

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**LUIZ CARLOS JÚNIOR ALCÂNTARA**

**EXPRESSÃO EM *E. coli*, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
PARCIAL DO DOMÍNIO LIGANTE DE CALMODULINA DA  
MIOSINA-V DE CÉREBRO DE GALINHA**

**Dissertação de Mestrado apresentada  
à Faculdade de Medicina de Ribeirão  
Preto-USP, para a obtenção do grau de  
Mestre em CIÊNCIAS (Bioquímica).**

**Orientador: Prof. Dr. ROY EDWARD LARSON**

**Ribeirão Preto**

**1996**

*"Quando eu penso na Bahia*

*Nem sei que dor que me dá*

*Me dá, me dá, me dá iaia*

*Se eu pudesse qualquer dia*

*Eu ia de novo pra lá*

*Não vá, não vá, não vá iaia*

*Eu vô, eu vô se vô ioiô*

*Eu deixei lá na Bahia*

*Um amor tão bom, tão bom, ioiô*

*Meu Deus que amor*

*E desse amor só quem sabia*

*Era Virgem Maria*

*Nasceu, cresceu, viveu e lá ficou...*

*E quem sabe se esse amor*

*Que ficou lá na Bahia ô*

*Já se acabou*

*Se assim for eu sei de alguém*

*Que lhe quer muito bem "*

*(Ary Barroso)*

*Esta dissertação eu dedico à Adriana, Bia, Rosely, Maria Jozé, Lúcia, Edu Moreno e Kleber,  
amigos que deixei um dia, lá na Bahia.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, por ter dado-me força e coragem para assim dar continuidade e término a este trabalho.

Aos meus pais, Luiz Alcântara e Maria Rosa, pelo incentivo em todas as minhas decisões.

Ao Roy pela orientação e paciência durante os ensinamentos transmitidos a mim no decorrer deste trabalho.

À Cris, Pare e Lisa, pela amizade consistente que permaneceu mesmo no período em que estive ausente de Ribeirão Preto.

Ao Sinji e Fernanda pela ajuda em diversos momentos; em especial à Silvinha, a quem tenho muito carinho.

À Enilza pela co-orientação e ajuda em diversos momentos.

Ao Departamento de Bioquímica, em especial aos professores Dr. Eduardô Brandt, Dra. Angela Cruz, Dr. Wilson Lodi e Dr. Hector Terenzi, por contribuírem para a minha formação.

Às funcionárias do Departamento de Bioquímica, Maria Tereza, Lúcia e Ivone, pela atenção e eficiência.

À Carmem pelo convívio, amizade e agradáveis horas de descontração.

Ao Departamento de Morfologia pelo uso de diversos equipamentos, reagentes, câmara escura e sistema de fotografia, bem como aos funcionários José Augusto, Luiz Andrade, Malu, Mara e Cláudia e aos pós-graduandos Paulo e José Antônio (Fu).

Ao farmacêutico hospitalar Mario Rosa e Professores Elísio, Neuza e Lucinha, pela grande contribuição à minha formação acadêmica em Ouro Preto.

Ao amigo Sidney pela força durante o meu retorno ao mestrado.

À CAPES pela bolsa concedida e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

A todas as pessoas que deixei de mencionar, que ajudaram de forma direta ou indireta contribuindo para a realização deste trabalho.

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

$\alpha$ gal	- fragmento $\alpha$ da $\beta$ -galactosidase
ATP	- adenosina 5'-trifosfato
ATPase	- adenosina trifosfatase
BBMI	- miosina-I de borda em escova
BCIP	- 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
C-terminal	- carboxi-terminal
CaM	- calmodulina
CNBr	- brometo de cianogênio
cDNA	- ácido desoxirribonucleico complementar
DTT	- ditioneitol
EDTA	- ácido etilenediaminotetracético
EGTA	- ácido etileneglicol-bis( $\beta$ -aminoetil éter) N, N, N', N'-tetracético
$^{125}$ I-CaM	- calmodulina iodada
IPTG	- isopropiltiogalactosídeo
kDa	- kilodaltons
NaN <sub>3</sub>	- azida de sódio
N-terminal	- amino-terminal
NBT	- azul nitro tetrazólio
NMR	- Ressonância Magnética Nuclear
pI	- ponto Isoelétrico
PLM	- proteína ligante de maltose
PMSF	- fluoreto de fenil metil sulfonila
SDS	- lauril sulfato de sódio

SDS-PAGE	- eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de
SDS	
TBS-Tween	- tampão Tris/salina com Tween
Tris	- Tris-(hidroximetil)-aminometano
Tween-20	- Monolaurato de polioxietileno-sorbitan

# ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO .....	02
I.1 - Domínio pescoço da miosina-V .....	06
II - MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
II.1. - Expressão da proteína de fusão PLM-pescoço.....	10
II.2 - Purificação da proteína de fusão por cromatografia de afinidade.....	13
II.3 - Clivagem da proteína de fusão .....	15
II.4 - Caracterização da proteína de fusão .....	15
II.4.1 - “Overlay” com calmodulina biotinizada .....	15
II.4.2 - Precipitação com calmodulina acoplada a sepharose-4B .....	16
II.4.3 - Recaptação do complexo com “Magnespheres” .....	17
II.5. - Dosagem de proteínas .....	18
II.6. - Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	18
II.7. - “Western blot”.....	19
III. - RESULTADOS .....	21
III.1. -Expressão.....	21
III.2. - Purificação.....	23
III.3. - Clivagem .....	26
III.4 - Caracterização da proteína de fusão .....	28
III.4.1 - “Overlay” .....	28
III.4.2 - Precipitação com calmodulina acoplada a sepharose-4B.....	30
III.4.3 - Recaptação do complexo com “Magnespheres” .....	31
IV. - DISCUSSÃO.....	33
V. - SUMÁRIO .....	38
VI - SUMMARY .....	40
VII. - BIBLIOGRAFIA .....	42

# INTRODUÇÃO



# I. INTRODUÇÃO

Miosinas são proteínas motoras envolvidas em movimentos celulares como por exemplo, contração muscular, transporte de organelas no citoplasma e fagocitose (para revisão consultar: Pollard, 1991; Hammer, 1991; Cheney e Mooseker, 1992). As miosinas musculares são moléculas grandes contendo seis cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias pesadas, de aproximadamente 200kDa, e quatro cadeias leves, em torno de 20kDa. As cadeias pesadas consistem de duas cabeças globulares ligadas a uma longa cauda em  $\alpha$ -hélice dupla (“coiled coil”). O domínio “cabeça” é altamente conservado, de aproximadamente 95kDa, e pode ligar actina, hidrolisar ATP e translocar sobre os filamentos de actina. Na junção cabeça-cauda há um domínio regulatório (pescoço) associado não-covalentemente a cadeias leves globulares (Chaussepied et al., 1986). As cadeias leves de miosinas musculares que apresentam similaridades consideráveis de sequência e estrutura com a calmodulina.

Com as técnicas de clonagem molecular e sequenciamento de DNA, já se conhece a sequência de 50 miosinas, aproximadamente, divididas em 11 classes estruturais (Hammer, 1994; Cheney, 1993b; Cheney e Mooseker, 1995). Previamente, as miosinas foram divididas em dois grupos, de acordo com a diversidade funcional: convencional e não convencional (Cheney e Mooseker, 1992), exemplificadas no diagrama 1. A mais conhecida e caracterizada miosina convencional é a miosina-II da contração muscular; encontrada em músculo esquelético, liso e cardíaco. Miosinas não estão, entretanto, limitadas a células musculares (Korn e Hammer, 1988), nem a organismos superiores. Elas são encontradas em muitas células e tecidos não-musculares (para revisão consultar Hammer, 1994), como em leveduras, amebas, nematódios, plantas superiores, etc. Uma proteína distinta estruturalmente e ligante de calmodulina (CaM), presente em célula epitelial intestinal, é uma miosina não convencional denominada miosina-I de borda em escova, BBMI (Collins e Borysenko, 1984; Pollard et al., 1991). NINA C, pertencente a classe III, é uma miosina não convencional encontrada em células fotoreceptoras de *Drosophila* (Montell e Rubin, 1988; Matsumoto et al., 1987), cuja ligação à CaM é necessária para fototransdução (Porter et al., 1993).

Uma miosina não convencional, classificada como miosina-V (pertencente a classe V), foi identificada durante a investigação da

regulação da atividade ATPásica de uma fosfoproteína, ligante de calmodulina, enriquecida em cérebro (Larson et al., 1988; Larson et al., 1990; Espindola et al., 1992). Foi denominada p190, com massa molecular relativa de 190.000 (por meio de SDS-PAGE, Larson et al., 1988) e se associa a filamentos de actina.

Foi demonstrada a distinção entre a miosina-V e a miosina-II de cérebro com base na imunoreatividade diferencial de anticorpos policlonais gerados contra estas proteínas (Larson et al., 1990). Foram isolados e sequenciados utilizando anticorpos policlonais anti-miosina-V de rato, como sonda, os clones codificantes da miosina-V a partir de uma biblioteca de cDNA de cérebro de galinha em vetor de expressão  $\lambda$ ZAP (Espreafico et al., 1992).

Comparando a sequência de aminoácidos da miosina-V com todas as outras miosinas já sequenciadas conclui-se que ela é composta por três domínios (figura 1): cabeça, pescoço e cauda, característicos das miosinas. O domínio cabeça (domínio N-terminal) é grandemente conservado e contém os motivos do domínio motor das miosinas (os sítios ligantes de ATP e actina). O domínio pescoço é formado por seis sítios similares ao sítio ligante de CaM da neuromodulina; assim, associa-se à CaM ou cadeias leves relacionadas. A cauda é formada por uma região contendo segmentos curtos de  $\alpha$ -hélice dupla (“coiled coil”) alternados por segmentos não  $\alpha$ -hélice (um deles contém a sequência PEST, relacionada com a digestão por calpaínas, Reichsteiner, 1990) e uma grande região globular no C-terminal, de função desconhecida.

A microscopia eletrônica da miosina-V de cérebro de galinha confirmou que, de fato, ela é um dímero de cadeias pesadas, mas não forma filamento. A imunolocalização, a nível ótico, em neurônios e astrócitos tem sugerido que ela encontra-se na região do Golgi, ao longo dos prolongamentos celulares e em suas extremidades. A imunodeteção em “western blots” mostra que ela não é vastamente distribuída em todos os tecidos: é uma proteína ricamente expressa em neurônios e é encontrada também em certas células gliais, certos tecidos secretórios como o pâncreas endócrino, células endócrinas do epitélio intestinal, útero, ovário, testículo, adrenal e em certos linfócitos; mas não foi detectada em tecidos musculares nem no fígado (Espreafico et al., 1992).

# A SUPER CLASSE DE MOTORES: MIOSINA

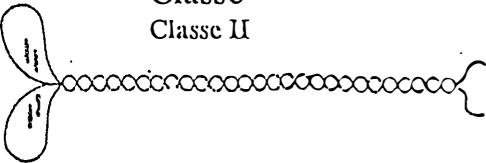
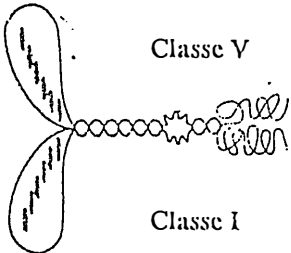



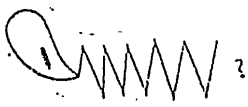
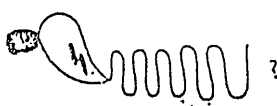
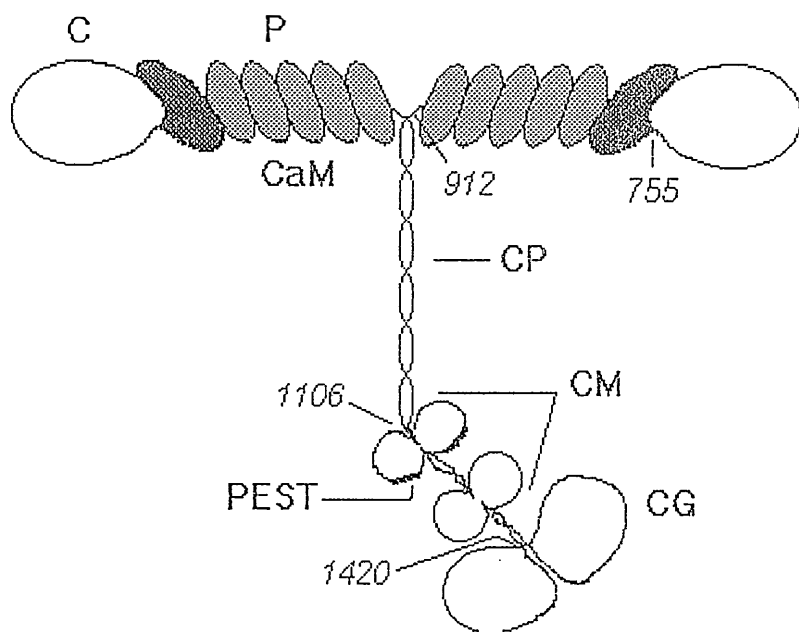
Classe	Propriedades	Exemplos
<p>Classe II</p> 	<p>Forma dímeros e filamentos bipolares; responsável pela contração muscular, requerida para citocinese e "capping" in <i>Dictyostelium</i>.</p>	<p>MII de músculo esquelético, MII de músculo liso, MII não-muscular, <i>Dictyostelium</i> MII. (~200 kD)</p>
<p>Classe V</p> 	<p>Forma dímeros mas não filamentos; o mutante <i>myo2</i> é deficiente na germinação, tem esqueleto de actina desorganizado vesículas acumuladas.</p>	<p>Dilute de canundongo, p190 de cérebro de galinha, MYO2 de levedura. (180-215 kD)</p>
<p>Classe I</p> 	<p>Forma monômeros que podem "crosslink" com actina; localizada em pequenas vesículas, ventosas fagocíticas, vacuolo contrátil e com as extremidades principais das células em movimento.</p>	<p>MIA, MII3, MIC de <i>Acanthamoeba</i>; MII3, MII de <i>Dictyostelium</i>. (~125-140 kD)</p>
<p>Classe I</p> 	<p>Em estudo.</p>	<p>MIA de <i>Acanthamoeba</i>, MIE de <i>Dictyostelium</i>. (~113 kD), MYO3 e MYO5 de <i>Saccharomyces</i> e o gene <i>myoA</i> de <i>Aspergillus</i>.</p>
<p>Classe I</p> 	<p>Forma monômeros; liga filamentos de actina com a membrana plasmática nos microvilus.</p>	<p>BI3MI, MI de cérebro/adrenal. (~120 kD)</p>
<p>Classe IV</p> 	<p>Em estudo.</p>	<p>MI de alto peso molecular de <i>Acanthamoeba</i> (177 kD)</p>
<p>Classe III</p> 	<p>Presente em células fotoreceptoras de <i>Drosophila</i>; a forma de 174 kD está localizada nos rabdômeros onde pode funcionar em fototransdução.</p>	<p>Nina C (174 e 132 kD)</p>

Diagrama 1. Esquema das diferentes classes de miosinas é mostrado com os domínios cabeça indicados pelas aberturas ovais maiores e as caudas leves/CaM por aberturas ovais menores. M, miosina. Adaptado de Cheney e Moosker, 1992.



**Figura 1.** Modelo hipotético da estrutura da miosina-V, baseado na sequência de aminoácidos e análise de micrografias eletrônicas (Cheney et al., 1993; Espreafico et al., 1992). Os domínios e subdomínios são indicados: **P** - pescoço, **C** - cabeça, **CP** - cauda proximal, **CM** - cauda medial e **CG** - cauda globular. **CaM** - representa as calmodulinas e **PEST** - o sítio de reconhecimento pela calpaína. Os números indicam as posições estimadas dos aminoácidos na miosina-V de cérebro de galinha (Larson, 1996).

## I.1. DOMÍNIO PESCOÇO DA MIOSINA-V

O domínio pescoço é formado por seis potenciais sítios ligantes de CaM (Espreafico et al., 1992), similares ao sítio ligante de calmodulina da neuromodulina, fosfoproteína concentrada em cones de crescimento e terminais sinápticos (Alexander et al., 1988); ou seja, seis repetições imperfeitas dispostas entre os resíduos 765-909, sendo que a primeira destas repetições possui 42% de identidade com o sítio ligante de CaM da neuromodulina. Cada uma destas sequências contém aproximadamente 23 resíduos; destacando-se a sequência: **IQxxxRGxxxRxxY** (Cheney e Mooseker, 1992; Xie et al., 1994), denominada “**motivo IQ**” (figura 2) onde x representa resíduos predominantemente básicos e o resíduo **G** não é conservado na sequência de levedura, conforme descrito na figura 2. A sequência acima é altamente básica (29 Arg, 17 Lys, 5 His) e possui pI na faixa de 12-13 (Cheney et al., 1991; Cheney e Mooseker, 1992). Estas repetições foram reconhecidas no produto do gene *Dilute* de camundongo (Mercer et al., 1991), *MYO2* de *Saccharomyces cerevisiae* (Johnston et al., 1991), *MYO4* de *Dictyostelium* (Haarer et al., 1992) e *MYA1* de *Arabidopsis thaliana* (Kinkema e Schiefelbein, 1993). São também semelhantes em posição e estrutura primária às repetições presentes na junção cabeça-cauda da BBMI, região responsável por ligar CaM. Estão também presentes em todas as outras miosinas, como por exemplo nos dois sítios ligantes de cadeias leves essenciais de uma das miosinas-II de músculo cardíaco de rato (figura 2). Recentemente, a estrutura atômica da região ligante de cadeias leves da miosina-II de molusco de concha foi resolvida (Xie et al., 1994), demonstrando que esta sequência consenso é fundamental para a interação com cadeias leves essencial e regulatória. Embora a miosina do molusco de concha seja regulada por cálcio e suas cadeias leves tenham homologia com a calmodulina, elas não apresentam os domínios ligantes de cálcio conservados, o sítio da cadeia regulatória liga  $Mg^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$  e o sítio específico para cálcio é incomum, sendo dependente da interação trimolecular entre as cadeias leves e a pesada.

Foram também resolvidas estruturas de complexos da calmodulina e peptídeos-alvos que não têm homologia com o “motivo IQ”: derivados da quinase de cadeia leve das miosinas de músculos esquelético (Ikura et al., 1992) e liso (Meador et al., 1992).

A distribuição dos resíduos chaves no “motivo IQ” requer uma conformação em  $\alpha$ -hélice para ligações com CaM e cadeias leves; sendo a base estrutural para ocorrer estas interações (Xie et al., 1994).

Ikura e colaboradores, 1992, estudando o domínio regulatório da quinase de cadeia leve de miosina-II de músculo esquelético, compararam a sequência deste domínio com as sequências dos “motivos IQ”, bem como outras proteínas ou peptídeos que ligam CaM, com alta afinidade, mas não têm o “motivo IQ”. Estas proteínas têm como fator comum dois aminoácidos aromáticos ou hidrofóbicos de cadeias longas, separados por um espaço de doze resíduos (IQxxxRGxxxRxxY).

Estas estruturas, em conjunto, contribuem enormemente para a compreensão das interações moleculares entre a CaM e suas proteínas-alvo. Entretanto não respondem à pergunta que vem se tornando central para o entendimento completo da função de uma proteína essencial, versátil e ubiqüita como a CaM: Qual é o mecanismo da interação independente de cálcio da CaM com uma estrutura do tipo “motivo IQ”? Tentando desvendar estes mecanismos, foi expresso o domínio pescoço da miosina-V em bactéria, purificado por coluna de afinidade e iniciado sua caracterização, demonstrando que o mesmo liga CaM de maneira independente de cálcio.

MOTIVOS IQ-UMA SEQUÊNCIA QUE LIGA CaM NA AUSÊNCIA DE Ca<sup>2+</sup>

Nº primeiro aa	Seqüência	Nº último aa	Proteína
27	<b>PEDKAHKAATKI</b> QASFRGHITRKKLKGEKKGDAP	60	neuromodulina <sup>bovina</sup>
765	DKLRAACIRIQKTIRGWL <b>MRKKY</b> M RMRRAAII <b>IQRYV</b> RGHQARCYATFL RRTRAAII <b>IQKFOR</b> MYVVRKRYQ CMRDATIALQALLR <b>GYLVR</b> NKYQMM LREHKSII <b>IQKHVR</b> GLARVHYH RTLKAIVYLQCCY <b>RRMMAK</b> RELKKL	909	miosina-V-1 <sup>galinha</sup> miosina-V-2 miosina-V-3 miosina-V-4 miosina-V-5 miosina-V-6
764	DKLRAACIRIQKTIRGWL <b>LRKRY</b> L CMQRAAITVQRYV <b>RGYQ</b> ARCYAKFL RRTKAAT <b>TIQKYWR</b> MYVVR <b>RRYK</b> IRRAAT <b>IVIQSYL</b> RGYL <b>TRNRY</b> RKI LREYK <b>AVIQKVR</b> GLAR <b>THYK</b> RTMKAI <b>VYLQCCF</b> RR <b>MMAKR</b> DVKKL	908	dilute-1 <sup>camundongo</sup> dilute-2 dilute-3 dilute-4 dilute-5 dilute-6
783	KMHNSIVMIQKKIRAKY <b>YRKQ</b> YL QISQAIKYLQNNIK <b>GFTIRQ</b> RVNDE MKVNCATLLQAA <b>YRGHSI</b> RANVF SVLRTITNLQKKIR <b>KELKQ</b> RQLKQE HEYNAAV <b>TIQSKVR</b> TFEPRS <b>RFL</b> RTKKDTVVVQSLIR <b>RAAQ</b> RKLKQL	926	MYO2-1 <sup>levedura</sup> MYO2-2 MYO2-3 MYO2-4 MYO2-5 MYO2-6
654	RVAELATLIQKMFRGWCC <b>RKRY</b> Q LMRKSQILISAWFRGHM <b>QRNRY</b> K QMKRSVLL <b>LQAYARGW</b> KSRLL <b>LRELK</b> VQR RRHLA <b>ASTISAYW</b> KGYQ <b>TRRM</b> YRRY	724	BBMI-1 <sup>galinha</sup> BBMI-2 BBMI-3 BBMI-4 ( <u>inserto alternativo</u> )
	FRSDACTRLSNFIY <b>RRMVQ</b> KYLMGLQKNLPPMAVLDRT WPPAPYKFLSDAN <b>QELK</b> SIFYRWKCKKYREQLTPQQRAML	802	BBMI-5? BBMI-6?
780	ERLSRIITRIQAQARGQL <b>MRIEF</b> KKM <b>VERR</b> DALLVIQWNIRAFMGVKNWP <b>WMK</b>	832	M-II-1, $\alpha$ -card <sup>rato</sup> ( <u>sítio-IC1</u> ) M-II-2
785	ERLSKIISM <b>FQAHIR</b> GYLIRKAYK	799	M-II-1, molusco ( <u>sítio ELC</u> )
802	QDQRIGLSVI <b>QRNIRK</b> WLVLRN <b>WQ</b>	825	M-II-2 de concha ( <u>sítio RLC</u> )

Figura 2. Um domínio ligante de CaM/cadeia leve, o “motivo IQ”, está presente em uma ou mais repetições em todas as miosinas. A sequência indicada na região pescoço da miosina foi alinhada manualmente observando os resíduos conservados (em negrito). A sequência da neuromodulina de cérebro bovino foi também incluída para comparação (Espreafico et al., 1992). O segmento da sequência da BBMI sublinhado representa um inserto oriundo de um processamento alternativo do mRNA, gerando uma isoforma menos abundante com um sítio ligante de CaM adicional. A deleção da porção sublinhada da miosina-II cardíaca- $\alpha$  de rato aboliu a ligação da cadeia leve essencial. Por último, está apresentada a sequência da região ligante de cadeias leves da miosina-II de molusco de concha (atividade ATPásica dependente de Ca<sup>2+</sup>). A sequência em negrito contém os aminoácidos necessários para interação com as cadeias leves essencial e regulatória, respectivamente, conforme determinado por cristalografia (Xie et al., 1994).

## MATERIAIS E MÉTODOS



## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### II.1. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO PLM-PESCOÇO

Foram utilizadas colônias de *E. coli* XL1-Blue transformadas com o vetor de expressão pIH902 (New England Biolabs, Beverly, MA) e com plasmídeos recombinantes portadores da sequência de cDNA relativa ao domínio pescoço da miosina-V, resíduo 765 a 909 (Espreafico et al., 1992). O vetor pIH902 (figura 3) contém o forte promotor Ptac e o gene *malE*, que codifica uma proteína ligante de maltose (PLM) com peso molecular de 42 (resultando na expressão de uma proteína de fusão). O vetor contém ainda o gene *lacZ $\alpha$* , que codifica um fragmento da  $\beta$ -galactosidase, um “polylinker” entre *malE* e *lacZ $\alpha$*  contendo vários sítios para endonucleases de restrição e uma sequência codificadora do sítio de reconhecimento da protease fator Xa de coagulação bovina (Ile-Glu-Gly-Arg), possibilitando a clivagem entre a proteína de interesse e a PLM após purificação através da coluna de amilose.

A expressão do domínio ligante de CaM da miosina-V foi realizada de acordo com o protocolo descrito pelo fornecedor (New England Biolabs), padronizado por Costa (1992): 1 litro do meio LB estéril (1% de bactotripton, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, 0,2% de glicose, pH 7,5), contendo 100 $\mu$ g/ml de ampicilina e 12,5 $\mu$ g/ml de tetraciclina, foi inoculado com 10ml de uma cultura crescida por 14 horas no mesmo meio a 37°C, incubado com boa aeração (num agitador Superohm G-25 a 200rpm) até  $A_{600} \cong 0,5$  (aproximadamente  $2 \times 10^8$  cels/ml). Neste ponto, foi retirado 1ml da cultura e preparado para SDS-PAGE, da seguinte maneira: centrifugou-se por 2 min numa microcentrífuga Incibrás; desprezou-se o sobrenadante, ressuspendendo o precipitado em 50 $\mu$ l de água deionizada + 25 $\mu$ l de tampão de amostra STOP (187mM de Tris-HCl, pH 6,8, 12% de SDS, 6mM de EDTA, 27,6% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol); posteriormente a amostra foi fervida por 5 min e rotulada como “células não induzidas”.

À cultura remanescente foi adicionado IPTG para 0,3mM, mantendo a incubação por mais 2 horas. Ao final deste intervalo, foi retirado 1ml e preparado para SDS-PAGE, como descrito acima, e a amostra rotulada como “células induzidas”. Resfriou-se a cultura em banho de água e gelo por 30 min., centrifugando a 4000 x g por 15 min. a 4°C em uma centrífuga

SORVALL RC5C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 20ml de tampão de lise (10mM de fosfato de sódio, pH 7,0, 30mM de NaCl, 0,25% de Tween-20, 10mM de 2-mercaptoetanol, 10mM de EDTA, 10mM de EGTA), aos quais foram adicionados, imediatamente antes do uso, 10mM de DTT e inibidores de proteases: 0,5mM de PMSF, 20µg/ml de aprotinina e 1mM de benzamidina. As células foram lisadas, em gelo, por ultrasonicação (15 pulsos de 30 seg), em um aparelho Virsonic Cell Disrupt modelo 150, com 60 ciclos, utilizado na intensidade 60. Retirou-se amostra de 50µl, acrescentando 50µl de água deionizada, 10mM de DTT e 50µl de STOP, fervendo-a por 5 min para SDS-PAGE ("lisado total").

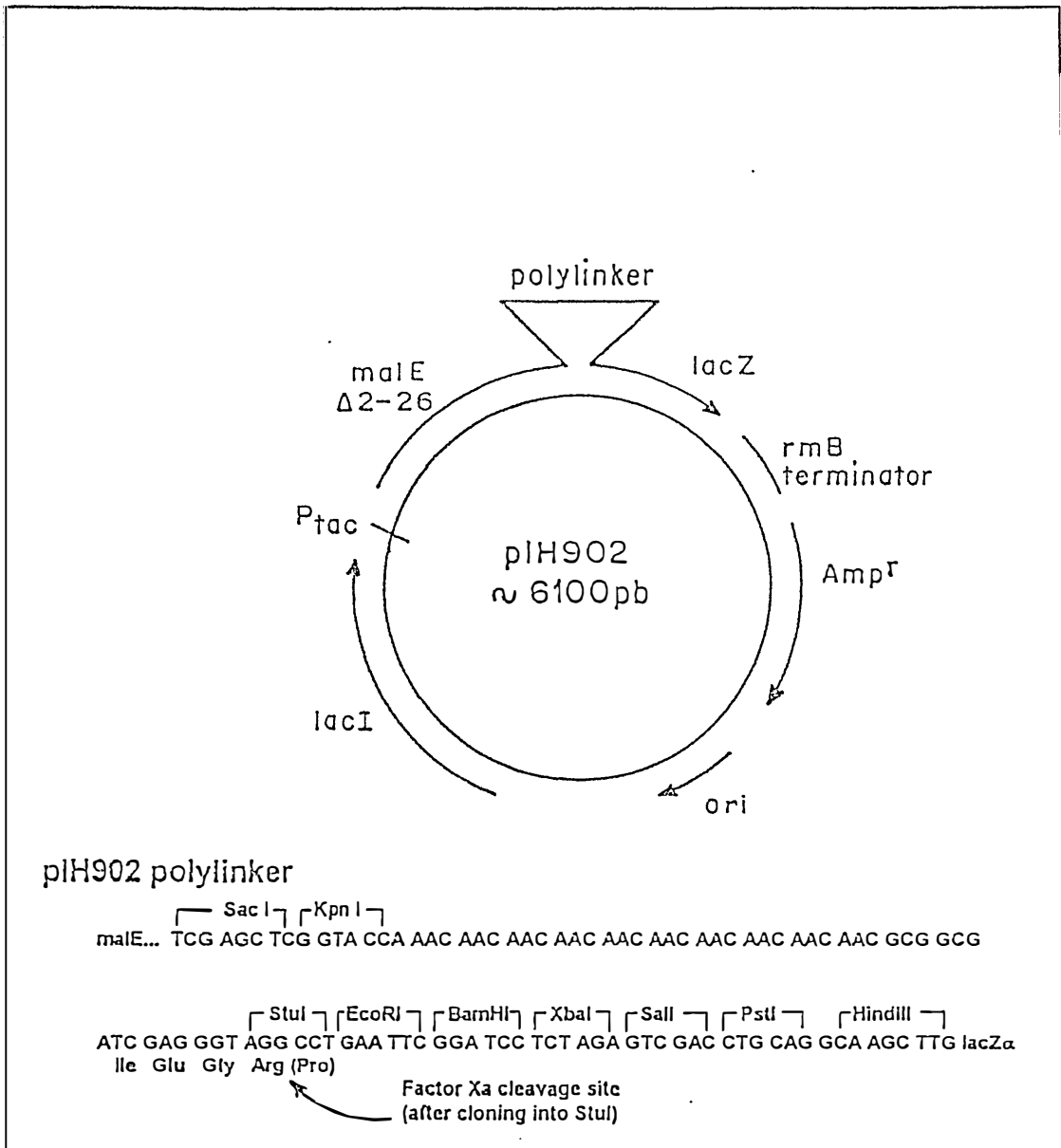


Figura 3. Diagrama esquemático do vetor de expressão pIH902 e seu “polylinker”.

Após a ultrasonicação, centrifugou-se o lisado a 15000 x g por 30 min. Coletou-se o sobrenadante ("S1"), retirando amostra de 50µl, que foi preparada para SDS-PAGE, como descrito acima, sendo o precipitado ("P1") ressuspendido no volume original em tampão de lise com 10mM de DTT e inibidores, e preparada amostra para SDS-PAGE.

## **II.2. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO POR CROMATOLOGRAFIA DE AFINIDADE**

A uma coluna de vidro, 2,5 x 10cm, contendo 20ml de resina de amilose, equilibrada em tampão de coluna (10mM de fosfato de sódio, pH 7,0, 500mM de NaCl, 1mM de EGTA e 0,2 mM de NaN<sub>3</sub>), foi adicionado o sobrenadante da expressão (S1), à temperatura ambiente. Foram coletadas frações de 2ml, e observado o perfil cromatográfico, medindo A<sub>280</sub> em espectrofotômetro HITACHI U2000. A coluna foi lavada com 60ml de tampão de coluna contendo 0,25% de Tween-20 e com 100ml do mesmo tampão sem o detergente.

A eluição foi procedida com 15mM de maltose em tampão de coluna, contendo 10mM de DTT, coletando frações de 2ml. Essas frações foram coletadas até A<sub>280</sub>  $\cong$  0,00, significando que toda a proteína de fusão foi eluída.

## Esquema da Expressão e Purificação da Proteína de Fusão

10ml LB/Amp(100µg/ml);Tetr(12,5µg/ml);Glicose(0,2%) pH 7,5 37°C ~ 14h

1l LB/Amp(100µg/ml);Tetr(12,5µg/ml);Glicose(0,2%) pH 7,5 37°C

SDS-PAGE  
(cél. não induzidas)  $DO_{600nm} \cong 0.5$

adicionar IPTG para 0.3mM

SDS-PAGE  
(cél. induzidas) 2h 37°C

resfriar em banho de gelo ~ 30 min.

centrifugar a 4.000 x g por 15 min.

S  
descartar

ressuspender em 20ml de tampão de lise (fosfato 10mM pH 7,0/  
NaCl 30mM/Tween-20 0,25%/2-mercaptoetanol 10mM/DTT 10mM/  
EGTA 10mM/ aprotinina 20µg/ml/benzamidina 1mM/PMSF 0,5mM

lise por ultrasonicação SDS-PAGE (lisado total)

centrifugar a 15.000 x g por 30 min.

S P SDS-PAGE

COLUNA DE AMILOSE equil. em tampão fosfato 10mM pH 7,0/  
NaCl 0,5M/2-mercaptoetanol 10mM/EGTA 1mM

lavar com 3 vol. tampão de coluna/Tween-20 0,25%

lavar com 5 vol. tampão de coluna sem Tween-20

eluir com tampão de coluna/maltose 15mM/DTT 10mM

SDS-PAGE

$DO_{280nm}$

## II.3. CLIVAGEM DA PROTEÍNA DE FUSÃO

A proteína de fusão, após purificação, foi dialisada contra 20mM de Tris-HCl, pH 8,0, 250mM de NaCl, 2mM de CaCl<sub>2</sub>, 10mM de DTT, preparando-a para posterior clivagem com o fator Xa de coagulação bovina. A dosagem da proteína de fusão foi realizada 3 vezes, observando que a mesma estava numa concentração de 0,087mM. Para clivagem, utilizou-se o fator Xa da New England Biolabs 1mg/ml, na concentração de 0,017mM.

Digeriu-se a proteína de fusão (PLM- pescoço) com o fator Xa numa razão molar enzima:substrato de 1:100 a 25°C, durante 90 min. A reação foi interrompida com 0,5 volume de tampão STOP, sendo o resultado analisado por SDS-PAGE, 15%.

## II.4. CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO

### II.4.1. “Overlay” com Calmodulina-biotinilada (CaM-biotina)

Após SDS-PAGE-10%, a proteína de fusão foi transferida por eletroforese para o filtro de nitrocelulose, seguindo o método de Towbin et al., 1979. Incubou-se por 2 horas com 5% de leite desnatado em 50mM de Tris-HCl, pH 7,5, 0,2M de NaCl, 0,5mM de CaCl<sub>2</sub>, 5mM de MgCl<sub>2</sub> (TBS-CaMg), para bloquear sítios inespecíficos. Após remoção desta solução, foi adicionado 1µg/mg de CaM-biotina no mesmo tampão (TBS-CaMg), deixando incubar por 2 horas a 25°C. Removeu-se a CaM-biotina lavando 2 x 10 min. com TBS-CaMg contendo 0,05% de Tween-20. O filtro foi incubado com 1:2000 de estreptavidina- fosfatase alcalina em TBS-CaMg por 30 min, na proporção 1:2000. Lavou-se 3 x 15 min. com TBS-CaMg e 1 x 15 min com 100mM de Tris-HCl, pH 9,5, 100mM de NaCl, 5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5mM de CaCl<sub>2</sub>. A revelação foi efetuada incubando o filtro, durante 30 min, com 0,33mg/ml de NBT e 0,165mg/ml de BCIP no tampão acima.

Para o ensaio sem Ca<sup>2+</sup> foi realizado o procedimento com as mesmas soluções, exceto que o CaCl<sub>2</sub> foi substituído por 1mM de EGTA.

#### II.4.2. Precipitação da Proteína de Fusão com CaM acoplada a Sepharose-4B

Incubou-se a proteína de fusão, dialisada contra 50mM de Tris-HCl, pH 7,5, 10mM de DTT, à temperatura ambiente por 3 horas, com 50µl de resina calmodulina-sepharose 4B (CAC), preparada de acordo com o protocolo descrito pela Pharmacia. A reação foi realizada sob quatro condições: com 1mM de EGTA; com 1mM de EGTA e 200mM de NaCl; com 1mM de Ca<sup>2+</sup> livre; e com 1mM de Ca<sup>2+</sup> livre e 200mM de NaCl.

Após o período de incubação retirou-se amostra da mistura total para SDS-PAGE e, em seguida, centrifugou-se por 30 seg numa microcentrífuga, recolhendo o sobrenadante e preparando-o para SDS-PAGE. O precipitado foi lavado 3 vezes com o tampão usado na diálise acima, numa das 4 condições de incubação, ressuspendendo-o no mesmo tampão, sendo posteriormente preparado para SDS-PAGE. O resultado foi analisado em gel de poliacrilamida-10%.

### II.4.3. Recaptação do Complexo da Proteína de Fusão com “Magnespheres”

Incubou-se a proteína de fusão (item II.4.2), por 3 horas à temperatura ambiente, com 20µg/ml de calmodulina-biotinilada, 200mM de NaCl, 10mM de DTT e 1mM de EGTA. Foram adicionados 200µl de esferas magnéticas contendo estreptavidina acoplada (“Magnespheres” - PROMEGA), lavadas previamente com o mesmo tampão da proteína de fusão, incubando por 2 horas à temperatura ambiente. Após o período de incubação, colocou-se o meio num campo magnético, por 3 min, propiciando a separação entre o sobrenadante e as esferas magnéticas. O sobrenadante foi recolhido e preparado para análise em gel de SDS-PAGE 10%. O recaptado foi lavado 3 vezes e ressuspendido no tampão usado na diálise acima, sendo analisado em gel de SDS-PAGE 10%. O mesmo experimento foi realizado substituindo o EGTA do meio por 1mM de Ca<sup>2+</sup> livre.



## II.5. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Foi realizada a dosagem de proteínas de todas as frações coletadas durante a cromatografia, a 280nm, utilizando um espectrofotômetro HITACHI U2000. A concentração de proteína nas frações eluídas foi determinada pelo método de Bradford (1976), com leitura a 595nm, sendo utilizada soroalbumina bovina (BSA) como padrão. A curva foi padronizada com as concentrações de 0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0 e 12,0µg/ml.

## II.6. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Para análise do perfil proteico, eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada em condições desnaturantes (com SDS), sendo utilizado o sistema tampão descontínuo descrito por Laemmli (1970) e Laemmli e Favre (1973) e o sistema de placas empregado por Studier (1973).

Os mini-géis possuíam dimensões de 10 x 9 x 0,05cm, sendo utilizados nas concentrações de 10% ou 15%, ou gradientes de acrilamida: contendo um gel de empilhamento a 4% e um gel de separação de 5 a 16%.

Os polipeptídeos foram corados por Coomassie Brilliant Blue R 0,25% em metanol 50%, ácido acético 10% (Laemmli, 1970), por 20 min. A descoloração foi realizada com etanol 30% e ácido acético 10% e posteriormente com ácido acético 7%.

Foram usados os seguintes padrões: cadeia pesada da miosina de músculo de coelho (200kDa),  $\beta$ -galactosidase de *E. coli* (116kDa), fosforilase b de músculo de coelho (97kDa), albumina bovina (66kDa), ovoalbumina (45kDa) e anidrase carbônica de eritrócito bovino (29kDa).

## II.7. “WESTERN-BLOT”

Polipeptídeos separados por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS foram transferidos para filtros de nitrocelulose (Towbin, 1979). Inicialmente, o gel foi lavado com tampão de eletro-blot (25mM de tris-HCl, pH 8,3, 192mM de glicina e 20% de metanol). Foi montado o seguinte “sanduíche”, após a lavagem:

- suporte plástico;
- esponja “scotch-brite”;
- duas camadas de papel de filtro;
- gel;
- filtro de nitrocelulose;
- duas camadas de papel de filtro;
- esponja “scotch-brite” e
- suporte plástico.

Este sanduíche foi colocado na cuba para transferência, com o filtro de nitrocelulose posicionado no lado do anodo.

Foi aplicada uma diferença de potencial de 30V por 2 horas. Após a transferência, o filtro de nitrocelulose foi corado com Ponceau S 0,5% em ácido tricloroacético 3% por 5 min, e posteriormente lavada com água deionizada.

## RESULTADOS

### III. RESULTADOS

#### III.1. EXPRESSÃO DO DOMÍNIO PESCOÇO EM FUSÃO COM A PLM

A figura 4 demonstra o perfil eletroforético da expressão em *E. coli* da proteína de fusão PLM-pescoço.

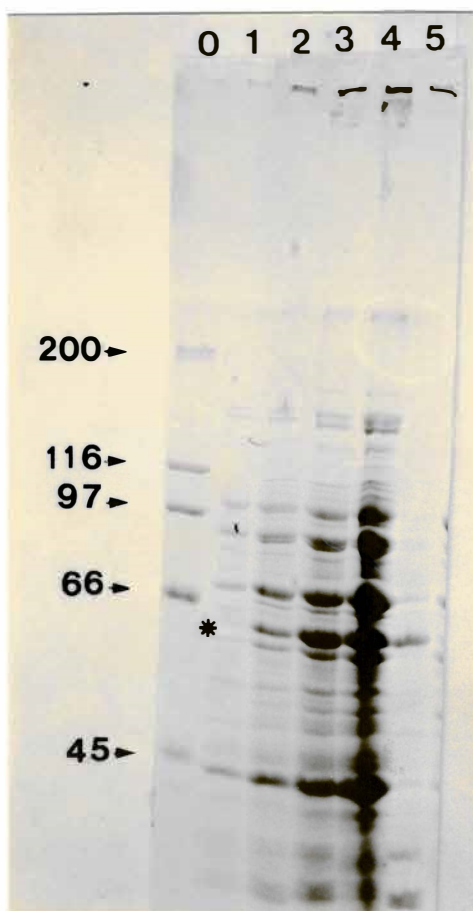


Figura 4. Expressão da proteína de fusão PLM-pescoço. - Gel de poliacrilamida 10% corado com Coomassie blue mostrando etapas da expressão da proteína de fusão. As raias contêm: marcadores de peso molecular (0); células não induzidas (1); células induzidas (2); células após ultrasonicação (3); S1 - sobrenadante após lise e centrifugação (4); P1 - precipitado após lise e centrifugação (5). \* - indica a proteína de fusão, nas raias 2-5.

Foi observado na figura 4, quando comparou-se o homogeneizado das células não induzidas com as células induzidas que obteve-se um bom nível de expressão. A proteína de fusão possui em seu N-terminal a PLM e no C-terminal o domínio pescoço da miosina-V, seguido do fragmento  $\alpha$  da  $\beta$ -galactosidase, apresentando um peso molecular aproximado de 62kDa. Observa-se um bom nível de expressão da proteína de fusão após indução e que não houve expressão antes da adição de IPTG. A amostra para SDS-PAGE das células lisadas foi diluída com 1 vol, portanto aparece menos concentrada no gel, mostrando assim menos proteínas que o sobrenadante final (S1). A análise das amostras do sobrenadante e precipitado da expressão após a indução, mostra que nestas condições houve razoável solubilização da proteína de fusão.

### III.2. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

A purificação da proteína de fusão foi realizada à temperatura ambiente por cromatografia de afinidade em uma coluna de amilose, verificando uma ligação da proteína à resina. Utilizou-se o sobrenadante (S1) obtido após expressão. A figura 5 mostra o perfil eletroforético de amostras obtidas durante o processo de purificação da proteína de fusão. A análise das frações coletadas da coluna, pela leitura a 280nm, é mostrada na figura 6.

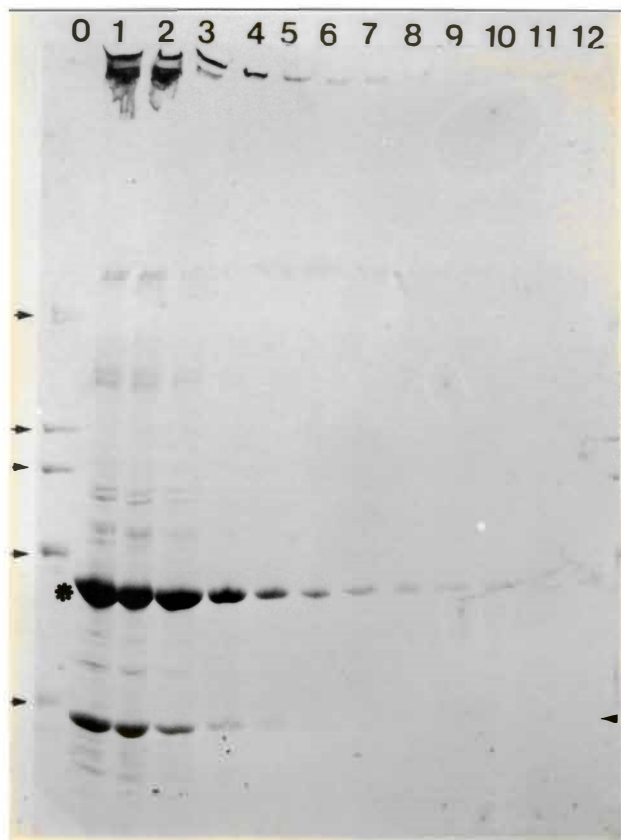


Figura 5. Purificação da proteína de fusão PLM-pescoço. - Gel de poliácridamida 10% corado com Coomassie blue mostrando frações eluídas da coluna de amilose durante purificação da proteína de fusão. As raias contêm: marcadores de peso molecular (0); raias 1 a 12, eluição da proteína de fusão com maltose 15mM.. \* indica proteína de fusão PLM-pescoço. A seta localizada à direita indica provavelmente a PLM (liberada após degradação da proteína de fusão durante os procedimentos de lise e purificação).

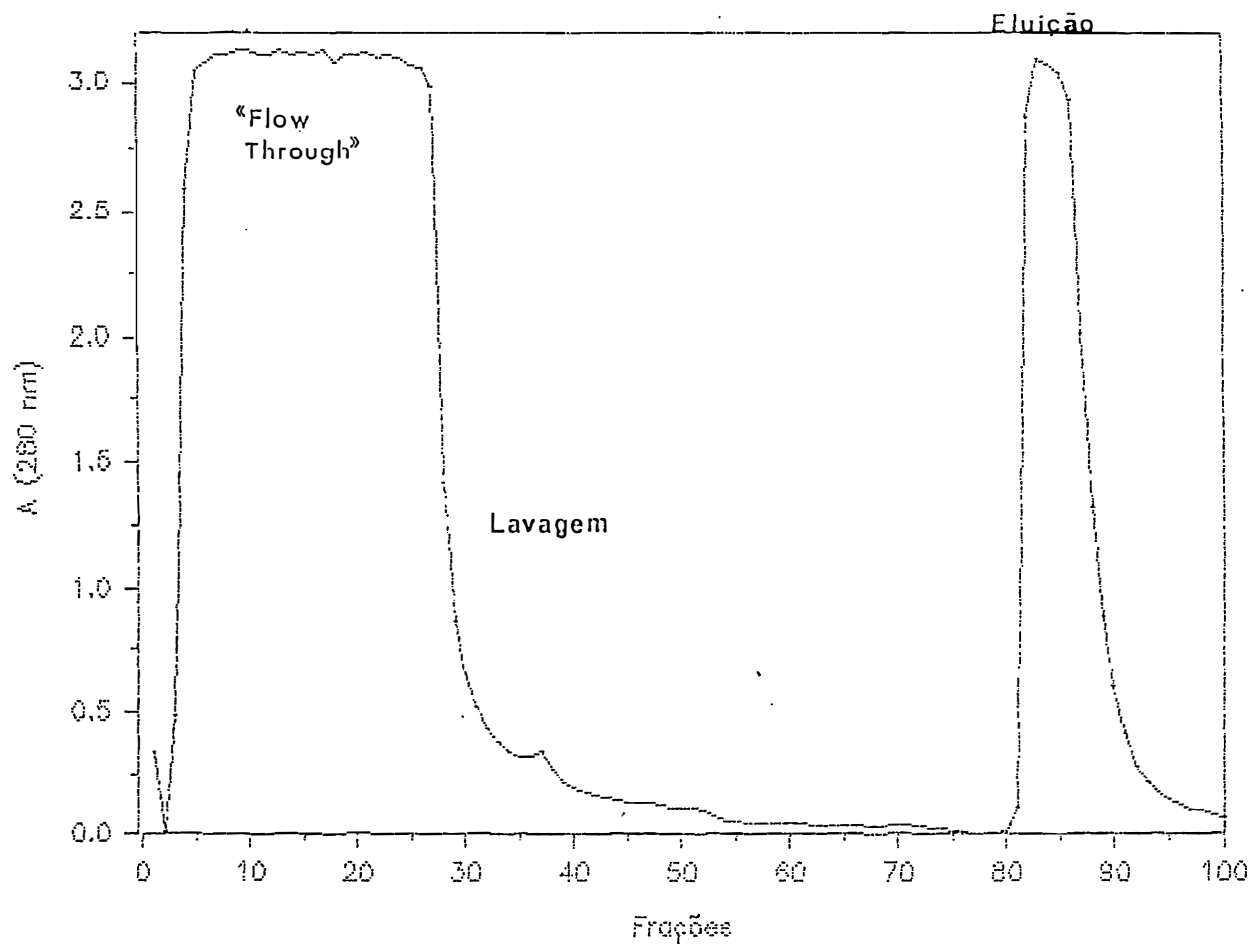
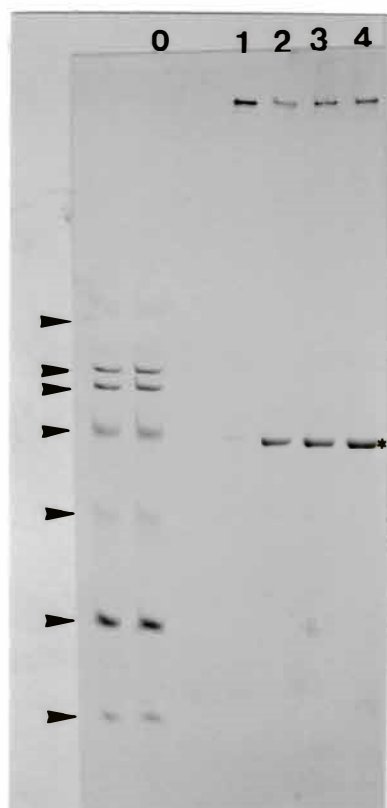


Figura 6. Leitura a 280nm das frações obtidas da cromatografia em coluna de amilose. "Flow through indica indica frações coletadas após aplicação da amostra, sobrenadante da expressão. A lavagem indica as frações coletadas após aplicação do tampão de coluna com ou sem tween-20. As últimas frações se referem à eluição da proteína de fusão com maltose 15mM.

Um fato observado durante a análise dos experimentos foi a grande tendência da proteína expressa agregar-se, principalmente após congelamento, retendo-se nos poços do gel de SDS-PAGE. Desta forma, a fim de obter maior rendimento, a cromatografia passou a ser realizada imediatamente após a expressão. Uma melhor solubilização da proteína expressa foi possível após adição de DTT até 10mM e calmodulina até 10µg/ml, minimizando agregação e conseqüente precipitação, conforme demonstrado na figura 7.



**Figura 7. Teste de solubilização da proteína de fusão.** - Amostras da proteína de fusão foram sujeitas a SDS-PAGE 10%, observando as seguintes condições: proteína de fusão com 1µl/ml de 2-mercaptoetanol (1); com 10mM de DTT (2); com 10mM de DTT e 100µg/ml de CaM (3); com 10mM de DTT, 100µg/ml de CaM e 0,1µM de cálcio livre. (4). \* indica a proteína de fusão e as setas à direita indicam a CaM, com diferença de migração devido ausência (3) e presença (4) de Ca<sup>2+</sup> livre. "0" e setas à esquerda indicam marcadores de peso molecular.



### III.3. CLIVAGEM DA PROTEÍNA DE FUSÃO

Algumas proteínas eucarióticas têm sido eficientemente produzidas como híbridos após fusão de seus genes com sequências que codificam genes de *E.coli*. Entretanto, proteínas híbridas não podem ser usadas em alguns estudos funcionais, a menos que a sequência proteica estudada possa ser liberada por clivagem específica.

O fator Xa é específico para o tetrapeptídeo Ile-Glu-Gly-Arg(Pro), que é raro em sequências proteicas, reconhecendo-o e clivando-o entre os aminoácidos Gly-Arg(Pro), que está presente nesta construção entre a PLM e o, pescoço- $\alpha\beta$ gal.

A proteína de fusão, após purificação na coluna de amilose, foi clivada pelo fator Xa conforme Nagai e Thogersen, 1984, liberando a PLM e o fragmento pescoço- $\alpha\beta$ gal. A PLM liberada migrou como um polipeptídeo de 45k, como esperado. O domínio pescoço, ainda em fusão na região C-terminal, com o fragmento  $\alpha$  da  $\beta$ -galactosidase, migrou na região de 30k (figura 8). Foi necessária a adição de 10mM de DTT para diminuir a agregação tanto da proteína de fusão quanto do domínio pescoço liberado após a clivagem.

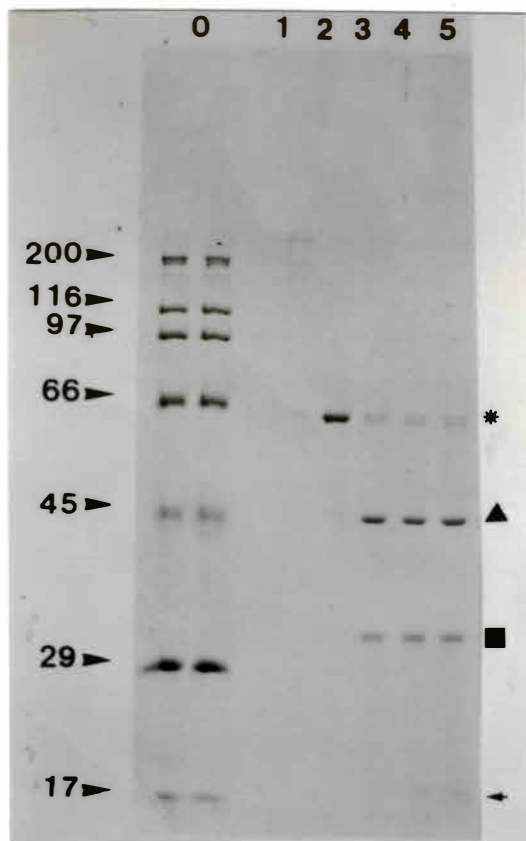


Figura 8 -Clivagem da proteína de fusão com fator Xa - Gel de poliacrilamida 10% com SDS contendo: 0,087mM da proteína de fusão sem DTT (1); 0,087mM de proteína de fusão com 10mM de DTT (2); clivagem contendo 10mM de DTT (3);clivagem contendo 10mM de DTT e 25µg/ml de CaM (4); clivagem contendo 10mM de DTT e 50µg/ml de CaM (5).(0) indica os marcadores de peso molecular.\* - Indica proteína de fusão, ▲ - PLM, ■ - pescoço- $\alpha\beta$ gal e seta a direita indica CaM.

### III.4. CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO

A caracterização imunológica do domínio pescoço expresso ficou impossibilitada neste trabalho, pois este domínio apresentou antigenicidade notavelmente baixa em coelhos, não tendo êxito na obtenção de anticorpos.

A análise da sequência do domínio pescoço utilizando o programa PC/GENE, pelo método de Hopp e Woods, onde são comparados os pontos de hidrofobicidade dos seis “motivos IQ” com um grupo de proteínas controle, demonstrou que neste domínio somente a sequência correspondente aos resíduos 904 a 909 (Lys-Arg-Glu-Leu-Lys-Lys) possui potencial para antigenicidade (Harlow e Lane, 1988).

#### III.4.1. “Overlay” com Calmodulina-biotinilada (CaM-biotina)

Para caracterização da ligação da proteína de fusão expressa à CaM foi utilizada CaM-biotinilada (GIBCO BRL) como sonda, procedendo a revelação com estreptavidina-fosfatase alcalina (GIBCO BRL), como descrito no item II.4.1 (ver Materiais e Métodos). Observou-se ligação, na ausência e presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , da proteína de fusão expressa (figura 9). Para confirmar que a ligação estava ocorrendo entre a CaM-biotinilada e o domínio pescoço da proteína de fusão e não com a PLM foi realizado um experimento controle com a PLM expressa sem fusão, onde após “overlay” nenhuma marcação foi detectada. Este resultado está de acordo com os dados apresentados por Espreafico e colaboradores (1992), em ensaios de “overlay” em gel, mostrando interação da proteína de fusão correspondente ao domínio pescoço, com  $^{125}\text{I}$ -CaM, na ausência e presença de  $\text{Ca}^{2+}$ .

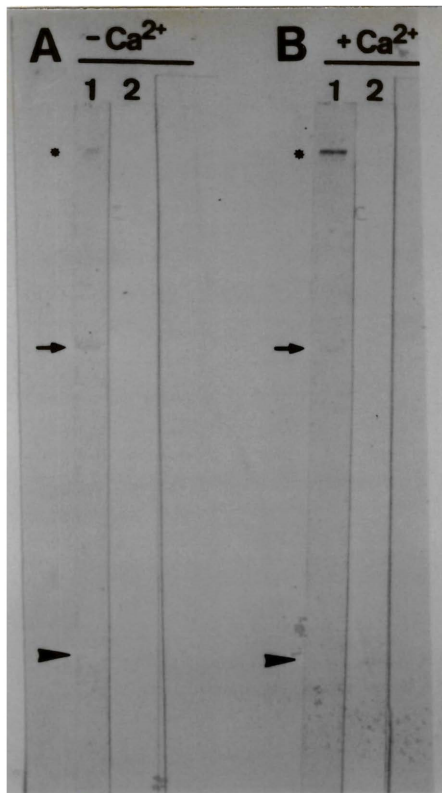


Figura 9 - "Western-blot" com CaM-biotinilada - "Overlay" das amostras purificadas da proteína de fusão (1) e PLM como controle(2) foram separadas por SDS-PAGE (gel a 10%), seguida de "western blot". Os filtros foram incubados com CaM-biotinilada na ausência (A) ou na presença de Ca<sup>2+</sup> (B) e revelados, após incubação com estreptavidina conjugada à fosfatase alcalina, utilizando os substratos NBT e BCIP. As flechas indicam a posição da proteína de fusão e as pontas de flecha, indicam a posição esperada da PLM. Os asteriscos indicam os poços do gel (mostrando agregados da proteína de fusão que não entraram no gel).

### III.4.2. Precipitação da Proteína de Fusão com CaM acoplada a Sepharose-4B

Para verificar a ligação da CaM à proteína de fusão, conservando o estado nativo, foi realizado o ensaio dos componentes em solução utilizando CaM acoplada à resina de Sepharose-4B (CAC), sendo observado o efeito do cálcio e NaCl sobre esta interação. Uma interação ligeiramente maior foi identificada entre a proteína de fusão e a CaM acoplada à resina na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 10). Com o aumento da força iônica, a interação CaM-proteína de fusão torna-se maior, mostrando-se mais efetiva na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ . Na amostra total, a proteína de fusão encontra-se mais diluída, sendo concentrada após precipitação, demonstrada na amostra "P".

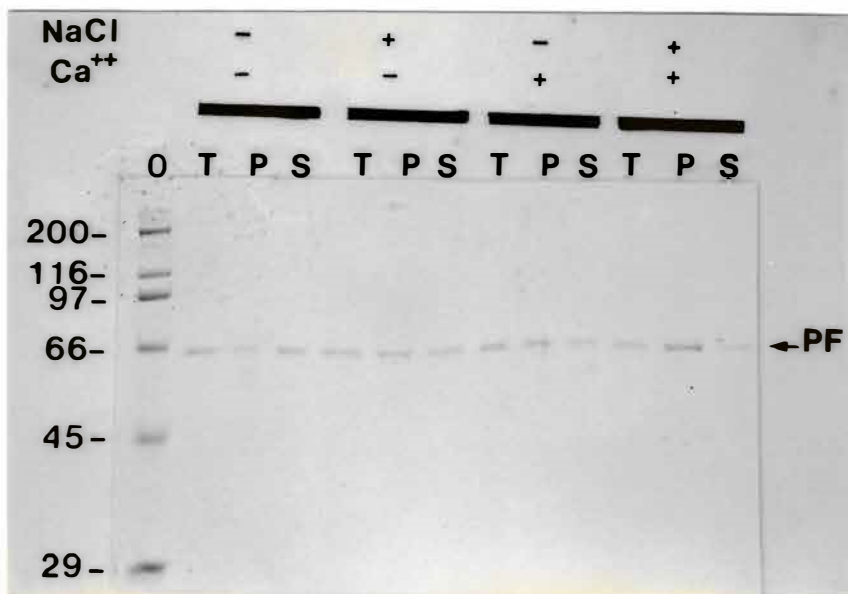


Figura 10 - Precipitação com CaM-"Sepharose-4B" - Gel de poli-acrilamida-SDS 10% contendo: total da mistura, proteína de fusão, CaM-resina (T), precipitado proteína de fusão-CaM-resina (P) e sobrenadante (S). Marcadores de peso molecular - (0). PF - indica proteína de fusão.

### III.4.3. Recaptação do Complexo da Proteína de Fusão com “Magnespheres”

Incubou-se a proteína de fusão previamente com calmodulina biotinilada e posteriormente com estreptavidina acoplada a esferas magnéticas. O resultado, após análise em SDS-PAGE, mostrou que o complexo CaM biotinilada - proteína de fusão foi detectado no recaptado, tanto na ausência quanto na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 11). A amostra total apresenta marcação menos intensa que o recaptado, pois a amostra total encontra-se mais diluída.

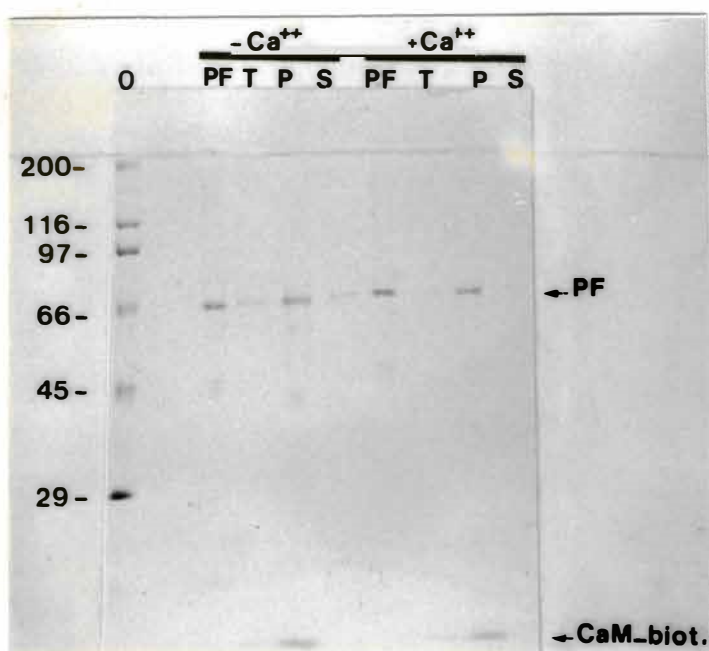


Figura 11 - Recaptação do complexo da proteína de fusão com “Magnespheres” - Gel de poliacrilamida-SDS 10% contendo: total da mistura - proteína de fusão-CaM biotinilada-estreptavidina acoplada às esferas magnéticas (T), recaptado (R) e sobrenadante (S). Marcadores de peso molecular - (0). PF - indica proteína de fusão.

## **DISCUSSÃO**

## IV. DISCUSSÃO

Neste trabalho demonstrou-se que a expressão em bactéria do domínio pescoço da miosina-V resulta na obtenção de quantidade adequada de proteína após purificação por cromatografia de afinidade, com as propriedades de ligar CaM na presença e ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  como na proteína nativa. Portanto, abre-se a possibilidade de obtenção das características físico-químicas do domínio pescoço.

Pode-se observar, comparando as amostras de células induzidas e não induzidas, que foi obtido um alto nível de expressão depois da adição do IPTG (figura 4). Analisando as amostras do sobrenadante e do precipitado, observa-se que nestas condições houve solubilização da proteína de fusão.

A expressão do domínio pescoço inicialmente foi testada utilizando a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformada com os vetores de expressão pET-3d e pET-11d (Sambrook et al., 1989); ambos contendo o fragmento H11, sem fusão com a PLM. Em SDS-PAGE não foi detectada expressão, isso se deve, talvez, por tratar-se de um peptídeo de 20kDa, pois o mesmo poderia ter sido degradado pelas proteases da bactéria, não sendo assim detectado. McNally et al., em 1991, demonstrou que fragmentos de miosinas, expressos em bactérias, são mais susceptíveis à agregação e degradação, por isso foram expressos como proteínas de fusão, para assim obter-se níveis mais elevados de proteínas, com estabilidade aumentada (se a proteína de interesse for pequena) e facilidade de purificação (Nagai e Thogersen, 1984).

Além da adição dos inibidores de proteases ao tampão de lise, utilizou-se também EGTA, para inibir proteases que utilizam o  $\text{Ca}^{2+}$  como cofator. Após a lise foi utilizado 2-mercaptoetanol para impedir a formação de pontes dissulfeto inter e intracadeia. Mesmo assim, não foi possível conseguir uma boa solubilização e a proteína de fusão ainda continuou agregada. Conseguiu-se diminuir o problema somente após adição de 10mM de DTT (figura 7), mantida durante toda a expressão, e de CaM, após a lise por ultrasonicação.

Um das possíveis causas da agregação do domínio pescoço é a característica altamente básica dos “motivos IQ”. Sabe-se que os resíduos de lisinas do colágeno podem sofrer deaminação e oxidação pela ação de lisil-oxidase e oxigênio molecular que converte os resíduos de lisina em



alisina. Posteriormente, ligações cruzadas podem formar-se por condensação aldólica, uma reação não enzimática. Os resíduos imidazólicos das histidinas também participam na formação de ligações cruzadas (Smith et al., 1985), propiciando assim a agregação, que pode ser impedida pela ação do DTT ligando com o oxigênio do meio. Sabe-se também que, com a adição de CaM, são formadas "ligações" entre a mesma e os resíduos básicos do domínio pescoço (Xie et al., 1994), estabilizando as interações entre estes resíduos básicos do "motivo-IQ".

Após a clivagem da proteína híbrida com o fator Xa de coagulação bovina (Nagai e Thogersen, 1984), foi liberado um peptídeo, correspondente ao domínio pescoço da miosina-V de cérebro de galinha, que em SDS-PAGE migrou como uma proteína de peso molecular de aproximadamente 30k (figura 8), quando deveria ter sido de 22k. É importante salientar que o domínio pescoço possui o peso molecular de 20k, contendo, na extremidade C-terminal, o fragmento  $\alpha$  da  $\beta$ -galactosidase com peso molecular de 2k.

Nota-se também a influência do DTT, diminuindo a agregação da proteína expressa, mesmo após a clivagem. Acredita-se que a agregação não seja devido a interações entre o domínio pescoço e a PLM, pois em SDS-PAGE a PLM sozinha não apresenta agregação, entrando totalmente no gel de poliácridamida.

Estudos anteriores de ligação de CaM ao domínio pescoço levaram à evidência que a miosina-V tem afinidade à CaM, na ausência ou presença de  $\text{Ca}^{2+}$  livre, ou ligeiramente maior na ausência do mesmo (Espreafico et al., 1992). Devido às propriedades ligantes de CaM da miosina-V diferirem da maioria das proteínas ligantes de CaM, há interesse em identificar e caracterizar este domínio da proteína que interage com CaM. Ensaio de "overlay" com calmodulina biotinizada e precipitações com CaM-Sepharose 4B e com o complexo CaM-biotina-estreptavidina-"magnospheres" foram usados para caracterizar a propriedade ligante de CaM do domínio pescoço da miosina-V (figuras 9, 10 e 11) sendo importante observar que o aumento da força iônica acentua a interação na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 10). Acredita-se que aumentando a força iônica, aumenta-se as interações hidrofóbicas entre os resíduos do domínio pescoço e da calmodulina (Haiech et al., 1981). Experimentos usando Ressonância Magnética Nuclear (NMR) de  $^1\text{H}$  e  $^{113}\text{Cd}$  que comparam os efeitos dos íons  $\text{Mg}^{2+}$  sobre a função da calmodulina, mostram que  $\text{Mg}^{2+}$  inibe a formação do complexo ativo  $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM, e apenas a ligação do

$\text{Ca}^{2+}$ , no domínio N-terminal da CaM, regula a atividade da proteína (Cheung, 1984; Ohki et al., 1993)

O “motivo IQ” das proteínas-alvo de CaM está frequentemente associado com a propriedade não usual de ligar CaM na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ . A calmodulina liga-se à miosina-V e permanece associada durante cromatografia de filtração em gel, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  ou EGTA (Larson et al., 1988). Em alguns casos,  $\text{Ca}^{2+}$  age liberando a CaM desses sítios (Andreasen et al., 1983; Collins et al., 1990; Swanljung-Collins e Collins, 1991), que é exatamente o oposto esperado para um sítio convencional ligante de calmodulina dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Experimentos com outra miosina da classe V, **Myo2p** de levedura, evidenciam que o  $\text{Ca}^{2+}$  induz a liberação de calmodulinas da região pescoço da proteína (Brocherhoff et al., 1994).

Uma questão intrigante é saber porque Myo-V contém seis “motivos- IQ”. Recentemente, foi sugerido que as miosinas, que ligam CaM, devem ter como função geral o transporte de calmodulina para localizações subcelulares específicas (Porter et al., 1993). Experimentos com Myo2p (Brockerhoff et al., 1994) sugerem que a calmodulina participa no crescimento polarizado da levedura por interação direta com esta miosina. Assim, a Myo2p e CaM são necessárias para o crescimento polarizado em leveduras (Davis et al., 1986; Johnston et al., 1991), localizando-se nos sítios germinantes durante o ciclo celular (Brockerhoff et al., 1994)

A elucidação dos fatores estruturais responsáveis pela habilidade da calmodulina modular a atividade de proteínas-alvo tem sido possível graças ao conhecimento das estruturas tri-dimensionais destas proteínas (Meador et al., 1992; Rayment et al., 1993). Calmodulina, apesar de ser uma proteína ácida, contém vários resíduos hidrofóbicos que ficam expostos após ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  (Erickson-Viitanen e DeGrado, 1987; O’Neil e DeGrado, 1990). O domínio pescoço da miosina-V contém aproximadamente 47% de resíduos hidrofóbicos e 30% de básicos; seguindo o padrão geral de peptídeos ligantes de CaM e cadeias leves, que são básicos com  $\alpha$ -hélices anfífilas. Estudos com NMR, determinando a estrutura quaternária do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-peptídeo M13, o qual correspondente ao domínio ligante de calmodulina da quinase de cadeia leve de miosina-II de músculo esquelético (Ikura et al., 1992) mostraram que o peptídeo liga CaM numa conformação em  $\alpha$ -hélice. A CaM, em solução, assume uma estrutura em forma de “duplo-sino”, com quebra da

hélice central, formando um bolso predominantemente hidrofóbico, à medida que se aproxima do peptídeo-alvo (Crivici e Ikura, 1995). A ligação ocorre de maneira anti-paralela. Segundo Xie e colaboradores, 1994, entre a cadeia pesada do fragmento cabeça de miosina-II de molusco de concha e as cadeias leves há 413 contatos, sendo que destes 9% são ligações de hidrogênio e 88% são interações de van der Waals. A cadeia pesada é altamente hidrofóbica, possuindo 3 resíduos ácidos que não estão envolvidos em ligações com a cadeia leve. Em contraste 7 a 16 resíduos básicos fazem ligações de hidrogênio ou ligações salinas com as cadeias leves

Torna-se com isto interessante o conhecimento da estrutura tridimensional do complexo CaM e/ou cadeias leves-pescoço da miosina-V, na presença ou ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ , para podermos elucidar questões como estas que constantemente vão surgindo: qual será a natureza, real localização e papel das cadeias-leves/calmodulinas? Qual será o papel do  $\text{Ca}^{2+}$  no complexo CaM-pescoço? Quais dos “motivos IQ” ligam calmodulina e/ou cadeias leves? Ou seja, qual será a real estequiometria? Estas e outras perguntas serão solucionadas em estudos futuros, com o uso de técnicas combinadas de biologia molecular, biofísica e bioquímica, para definir o papel da CaM, cadeias leves e  $\text{Ca}^{2+}$  na regulação das funções da miosina-V, contribuindo para o estudo do movimento dirigido, uma característica essencial dos organismos vivos.

## SUMÁRIO

## V. SUMÁRIO

Miosina-V é uma miosina ligante de calmodulina não convencional enriquecida em cérebro, que está provavelmente envolvida no transporte de vesículas em neurônios e células gliais. Análise bioquímica e estrutural mostrou que esta miosina é composta por 3 grandes domínios: um domínio cabeça-motor, uma região pescoço e uma cauda com regiões em “coiled-coil” e globulares. O domínio pescoço, entre os resíduos 765 e 909, contém uma série de seis repetições imperfeitas de aproximadamente 23 aminoácidos que são ricas em resíduos hidrofóbicos e básicos e apresentam a sequência consenso **IQXXXRGXXXRXXY**, denominada “**motivo IQ**”. Estas repetições são similares ao sítio ligante de calmodulina da neuromodulina e as repetições presentes na junção cabeça-cauda da miosina-I de borda em escova. Ambas as proteínas e miosina-V ligam calmodulina de maneira independente de  $\text{Ca}^{2+}$ . O “motivo-IQ” também está presente em todas as outras miosinas conhecidas, na região correspondente aos sítios ligantes de cadeias leves. Recentemente, as estruturas tridimensionais da região ligante de cadeias leves da miosina-II de músculo esquelético de galinha e de molusco de concha foram resolvidas, demonstrando que o “motivo-IQ” é o sítio de ligação das cadeias leves essencial e regulatória.

O presente trabalho resultou na expressão em *E. coli* do domínio pescoço em fusão com a proteína ligante de maltose e sua purificação através de cromatografia de afinidade, utilizando uma resina de CaM acoplada à sepharose 4B. Observou-se ligação da proteína de fusão à calmodulina na ausência e presença de  $\text{Ca}^{2+}$ . Entretanto, uma ligação mais forte ocorreu na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e alta força iônica. A ligação com ou sem  $\text{Ca}^{2+}$  foi confirmada usando os ensaios de “overlay” com CaM-biotinilada como uma sonda e estreptavidina conjugada a fosfatase alcalina como sistema de detecção. Também o complexo formado entre o pescoço expresso e a calmodulina biotinilada em solução foi capturada por esferas magnéticas ligadas a estreptavidina na presença e ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ . Foi possível clivar a proteína de fusão, utilizando o fator Xa de coagulação bovino, liberando o domínio pescoço livre da PLM.

## **SUMMARY**

## VI. SUMMARY

Myosin-V is a member of a novel structural class of unconventional myosins. This protein was first identified as a calmodulin-binding protein abundantly expressed in brain tissue and seems to play a role in the vectorial transport of vesicles in neurons and glial cells. Biochemical and structural analysis has shown that myosin-V has three principal domains: a motor domain (head), a neck domain and a tail domain with coiled-coil and globular regions. The neck domain (aa 765-909) contains six copies of the consensus sequence known as the IQ-motif which has the pattern **IQxxxRGxxxRxxY**. These repeats are similar to the calmodulin binding site of neuromodulin, and to the repeats present in the head-tail junction of brush border myosin-I. Both of these proteins and myosin-V have been shown to bind calmodulin in a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent manner. This sequence is also present in all other myosins, in the region corresponding to the light chain binding sites. Recently, studies on the structure of the regulatory domains of chicken skeletal and scallop myosins-II demonstrated that the IQ motif is part of the binding site for the essential and regulatory light chains.

This work presents the expression in *E. coli* of the neck domain in fusion with maltose binding protein and purification by affinity chromatography, allowing for the obtention of sufficient amounts of protein to characterize its binding to calmodulin. Using a resin of calmodulin conjugated to Sepharose 4B, we observed binding of the fusion protein to calmodulin in the absence or presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . However a stronger binding occurred in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and high ionic strength. This interaction with or without  $\text{Ca}^{2+}$  was confirmed by overlay assays using biotinylated CaM as a probe and streptavidin conjugated to alkaline-phosphatase as a detection system. Also, the complex formed between the expressed neck and biotinylated CaM in solution was captured by streptavidin coated magnetic beads in the presence and absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . It was possible to cleave the fusion protein, using the bovine plasma factor Xa, liberating the neck domain.

## **BIBLIOGRAFIA**



## VII. BIBLIOGRAFIA

- Alexander, K.A., Wakim, B.T., Doyle, G.S., Walsh, K.A., & Storm, D.R. (1988). Identification and characterization of the calmodulin-binding domain of neuromodulin, a neurospecific calmodulin-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **263**: 7544-7549.
- Andreasen, T.J., Luetje, C.W. Heideman, W. & Storm, D.R. (1983) Purification of a novel calmodulin binding protein from cerebral cortex membranes. *Biochemistry* **22**: 4615-4618.
- Bainbridge, K.G., Celio, M.R. & Rogers, J.H. (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system. *TINS*, **15**: 303-308.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brady, S.T. (1991). Molecular motors in the nervous system. *Neuron*, **7**:521-533.
- Brockerhoff, S.E., Stevens, R.C. & Davis, T.N. (1994). The unconventional myosin, Myo2p, is a calmodulin target at sites of cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **124**: 315-323.
- Chaussepied, P., Mornet, D., Audermard, E., Kassab, R., Gooddearl, A., J., Levine, B. A. & Trayer, I. (1986). Properties of the alkali light-chain -20-kilodalton fragment complex from skeletal myosin heads. *Biochem.* **25**: 4541-4547.
- Cheney, R. E., O'Shea, M. K., Heuser, J. E., Coelho, M. V., Wolenski, J. S., Espreafico, E. M., Forscher, P., Larson, R. E. & Mooseker, M. S. (1993a). Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell*, **75**: 1-20.
- Cheney, R.E. & Mooseker, M.S. (1992). Unconventional myosins. *Cur. Opin. Cell Biol.*, **4**: 27-35.
- Cheney, R.E.; Espreafico, E.M.; Larson, R.E. & Mooseker, M.S. (1991). The IQ-motif, a putative consensus sequence for calmodulin-binding sites that function in the absence of calcium, is present in many different proteins including myosins, neuromodulin, neurogranin, PEP-19, and CaVPT. *J. Cell Biol.*, **115**: 432a.
- Cheney, R.E.; Riley, M.A. & Mooseker, M.S. (1993). Phylogenetic analysis of the myosin superfamily. *Cell Motil. Cytoskel.*, **24**: 215-223.

- Cheung, W.Y. (1984). Activation of calmodulin by metal cations and occupancy of its metal-binding sites. *Proceedings of 9<sup>th</sup> International Congress of Pharmacology*, **2**: 303-319
- Collins, J.H. & Borysenko, C.W. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**:14128-14135.
- Collins, K., Sellers, J.R. & Matsudaria, P. (1990). Calmodulin dissociation regulates brush border myosin I (110-kD-calmodulin) mechanochemical activity *in vitro*. *J. Cell Biol.* **110**:1137-1147.
- Costa, M.C.R. (1994). Miosina-V: Expressão de Domínios Estruturais em *E. coli*, produção de anticorpos domínio-específicos e detecção de proteínas associadas. Dissertação de mestrado apresentada ao Dept. Bioquímica, FMRP XXII.
- Crivici, A. & Ikura, M. (1995). Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **24**: 85-116.
- Davis, T.N., Urdea, M.S., Masiars, F.R. & Thomer, J. (1986) Isolation of the yeast calmodulin gene: calmodulin is an essential protein. *Cell* **47**: 423-431.
- Erickson-Viitanen, S. & DeGrado, W. (1987). Recognition and characterization of calmodulin-binding sequences in peptides and proteins. *Meth. Enzymol.* **139**: 455-479.
- Espindola, F. S., Espreadico, E. M., Coelho, M. V., Martins, A. R., Costa, F. R. C., Mooseker, M. S. & Larson, R. E. (1992). Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: a novel calmodulin-binding myosin. *J. Cell Biol.* **118**: 359-368.
- Espreadico, E. M., Cheney, R. E., Matteoli, M., Nascimento, A. A. C., DE Camilli, P. V., Larson, R. E. & Mooseker, M. S. (1992). Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J. Cell Biol.* **119**: 1541-1557.
- Haarer, B. K., Lillie, S. H., Petzold, A. S. & Brown, S. S. (1992). The yeast *MYO4* gene encodes a type V myosin similar to the *MYO2* gene product. *Molec. Biol. Cell* **3** (supplement): 42a.
- Haiech, J., klee, C.B. & Demaille, J. G. (1981). Effects of cations on affinity of calmodulin for calcium: ordered binding of calcium ions allows the specific activation of calmodulin-stimulated enzymes. *Biochem.* **20**: 3890-3897.

- Hammer, J.A. (1994) The structure and functional of unconventional myosins: a review. *J. Musc. Res. Cell Mot* **15**:1-10.
- Harlow, E. & Lane, D. (1988) Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory
- Ikura, M. e Bax, A. (1992) *J.Am.Chem Soc.*, **114**: 2433-
- Ikura, M., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Zhu, G, Klee, C.B & Bax, A. (1992). Solution Structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science*, **256**: 632-638.
- Johnston, G. C., Prendergast, J. A. & Singer, R. A. (1991). The *Saccharomyces cervisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J. Cell Biol.* **113**: 539-551.
- Kinkema, M. & Schiefelbein, J. (1993). Molecular characterization of an unconventional myosin gene from *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell Biol.*, no prelo.
- Korn, E.D. & Hammer, J.A. (1988). Myosins of nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, **17**: 23-45.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laemmli, U. K. & Favre, M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **80**: 575-599.
- Larson, R. E. , Pitta, D. E. & Ferro, J. A. (1988). A novel 190 kDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **21**: 213-217.
- Larson, R. E., Espindola, F. S. & Espreafico, E. M. (1990). Calmodulin-binding proteins and calcium/calmodulin-regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. *J. Neurochem.* **54**: 1288-1294.
- Larson, R.E., (1996). Myosin-V: a novel class of unconventional myosins. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*(no prelo).
- Matsumoto, H.; Isono, K.; Pye, Q. & Pak W.L. (1984) Gene encoding cytoskeletal proteins in Drosophila rhabdomeres. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 985-9
- McNally, E., Sohn, R., frankel, S. & Leinwand, L. (1991). Expression of myosin and actin in *E. coli*. *Methods Enzimol.* **196**: 368-379.
- Meador, W.E., Means, A.R. & Quioco, F.A. (1992) Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 Å structure of a calmodulin-peptide complex. *Science*, **257**: 1251-1255.

- Meador, W.E., Means, A.R. & Quioco, F.A. (1993) Modulation of calmodulin plasticity in molecular recognition on the basis of X-ray structures. *Science*, **262**: 1718-1721.
- Mercer, J. A., Seperack, P. K., Strobel, M. C., Copeland, N. G. & Jenkins, N. A. (1991). Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat color locus. *Nature* **349**: 709-713; 352: 547.
- Montell, C. & Rubi, G. (1988). The *Drosophila* ninaC locus encodes two photoreceptor cell specific proteins with domains homologous to protein kinases and the myosin heavy chain head. *Cell* **52**:757-762.
- Mooseker, M. (1993). A Multitude of myosins. *Current biology* **3**(4): 245-248.
- Mooseker, M. & Cheney, R.E. (1995) Unconventional myosins. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **11**:633-675.
- Nagai, K. & Thogersen, H.C. (1984) Generation of  $\beta$ -globulin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. *Nature*, **309**: 810-812.
- O'Neil, K.T., & DeGrado, W.F. (1990). How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic alpha-helices. *Trends Biochem. Sci.*, **15**: 59-64.
- Ohki, S., Iwamoto, U., Aimoto, S., Yazawa, M. & Hikichi, K. (1993).  $Mg^{2+}$  inhibits formation of  $4Ca^{2+}$ -calmodulin-enzyme complex at lower  $Ca^{2+}$  concentration. *J. Biol. Chem.*, **268**: 12388-12392.
- Pollard, T.D.; Doberstein, S.K. & Zot, H.G. 1991. Myosin I. *Annu. Rev. Physiol.*, **53**:653-681.
- Porter, J., Kreuz, A. & Montell, C (1994). Calmodulin localization and retinal function requires interaction between the ninaC unconventional myosin and both calmodulin binding sites. *Mol. Biol. Cell* **5**:278a
- Protein fusion and purification system. Directions for expression and purification of proteins from cloned genes. New England Biolabs. 1-27.
- Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G. & Holden, H. M. (1993). Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* **261**: 50-58.
- Rechsteiner, M. (1990) PEST sequences are signals for rapid intracellular proteolysis. *Sem in Cell Biol* **1**:433-440.

- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>a</sup> ed., New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman I.R., Lefkwowitz, R.J., Handler, P. & White, A. 1985. *Bioquímica Mamíferos*, 7<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, p.193-195.
- Studier, F.W. (1973). Analysis of Bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J.Mol.Biol.* **79**: 237-248.
- Swanlung-Collins, H. & Collins, J. H. (1991). Ca<sup>2+</sup> stimulates the Mg<sup>2+</sup> - ATPase activity of brush border myosin I with three or four calmodulin light chains but inhibits with less than two bound. *J. Biol. Chem.* **266**: 1312-1319.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- Xie, X., Harrison, D.H., Schlichting, I., Sweet, R.M., Kalabokis, V.N., Szent-Györgyi, A.G. & Cohen, C. (1994). Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2,8 Å resolution. *Nature*, **368**; 306- 312.