751	SNLYRIGQSK	VFFRAGVLAH	LEEERDLKIT	DVIIGFQACC	RGYLARKAFA
801	KRQQQLTAMK	VLQRNCAAYL	RLRNWQWWRL	FTKVKPLNS	IRHEDELLAK
851	EAEITKVREK	HLAAENRLTE	METMQSQLMA	EKLQEQEQLO	AETELCAEAE
901	ELRARLTAKK	QELEEICHDL	EARVEEEEEE	CQYLQAEKKK	MQQNIQEELE
951	QLEEEESARQ	KLQLEKVTTE	AKLKKLEEDQ	IIMEDQNCCL	AKEKKLLEDR
1001	VAEFTTNLME	EEEKSKSLAK	LKNKHEAMIT	DLEERLRREE	KQRQELEKTR
1051	RKLEGDSTD	SDQIAELQAA	IAELKMQLA	KEEELQAAAL	RVEEEAAQKN
1101	MALKKIRELE	TQISELQEDL	ESERACRNKA	EKQKRDLGEE	LEALKTELED
1151	TLDSTAAQQE	LRSKREQEVS	ILKKTLEDEA	KTHEAQIQEM	RQKHSQAVEE
1201	LAEQLEQTKR	VKATLEKAKQ	TLENERGELA	NEVKALLQGG	GDSEHKRKKV
1251	EAQLQELQVK	FSEGERVRTE	LADKVSKLQV	ELDSVTGLLN	QSDSKSSKLT
1301	KDFSALSQL	QDTQELLQEE	NRQKLSLSTK	LKQMEDEKNS	FREQLEEEEEE
1351	AKRNLEKQIA	TLHAQVTDMK	KKMEDGVGCL	ETAEAAKRRR	QKDLEGLSQR
1401	LEEKVAAYDK	LEKTKTRLQQ	ELDDLVLVDL	HQRQSVSNLE	KKQKKFDQLL
1451	AEEKTISAKY	AEERDRAEAE	AREKETKALS	LARALEEAME	QKAELERLNK
1501	QFRTEMEDLM	SSKDDVGKSV	HELEKSKRAL	EQQVEEMKTQ	LEELEDELQA
1551	TEDAKLRLEV	NLQAMKAQFE	RDLOGRDEQS	EEKKKQLVRQ	VREMEAELED
1601	ERKQRSIAMA	ARKKLEMDLK	DLEAHIDTAN	KNREEAIKQL	RKLQAQMKDC
1651	MRELDLTRAS	REEILAQAKE	NEKKLKSMEA	EMIQEQEELA	AAERAKRQAQ
1701	QERDELADEI	ANSSGKGALA	LEEKRRLEAR	IAQLEEEEEE	EQGNTTELIND
1751	RLKKANLQID	QINTDLNLER	SHAQKNENAR	QQLERQNKEL	KAKLQEMESA
1801	VKSKYKASIA	ALEAKIAQLE	EQLDNETKER	QAASKQVRRR	EKKLKDVLQ
1851	VEDERRNAEQ	FKDQADKAST	RLKQLKRQLE	EAEEEAQRAN	ASRRKLQREL
1901	EDATETADAM	NREVSSLKNK	LRRGDMPFVV	TRRIVRKGTG	DCSDEEVDGK
1951	ADGADAKAAE				

Fig. 6. Peptídeos pareados para cadeia pesada de miosina IIA. Os peptídeos gerados por digestão com tripsina foram submetidos a identificação em banco de dados no NCBI. Em negrito encontram-se os peptídeos que parearam positivamente para a isoforma IIA de miosina, para a espécie *Rattus norvegicus*.

Anexo-VIII. Peptídeos derivados de p15 que foram pareados para cadeia leve de miosina.

1	MCDFTEDQTA	EFKEAFQLFD	RTGDGKILYS	QCGDVMRALG	QNPTNAEVLK
51	VLGNPKSDEM	NVKVLD FEHF	LPMLQTVAKN	KDQGTYEDYV	EGLRVFDKEG
101	NGTVMGAEIR	HVLVTLGEKM	TEEEVEMLVA	GHEDSNGCIN	YEGKGHTINW
151	GL				

Fig. 7. Peptídeos pareados para cadeia leve de miosina. Os peptídeos gerados por digestão com tripsina foram submetidos a identificação em banco de dados no NCBI. Em negrito encontram-se os peptídeos que parearam positivamente para a isoforma 3 de cadeia leve essencial de miosina II não muscular, para a espécie *Rattus norvegicus*.

Anexo-IX. Marcação de p200 com anticorpos específicos para miosinas IIA e IIB.

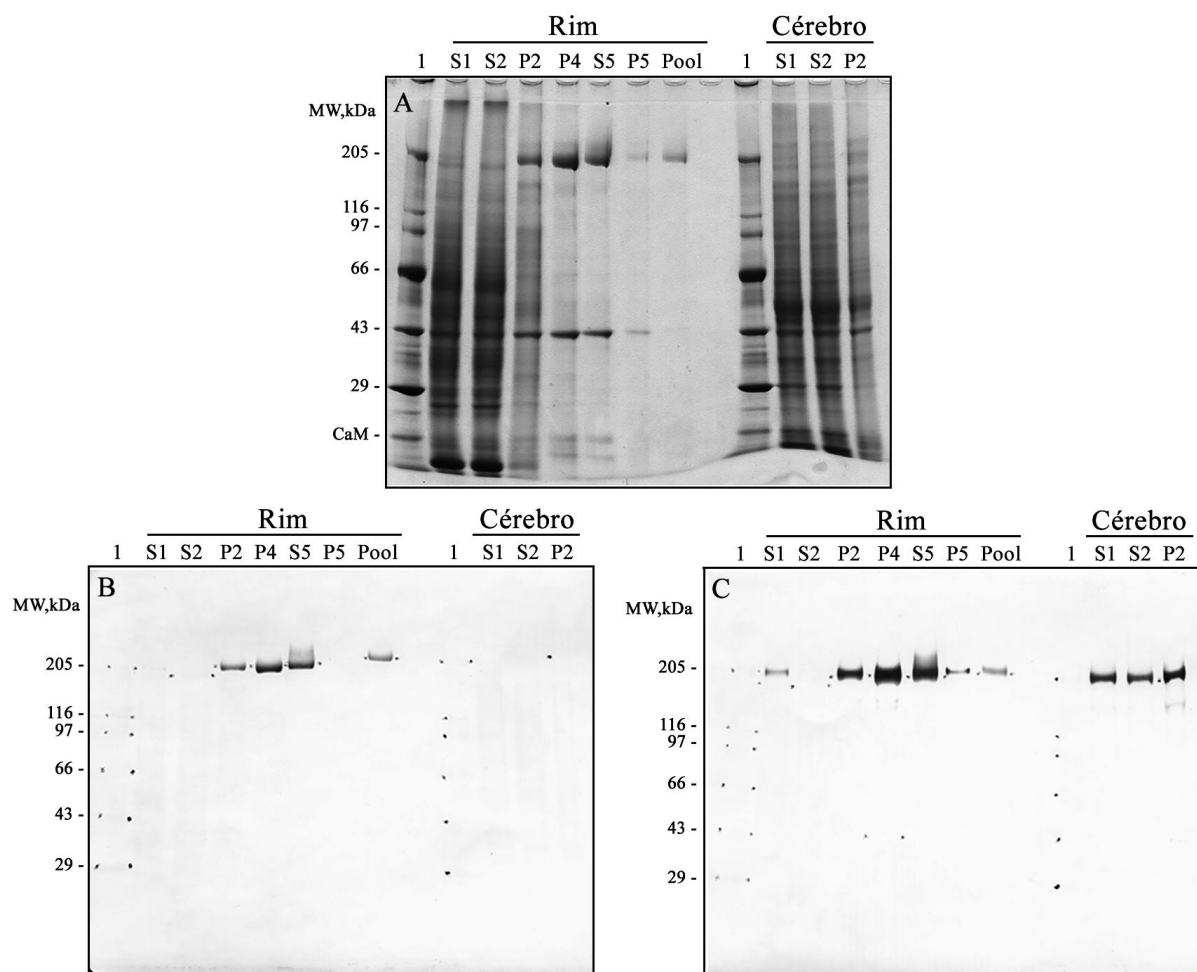


Fig. 8. p200 é reconhecido por anticorpos específicos antimiosina IIA e IIB. As amostras (2,0 μ L de S1, S2; 7,0 μ L de P2 e P5; 10,0 μ L de S5 e 15 μ L da fração pool de miosina II) foram aplicadas em gel gradiente 5-22% e os géis foram corados com Commassie Blue R-250. Para o Western blot, os polipeptídeos das frações foram separados em SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose e sondados com anti-miosina IIA ou IIB. Em **A**, gel controle para as frações de rim e cérebro de rato. Em **B**, sondagem com anti-miosina IIA. Em **C**, sondagem com anti-miosina IIB. Linha 1– marcadores de massa molecular: cadeia pesada de miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), actina (43 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). CaM: calmodulina (17,8 kDa).