

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Instituto de Bioquímica Médica

Laboratório de Química Fisiológica da Contração Muscular

EFEITO DO FENOL NA INTERAÇÃO ACTO-S1

Luciana Elena de Souza Fraga Machado

**Rio de Janeiro
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Luciana Elena de Souza Fraga Machado

EFEITO DO FENOL NA INTERAÇÃO ACTO-S1

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Química Biológica).

Prof Martha M. Sorenson

Orientadora

Professora Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/ICB/UFRJ

Prof Verônica Salerno Pinto

Co-orientadora

Professora Adjunto da Escola de Educação Física e Desportos

Rio de Janeiro

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

MACHADO, Luciana Elena de Souza Fraga

EFEITO DO FENOL NA INTERAÇÃO ACTO-S1

Tese (Mestrado em Química Biológica)

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Bioquímica Médica, 2009

Orientadoras: Verônica Salerno e Martha Meriwether Sorenson

Nº de folhas: 97

Dissertação: Mestrado em Química Biológica

1 – Actina

2 – Fenol

3 – Cinética Enzimática

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luciana Elena de Souza Fraga Machado

EFEITO DO FENOL NA INTERAÇÃO ACTO-S1

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 2009.

Banca Examinadora:

.....
Prof^a. Martha M. Sorenson
Professora Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica/ICB/UFRJ
Orientadora

.....
Prof^a. Verônica Salerno Pinto
Professora Adjunta da Escola de Educação Física e Desportos/CCS/UFRJ
Co-orientadora

.....
Prof. Luis Mauricio Trambaioli da Rocha e Lima
Professor Adjunto do Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia

.....
Prof. Jose Roberto Meyer Fernandes
Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica

.....
Prof^a. Lucia Moreira Campos Paiva
Professor Adjunto do Instituto de Química

.....
Prof. Yraima Moura Lopes Cordeiro
Professor Adjunto do Departamento de Fármacos
Suplente Externo

.....
Prof. Helena Scofano
Professor Emérito Instituto de Bioquímica Médica
Revisora e Suplente Interno

AGRADECIMENTOS

À Professora Martha Sorenson pela orientação, paciência, super dedicação.

À Professora Verônica Salerno na co-orientação.

À Professora Helena Scofano pela revisão da tese.

Ao Professor Marcius pela revisão dos dados de RMN.

Ao Professor Hector Barrabin por gentilmente ter cedido o uso do Stopped-flow em seu laboratório e posteriormente para o laboratório da Prof. Martha Sorenson.

Ao Prof Maurício Trambaioli por gentilmente ter cedido o uso do Espectrofluorímetro.

Ao Professor Fábio Almeida e Professora Ana Paula Valente por permitir o uso do RMN, e pela paciência de ensinar a usar o aparelho de RMN.

Ao Professor Fábio Almeida por auxiliar a analisar os dados obtidos, e corrigir os dados de RMN da minha tese.

Ao Professor Roy Larson da USP de Ribeirão Preto por ter permitido utilizar o stopped flow.

Ao Professor Enrique De La Cruz por auxiliar na análise de alguns dados de cinética e nas dúvidas do protocolo de marcação da actina com pireno.

Aos amigos do Laboratório pela amizade e a grande família que se formou:

Marcelo que me iniciou nos caminhos da prática laboratorial de Bioquímica.

Raquel que me inseriu e auxiliou inicialmente no projeto com fenol.

Débora pela preparação das proteínas S1 e pó da actina e outras coisicas a mais.

Daniel (expert em cinética) por auxiliar no uso do stopped flow e na análise dos dados de cinética.

Ao Leandro, Renato, Tiago, Jamila e Cícero.

À minha mãe Bárbara e ao meu irmão Guilherme por proporcionar minha volta para o Rio e por me apoiaram durante todo este tempo.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt

ABREVIações

A	Actina
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BTS	<i>N</i> -benzyl- <i>p</i> -toluenesulfonamide
DOSY	Coeficiente de Difusão Translacional
DMF	Dimetilformamida
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	Ácido etileno-glicol-bis (β -aminoetil-éter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetracético
HSQC	Espectroscopia de Correlação Heteronuclear de um Quantum
HEPES	Ácido <i>N</i> -[2-hidroxietilpiperazina- <i>N'</i> -2 etanosulfônico]
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
LC1	Cadeia leve 1 da miosina (ou essencial)
LC2	Cadeia leve 2 da miosina (ou regulatória)
LC3	Cadeia leve 3 da miosina (ou essencial 2)
M	Miosina
MML	Meromiosina leve
MMP	Meromiosina pesada
MyBPC	Proteína C ligante de miosina
N	Nucleotídeo
NaN ₃	Azida sódica
NOEDIFF	Nuclear Overhauser Enhancements Difference
Pi	Fosfato
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

S1	Subfragmento-1
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio
STD	Diferença de Transferência de Saturação
TMR	Tetrametilrodamina-5-maleimida
TnC	Troponina C
TnI	Troponina I
TnT	Troponina T
TOCSY	Espectroscopia de Correlação Total
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E ESQUEMAS

Figura 1	Miofibrila tratada com KCl	17
Figura 2	Filamento grosso	18
Figura 3	Miosina	19
Figura 4	Estrutura cristalográfica do Subfragmento-1	20
Figura 5	Esquema da polimerização da actina	21
Figura 6	Polimerização do filamento de actina	21
Figura 7	Filamento de actina exibindo sua polaridade	22
Figura 8	Estrutura da actina globular com TMR	24
Figura 9	Ilustração esquemática do filamento de actina com o complexo regulatório troponina-tropomiosina	26
Figura 10	Ilustração do sarcômero	27
Figura 11	Ilustração das fases do ciclo catalítico	29
Figura 12	Estrutura do fenol	35
Figura 13	Transmitância do filtro	45
Figura 14	Efeito do fenol na atividade S1-Mg ²⁺ -ATPásica e S1-Mg ²⁺ -ATPásica actina-ativada, variando [KCl]	51
Figura 15	Efeito do fenol sobre a associação acto-S1 por Co-sedimentação	54
Figura 16	Efeito do fenol sobre a associação acto-S1 por Espalhamento de Luz	56
Figura 17	Associação pireno-acto-S1 na presença de fenol por Fluorescência	57
Figura 18	Associação pireno-actina com S1 na presença de fenol por Cinética Rápida	60

Figura 19	Dissociação do pireno-actina-S1 na presença de fenol por actina não marcada	62
Figura 20	Ligação e Isomerização do ATP ao complexo pireno-acto-S1 na presença de fenol	64
Figura 21	Afinidade do ADP ao complexo pireno-acto-S1 dissociado por ATP na presença de fenol	65
Figura 22	Efeito do tempo de exposição do S1 ao fenol sobre a atividade actina ativada do S1	68
Figura 23	Efeito do fenol sobre a associação acto-S1 na presença e ausência de ATP por co-sedimentação	70
Figura 24	Efeito do fenol na interação acto-S1 na presença ou ausência de ATP	73
Figura 25	Ilustração da formação de complexo entre receptor e um ligante	76
Figura 26	Diferença de Transferência de Saturação S1-fenol	77
Figura 27	Medida de Coeficiente de Difusão Translacional S1-fenol	79
Figura 28	HSQC – Correlação ^{13}C - ^1H S1-fenol	80
Figura 29	NOEDIFF com pulso seletivo S1-fenol	83
Figura 30	Modelo do S1	85
Figura 31	Modelo estrutural do ciclo ATPase actina-ativada na presença de fenol	93
Tabela 1	Parâmetros cinéticos do ciclo catalítico acto-S1 na presença e ausência de fenol	66

Tabela 2	Dissociação do complexo acto-S1 após pré-incubação do S1 com fenol por 10 minutos	74
Tabela 3	Frequências utilizadas para NOEDIFF e TOCSY seletivo	84
Esquema 1	Formação do complexo pireno-actina-S1	23
Esquema 2	Ciclo catalítico da actomiosina	30
Esquema 3	Três fases da ligação da actina à miosina	31
Esquema 4	Dissociação do complexo pireno-actina-S1 por actina não-marcada	31
Esquema 5	Afinidade do ADP ao complexo acto-S1	33
Esquema 6	Ciclo catalítico demonstrando o trajeto do fenol e do DNP	89

SUMÁRIO

1 – Introdução	16
1.1 – Miosina	17
1.2 – Actina	20
1.2.1 – Pireno-actina	22
1.3 – Tropomiosina	24
1.4 – Complexo troponina	25
1.5 – Sarcômero	26
1.6 – Contração muscular	28
1.7 – Cinética	29
1.7.1 – Cinética de ligação entre actina e S1 (k_{-5})	30
1.7.2 – Cinética de dissociação do complexo pireno-acto-S1 por actina não marcada, na ausência de nucleotídeo (k_{+5})	31
1.7.3 – Cinética de ligação do ATP ao complexo acto-S1 (K_1 e k_{+2})	30
1.7.4 – Afinidade do ADP ao complexo pireno-acto-S1 (K_{4a})	32
1.7.5 – Cinética de liberação de fosfato (k_{+3a})	33
1.8 – Fenol	34
2 – Objetivos	36
3 – Metodologia	37
3.1 – Purificação de miosina	37
3.2 – Preparação do subfragmento-1	37
3.3 – Purificação da actina	38
3.4 – Polimerização de actina	39
3.5 – Marcação da actina com pireno	40
3.6 – Atividade Mg^{2+} -ATPásica do acto-S1	42

3.7 – Co-sedimentação	42
3.8 – Eletroforese	43
3.9 – Espalhamento de luz no estado estacionário	43
3.10 – Fluorescência no estado estacionário	43
3.11 – Cinética rápida	44
3.12 – Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	45
3.13 – Reagentes	48
3.14 – Análise dos resultados	49
4 – Resultados (parte 1a)	50
4.1 – Ação do fenol sobre a atividade Mg^{2+} -ATPase actina-ativada	50
4.2 – Efeito do fenol na interação acto-S1	53
4.3 – Cinética de ligação do S1 à pireno-actina (k_{-5})	58
4.4 – Cinética de dissociação da pireno-actina do S1 por actina não marcada (k_{+5})	61
4.5 – Cinética de ligação e dissociação da pireno-acto-S1 por ATP	63
4.6 – Cinética de afinidade do ADP ao complexo pireno-acto-S1	65
Resultados (parte 1b)	67
4.7 – Efeito do tempo de exposição do S1 ao fenol sobre a atividade Mg^{2+} -ATPase actina-ativada	67
4.8 – Efeito do fenol na interação acto-S1, quando o S1 é pré-incubado com fenol	69
Resultados (parte 2)	75
4.9 – Análise da interação S1-fenol por RMN	75
5 – Discussão	87
Referências Bibliográficas	94

RESUMO

O fenol é um solvente orgânico utilizado de 3 a 7 % para a redução da espasticidade muscular. A espasticidade muscular é uma hiperexcitabilidade muscular que leva a rigidez muscular, tornando o membro não funcional, que se deve a lesão do primeiro neurônio motor, causada por acidente vascular cerebral ou paralisia cerebral. Injetado no ponto neuro-motor intramuscular, o fenol causa neurólise do nervo periférico, reduzindo esta hiperexcitabilidade e deixando o membro funcional. Nunca foram avaliadas possíveis conseqüências de efeitos colaterais no tecido muscular esquelético. Já é sabido que o fenol reduz a tensão isométrica máxima de fibras descascadas de músculo esquelético e aumenta a atividade Mg^{2+} -ATPásica do subfragmento-1 (S1) através de aumento na velocidade de liberação do fosfato e do ADP. O objetivo desta tese foi analisar o efeito do fenol na interação acto-S1 *in vitro*. Foi verificado que o fenol (0,5 % v/v) também aumenta a atividade Mg^{2+} -ATPásica actina-ativada, inclusive em alta força iônica, aumentando a interação acto-S1 como evidenciada por análise de co-sedimentação e espalhamento de luz, e aumentando a afinidade entre actina e S1 evidenciada por fluorescência. Para análise cinética, foi necessário marcar actina com pireno, que permitiu verificar que tanto a associação quanto a dissociação acto-S1 na ausência de ATP, apresentaram diferenças pequenas na presença e ausência de fenol. Entretanto, o fenol causou uma importante redução na afinidade do ADP para o complexo acto-S1, o que deve ser um fator importante na redução da tensão isométrica máxima em fibras descascadas vista em dados prévios. Outro objetivo desta tese foi determinar os sítios de interação do fenol com S1, onde verificamos através dos experimentos de ressonância magnética nuclear que o fenol se liga ao S1 com afinidade de média a alta nM a μ M, levando a pequenas perturbações no deslocamento químico de alguns resíduos da proteína. Analisando estes resíduos, verificamos que entre os possíveis aminoácidos com os quais o fenol possa estar interagindo são os triptofanos. A partir disto postulamos um modelo para explicar o efeito do fenol na forte interação do S1 para actina e no aumento na velocidade de liberação de fosfato e ADP.

Palavras-chaves: pireno, actina, subfragmento-1, fenol, cinética enzimática.

ABSTRACT

Phenol is an organic solvent that is used of 3 to 7 % to reduce muscle spasticity. Spasticity arises from muscle hyperexcitability that leads to muscle rigidity and loss of function, usually due to primary motoneuron damage caused by cerebral vascular accident or cerebral palsy. Injected intramuscular at the neuromuscular junction, phenol causes neurolysis in the peripheral nerve, reducing the hyperexcitability and alleviating the rigidity. The possible consequences collateral effects of phenol on the muscle itself are not known. It has been shown that phenol reduces isometric tension in skinned fibers of skeletal muscle and increases Mg^{2+} -ATPase activity of subfragment-1 (S1) by accelerating Pi and ADP release. The aim of this thesis was analyze the effect of phenol on acto-S1 interactions *in vitro*. Phenol (0,5 % v/v) increases actin-activated Mg^{2+} -ATPase at both low and high ionic strength, and increases acto-S1 interaction analyzed by co-sedimentation and light scattering as well as increasing affinity as analyzed by fluorescence. For kinetic analysis, was labeled actin with pyrene, and association and dissociation rates of acto-S1 without ATP were shown to change only slightly with phenol. However, phenol caused significant reduction in ADP affinity for the acto-S1 complex, probably an important factor to explain isometric tension reduction shown in datas previous study from our laboratory. Another objective of this thesis was to analyze the S1-phenol interaction, using nuclear magnetic resonance experiments. Phenol bound to S1 with medium to high affinity, leading to small perturbations in chemical shift of some the amino-acid residues. Analysis of these residues showed that tryptophan is prominent among that may bind phenol. A model to explain the effects of phenol on strong acto-S1 interactions and the increase in velocity of Pi and ADP release is proposed.

Key-words: pyrene, actin, subfragment-1, phenol, enzymatic kinetic.

1. INTRODUÇÃO

O músculo estriado esquelético é formado por fibras musculares, as quais são formadas por miofibrilas, divididas em unidades bem organizadas denominadas sarcômeros, delimitados por duas linhas Z. Os sarcômeros são compostos por filamentos grossos, principalmente compostos de miosina; e pelos filamentos finos, que consistem de actina e o complexo troponina- tropomiosina. Há outras proteínas como α -actinina, miomesina, M-proteína, titina, desmina proteína C ligante de miosina (MyBP)-C e (MyBP) -H, os quais mantêm os componentes do sarcômero alinhados (Tajsharghi, 2008).

Na contração muscular, ocorre o deslizamento dos filamentos de actina sobre os filamentos de miosina, levando à diminuição do comprimento do sarcômero, com aproximação das linhas Z. Para que a contração muscular ocorra é necessário um estímulo nervoso que provoque a despolarização do sarcolema, o qual leva à liberação do cálcio pelo retículo sarcoplasmático. O íon cálcio se liga à troponina e promove uma mudança conformacional do complexo troponina-tropomiosina. O ATP ligado à miosina é hidrolisado, que leva à interação da miosina com o filamento de actina, quando ocorre, então, o deslizamento da actina sobre a miosina, caracterizando a contração muscular.

Uma lesão do primeiro neurônio motor leva a sintomatologias como a espasticidade, caracterizada por uma rigidez muscular que leva à incapacidade funcional do movimento motor voluntário. Alguns terapêuticos, como o fenol, são injetados na junção neuro-muscular, que causa neurólise da porção terminal do axônio e reduz o tônus muscular, melhorando a funcionalidade do movimento motor.

1.1 Miosina

O filamento de miosina é composto por cerca de 300 moléculas de miosina, cada uma com peso molecular de 540 kDa, as quais se organizam formando agregados em condições de força iônica fisiológica (150-200 mM). As moléculas são ligadas umas às outras pela cauda, conferindo polaridade ao filamento de miosina (Huxley, 1963).

Em meados do século XX, homogeneizados de músculos foram tratados com soluções em alta força iônica (600 mM de KCl) e água. Foi observado que, quando a miofibrila era tratada com 600 mM de KCl, ocorria o desaparecimento do material da banda A (Figura 1); quando tratado com água, outra proteína era solubilizada, restando somente as linhas Z. Estas observações foram realizadas utilizando microscopia ótica. A proteína solúvel em alta força iônica é denominada miosina e a proteína solúvel em água actina (Huxley & Hanson, 1954).

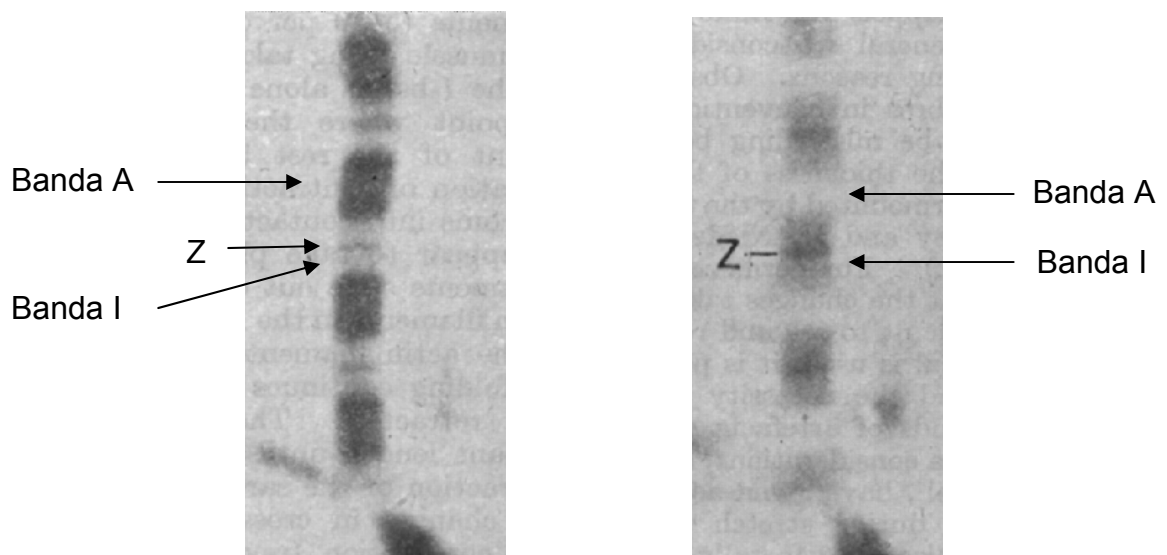


Figura 1: Miofibrila tratada com KCl. À esquerda, miofibrila ao microscópio apresentando uma região mais escura que representa a banda A; à direita a mesma miofibrila após tratamento com solução contendo KCl 0,6 M. As bandas A desaparecem e sobram as linhas Z, ligadas aos filamentos da banda I (Huxley & Hanson, 1954).

Quando a miosina solubilizada foi então tratada com força iônica fisiológica, Huxley (1963) observou que as moléculas de miosina se uniram pelas caudas, posicionando-se em direções opostas com suas projeções, formando uma região denominada zona careca no meio do filamento grosso, o que caracterizou a presença de polaridade no filamento grosso (Figura 2).



Figura 2: Esquema da estrutura dos filamentos grossos, apresentando uma região central (zona careca) e projeções ao longo do filamento grosso em direções opostas. (Prochniewicz et al., 2007)

A.G. Szent-Györgyi (1953), usando enzimas proteolíticas, forneceu uma ferramenta muito útil para o estudo da miosina. A adição de tripsina na solução de miosina leva à divisão desta em dois fragmentos: meromiosina leve (MML) e meromiosina pesada (MMP) (Figura 3). A MML é constituída pela cauda até a altura do subfragmento-2. A MMP é constituída pelas duas cabeças da miosina ou subfragmento-1 (S1), cada uma com peso molecular de 110 kDa, e por quatro cadeias leves e os dois subfragmentos-2. A extremidade carboxila da miosina tem a forma de dupla hélice, e a extremidade amino apresenta a cadeia pesada com um grande domínio globular que contém o sítio no qual o ATP é hidrolisado. A molécula de miosina apresenta duas cadeias leves (CL) presas a cada S1: cadeias leves não essenciais (CL-2, a "regulatória") e cadeias leves essenciais (CL-1 e CL-3) com aproximadamente 20 kDa cada cadeia leve (Katoh & Lowey, 1989). O S1 é solúvel em qualquer força iônica, enquanto a cauda e o filamento de miosina são solúveis somente em alta força iônica.

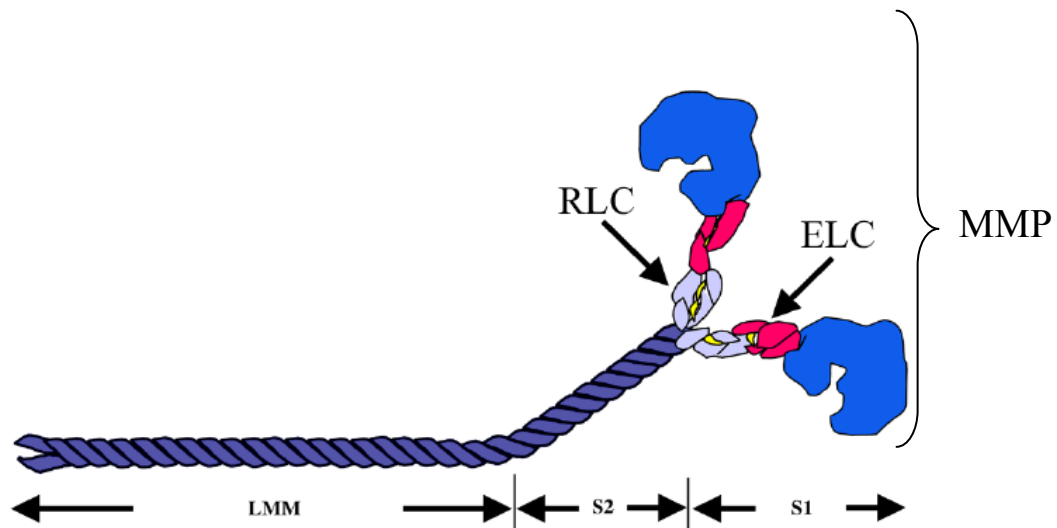


Figura 3: Ilustração esquemática da estrutura da miosina com meromiosina pesada; meromiosina leve composta pela cauda; e as cadeias leves essencial (ELC) e regulatória (RLC) no subfragmento-1 (Tajsharghi, 2008)

O subfragmento-1 que compreende 843 aminoácidos é a porção enzimática da proteína, constituída por uma porção com 50 kDa (subdividida em superior e inferior); uma porção de 25 kDa (N-terminal); outra porção de 20 kDa (C-terminal) (Geeves & Holmes, 1999; Geeves et al., 2005). Na porção de 50 kDa, na boca da fenda entre a região superior e inferior, está o sítio para ligação de actina. Entre os domínios de 50 kDa e de 25 kDa encontra-se o sítio para ligação de nucleotídeo. Na região da fenda para ligação de nucleotídeo há dois loops conservados, *switch I* e *switch II* que apresentam mudanças estruturais na interação com nucleotídeo (Reubold et al., 2003). A estrutura cristalográfica desta proteína foi produzida por Rayment et al. (1993) (Figura 4).

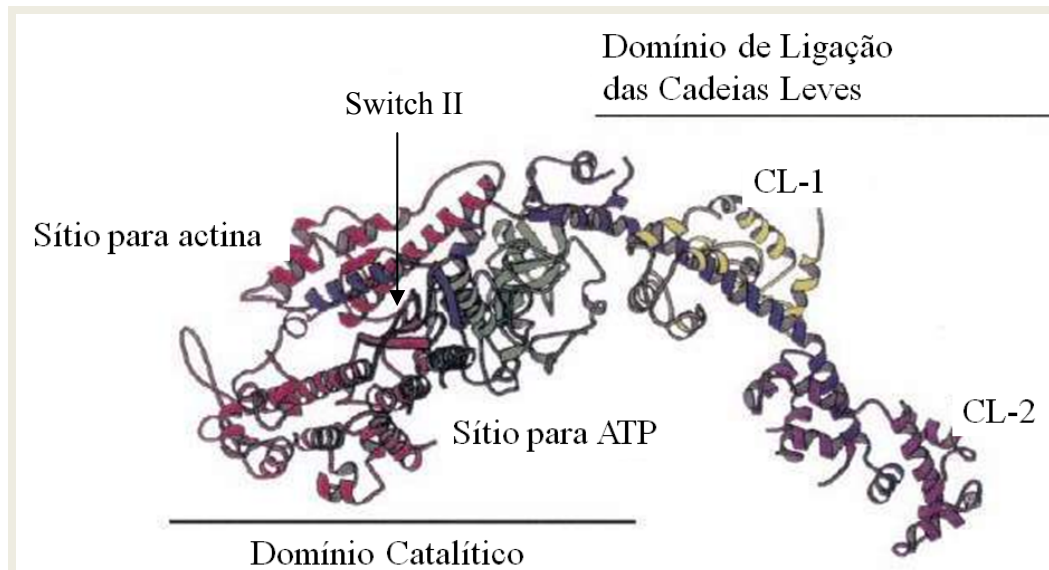


Figura 4: Estrutura cristalográfica do subfragmento-1, demonstrando os sítios para ligação de nucleotídeo e actina. Em vermelho a região de 50 kDa, em verde a região de 25 kDa, em azul a região conversora (20 kDa), em amarelo a cadeia leve essencial (CL-1) e em rosa a cadeia leve regulatória ou não essencial (CL-2) (Rayment et al., 1993).

1.2 Actina

O polímero de actina (F-actina) é o maior componente do filamento fino. A actina é constituída por um polímero longo, formando uma fita dupla que se entrelaçam. Este filamento é formado por monômeros de actina (actina globular ou G-actina), solúveis em força iônica muito baixa, com peso molecular de 42 kDa, contendo o nucleotídeo adenosina difosfato (ADP) e cálcio ligados à G-actina, proveniente da reação com adenosina trifosfato (ATP), na presença de magnésio e, aproximadamente, 0,1 M de KCl (Gordon et al., 2000; Pardee & Spudich, 1982a). O ATP é hidrolisado, resultando em altas concentrações de ADP-actina que tem alta taxa de dissociação da ponta final do filamento de actina, levando à despolimerização da actina (Pollard, 1984, 1986). Em condições fisiológicas na célula, com força iônica de 0,15 M, a actina encontra-se na sua forma agregada.

Para a polimerização de actina, Pardee et al. (1982) verificaram que os monômeros de actina se incorporam num tempo médio de 15 minutos em filamentos

de actina, chegando a um platô com 50 – 70 % da actina G utilizada aos 30 – 40 minutos. Esta polimerização ocorre na presença de 100 mM KCl, 1 mM ATP e 0,2 mM $MgCl_2$. O KCl e ATP são responsáveis para a formação do polímero (Figura 5). O cátion divalente acelera a hidrólise do ATP, já ligado ao filamento de actina, acelerando, desse modo, o processo de polimerização, visto por uma maior viscosidade, em menor tempo, quando comparado ao processo na ausência de $MgCl_2$. A velocidade de polimerização é dependente da concentração de KCl (Pardee & Spudich, 1982a).

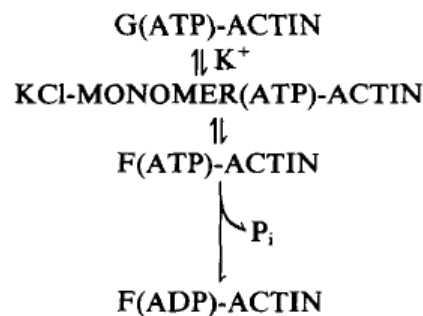


Figura 5: Esquema da polimerização da actina. Na presença de potássio, ATP e Mg^{2+} ocorre a polimerização da actina (Pardee & Spudich, 1982a).

Após incorporação do monômero de actina, na região da ponta positiva do filamento de actina, se realiza a hidrólise do ATP. Na despolimerização, a dissociação da actina-ADP acontece na ponta final negativa do filamento de actina (Rould et al., 2006) (Figura 6).

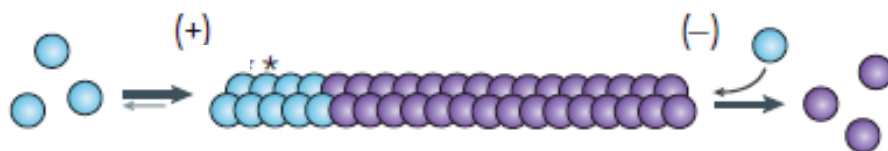


Figura 6: Polimerização do filamento de actina (F-actina). Na ponta positiva, a G-actina.ATP (esferas azuis) liga-se ao filamento de actina. Na ponta negativa ocorre a despolimerização, onde monômeros de actina com ADP ligado (esferas roxas) desprendem-se da F-actina. (Thanbichler & Shapiro, 2008).

A actina também tem polaridades opostas de cada lado da linha Z. Ao filamento de actina, foram adicionados S1, e estes se ligaram em forma de pontas de flecha, com as pontas voltadas para o mesmo lado (o que representaria o filamento de actina de um lado da linha Z), como demonstradas na Figura 7.

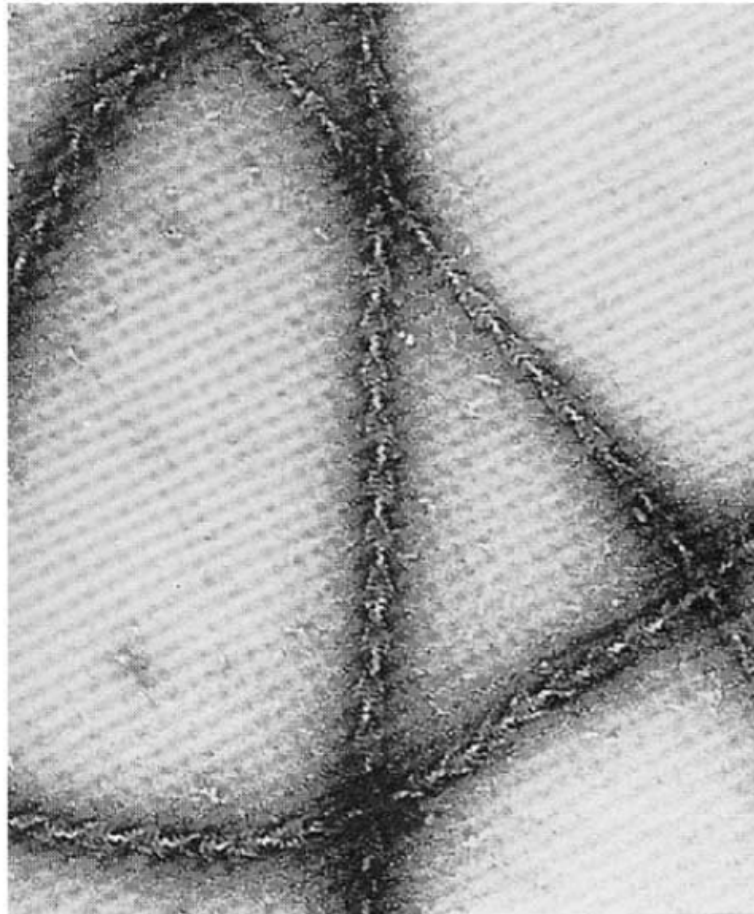
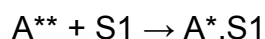


Figura 7: Microscopia eletrônica dos filamentos de actina com S1 de miosina de coelho. Cada crossover de filamento de actina parece pontas de flechas, porque cada monômero de actina carrega uma cabeça de miosina alongada (Brown & Cohen, 2005).

1.2.1 N-(1-pirenil) iodoacetamida (pireno-actina)

Kouyama e Mihashi (1981) demonstraram que a actina pode ser marcada especificamente na cisteína 374 no subdomínio 1, por N-(1-pirenil) iodoacetamida (pireno-actina). Este é um fluoróforo que quando complexado à actina, e ela é

ligada ao S1, apresenta uma redução da fluorescência em 70% (esquema 1), o que proporciona, assim, a possibilidade de trabalhar com concentrações menores de proteína e aumenta a sensibilidade de detectar as pequenas mudanças conformacionais na interação entre as proteínas. O uso da pireno-actina permite analisar a cinética do ciclo catalítico, onde algumas reações ocorrem em milissegundos (Criddle et al., 1985).



Esquema 1: Formação do complexo pireno-actina com o S1. A** representa estado de alta fluorescência da pireno-actina, A* representa o estado de baixa fluorescência do pireno-actina, e S1 representa o subfragmento-1.

A actina na sua forma filamentosa marcada com pireno apresenta uma fluorescência sete vezes maior que actina globular (Cooper et al., 1983); uma afinidade duas vezes menor para S1, com velocidade de ligação inalterada e velocidade de dissociação 2 vezes aumentada quando comparada à actina nativa (Criddle et al., 1985).

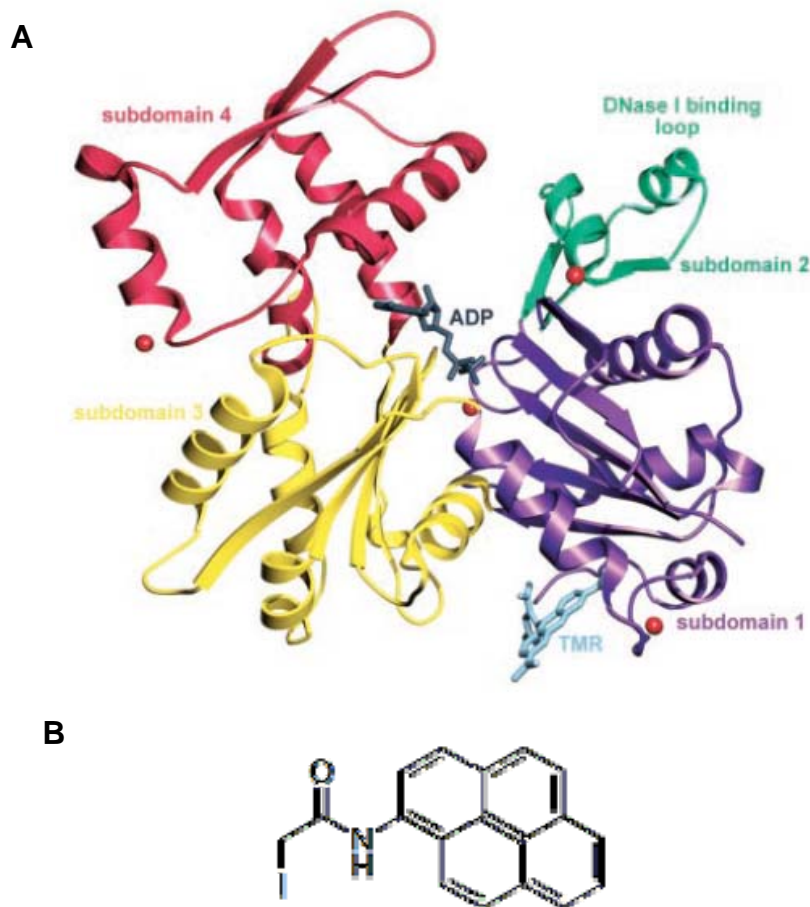


Figura 8: A. Estrutura da actina no estado G-actina-ADP, com seus quatro subdomínios em cores diferentes; as esferas vermelhas representam o cálcio. Apenas o átomo perto do ADP se envolve na catálise. Em azul o tetrametilrodamina-5-maleimida que liga covalentemente a cisteína-374, demonstrando o local onde o pireno liga (Otterbein et al., 2001). B. Estrutura do N-(1-pirenil) iodoacetamida.

1.3 Tropomiosina

A tropomiosina, isolada por Bailey em 1946, é uma proteína com a forma de um longo *coiled-coil* em alfa hélice, com aproximadamente 40 nm de comprimento e com peso molecular de aproximadamente 70 kDa, solúvel em soluções de baixa força iônica. Apresenta-se em dímero numa forma helicoidal, que se estende sobre sete monômeros do filamento de actina, repousando sobre os sítios de ligação para miosina, que impede assim a ligação da mesma à actina. A tropomiosina também interage com o complexo troponina, o qual leva ao aumento da ligação da

tropomiosina à actina em baixas concentrações de cálcio, que bloqueia a ligação da miosina à actina (Gordon et al., 2000; Lehman et al., 2009).

1.4 Complexo troponina

O complexo troponina é composto por três subunidades: troponina C (TnC), que liga cálcio, e tem peso molecular de 18 kDa; troponina I (TnI), que liga actina, inibindo a atividade actomiosina ATPásica e tem peso molecular de 20 kDa; troponina T (TnT), que liga a tropomiosina e tem peso molecular de 37 kDa (Gordon et al., 2000; Ohtsuki & Morimoto, 2008).

A TnC encontra-se ligada à TnI e à TnT, sendo responsável por ligar cálcio e regular a contração muscular. A TnC possui duas regiões globulares conectadas por uma longa hélice central. Cada região contém dois sítios para ligação de cálcio. A região C-terminal tem uma alta afinidade para o cálcio (10^{-7} M^{-1}) e liga magnésio competitivamente. Estes sítios são denominados sítios estruturais por aumentar a interação TnC-TnI e, portanto, a ligação da TnC ao filamento fino. A região N-terminal tem menor afinidade para o cálcio (10^{-5} M^{-1}) comparada ao C-terminal, entretanto apresenta alta seletividade para cálcio sobre magnésio (Gordon et al., 2000). Com a ligação de cálcio a esta região, a TnC sofre mudanças conformacionais, que leva a mudanças conformacionais na TnI, na TnT e na tropomiosina, liberando os sítios da actina para interagir com miosina.

A TnI liga a TnC e a região N-terminal da F-actina, inibindo a ligação da miosina e ativação da sua atividade ATPásica. Ela ancora o complexo troponina sobre o filamento fino na ausência de cálcio. A presença de cálcio é importante para modular a interação TnI-TnC. Na presença de baixas concentrações de cálcio, ocorre ligação do C-terminal da TnC com a TnI e em altas concentrações de cálcio

há uma forte interação da região N-terminal da TnC com a TnI, o que leva ao enfraquecimento da ligação da TnI com actina (Gordon et al., 2000), e libera o sítio da actina para interagir com miosina.

A interação da TnT com TnC-TnI-Tm aumenta a inibição da atividade actomiosina ATPásica na ausência de cálcio. Portanto, na presença de cálcio, a atividade actomiosina ATPásica é aumentada, e ocorre uma forte interação entre troponina-T e troponina-C, enfraquecendo a ligação da TnT à tropomiosina.

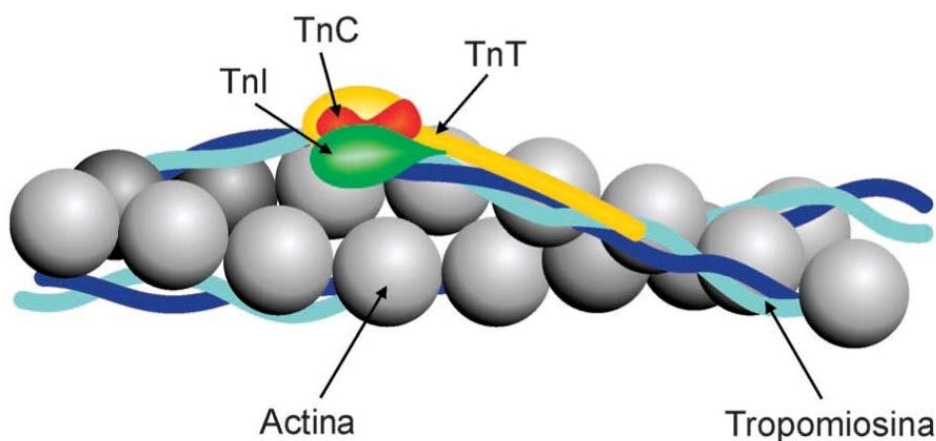


Figura 9: Ilustração esquemática do filamento de actina com o complexo regulatório troponina-tropomiosina. Esferas cinzas representam a actina; em vermelho a TnC, em verde a TnI; em amarelo a TnT; e em azul a tropomiosina. (Gordon et al., 2000).

1.5 Sarcômero

A fibra muscular é formada por unidades denominadas sarcômeros, delimitados entre duas linhas Z. Os sarcômeros são formados por uma banda anisotrópica (banda A) com zona H no meio da banda A, linha M no meio da zona H; uma banda isotrópica (banda I) com a linha Z no meio dessa banda. A banda A contém principalmente a miosina e quantidades variáveis da actina, dependendo do comprimento do sarcômero. Cada filamento grosso é rodeado por seis filamentos finos e forma um hexágono. Cada filamento fino encontra-se rodeado por três filamentos grossos, concluindo assim uma relação de 2:1 no número de filamentos

finos e grossos. A zona H é formada por filamentos grossos. A banda I é constituída principalmente de actina.

Entretanto, como mostrado na Figura 10, há a presença de outras proteínas que são responsáveis em garantir a estrutura do sarcômero bem organizada, mantendo os filamentos de actina e de miosina em suas respectivas posições para realização de uma boa contração muscular. Como exemplo, temos: a alfa-actinina, responsável por manter a actina alinhada e ancorada à linha Z (Telley & Denoth, 2007); a titina que é responsável por ancorar o filamento de miosina na banda A, fixando-se na linha Z e na linha M; a miomesina e proteína M, também ligantes de miosina e na linha M; a proteína C ligante de miosina (MyBPC), a qual é responsável por alinhar os filamentos grossos na banda A, assim como o seu envolvimento na regulação da contração muscular (Tajsharghi, 2008).

Marcação por imuno-fluorescência da alfa-actinina e miomesina tem sido utilizada para estudar as mudanças do sarcômero, durante a contração muscular, sendo possível analisar mudanças no comprimento do sarcômero e no mecanismo de deslizamento das miofibrilas (Telley & Denoth 2007).

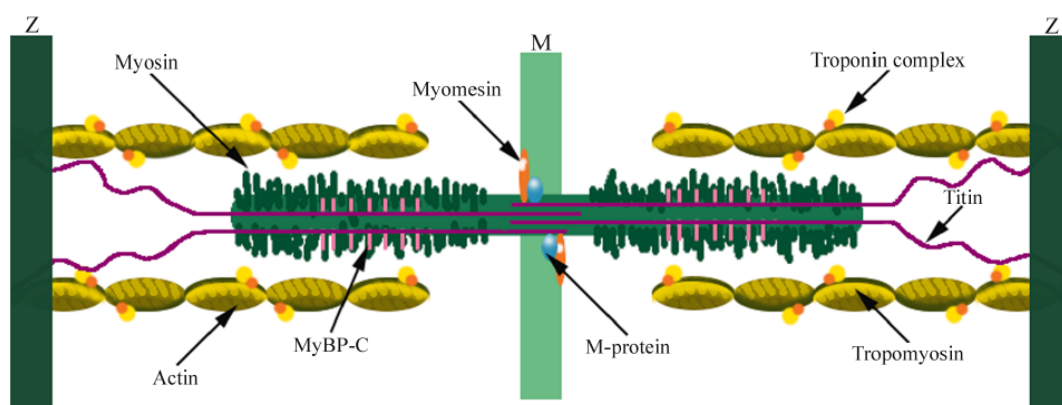


Figura 10: Ilustração do sarcômero, mostrando as regiões da banda A, banda I e linha M, e constituído dos filamentos finos (actina, troponina C, T e I, tropomiosina e nebulina), dos filamentos grossos (miosina); e das proteínas ligadoras de miosina, destacando-se a proteína-C ligante de miosina, titina, proteína-M e miomesina (Tajsharghi, 2008).

1.6 Contração muscular

Na presença do impulso nervoso, ocorre a liberação de acetilcolina da célula pré-sináptica para a fenda sináptica. A acetilcolina liga-se aos seus receptores, na célula pós-sináptica (sarcolema), despolarizando a mesma, através dos túbulos transversais, que são invaginações da membrana, que levam este estímulo ao retículo sarcoplasmático, que, então libera cálcio no sarcoplasma. O cálcio em concentrações micromolares (10^{-5} M^{-1}), no citoplasma da célula, liga-se à troponina C e promove uma mudança conformacional do complexo troponina, desloca a tropomiosina para o centro do filamento de actina, liberando assim os sítios para ligação de miosina. A contração muscular ocorre por deslizamento dos filamentos finos sobre os filamentos grossos, sem que ocorra variação do comprimento dos filamentos (Huxley & Hanson, 1954), com encurtamento do sarcômero por aproximação das linhas Z. O comprimento da banda A permanece constante, com variação do comprimento da banda I e da zona H proporcional ao grau de encurtamento ou estiramento.

A miosina que liga ATP no seu sítio catalítico vai hidrolisá-lo, formando os produtos ADP e fosfato (Pi). Em seguida, liga-se à actina, e começa assim, o ciclo catalítico. A miosina sofre uma mudança conformacional com a energia liberada pela hidrólise do ATP (cabeça da miosina a 90° em relação à cauda) e promove o deslizamento do filamento fino sobre o filamento grosso, e libera então os produtos Pi e depois o ADP. Ao liberar os produtos, a miosina e actina ficam ligadas em pontes fortes, no estado de rigor (cabeça da miosina a 45° em relação à cauda), sendo necessário uma nova molécula de ATP para promover o desligamento da cabeça da miosina da actina para que a contração muscular possa continuar ocorrendo (Figura 11). Este ciclo catalítico foi caracterizado por Lymn & Taylor

(1970), sendo posteriormente ampliado, como relatado por Geeves & Holmes (1999), Geeves et al. (2005) e Gordon et al. (2000). Este desligamento na presença de concentrações fisiológicas de força iônica (KCl 150-200 mM) ocorre mais rápido do que em concentrações de baixa força iônica (10 mM) (Gordon et al., 2000).

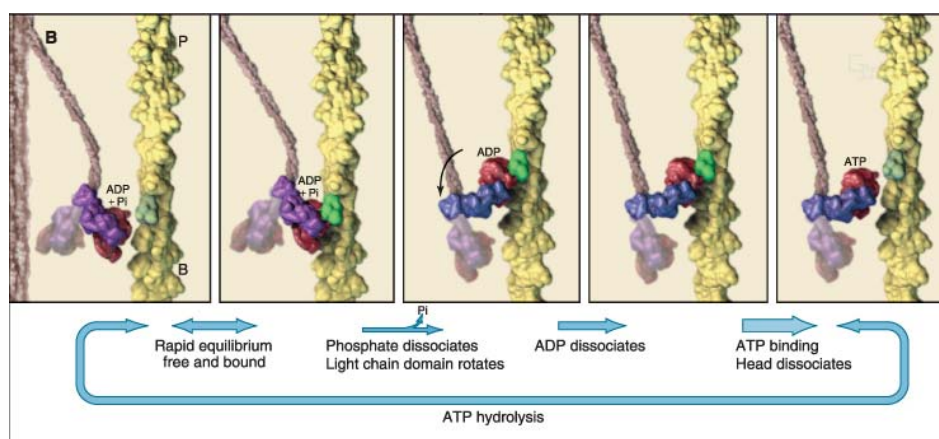


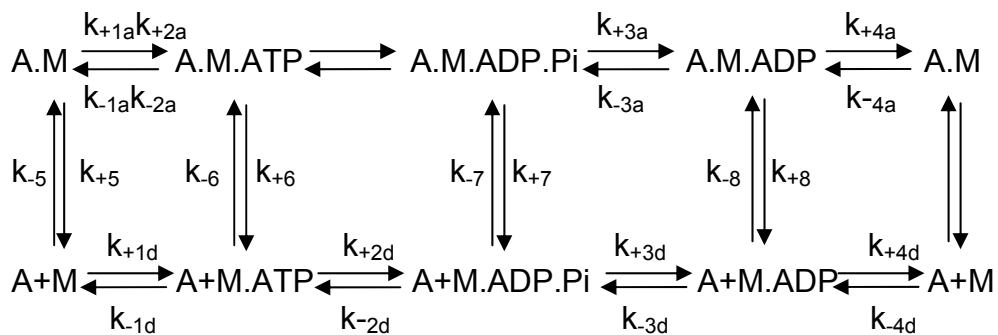
Figura 11: Fases do ciclo catalítico da atividade ATPásica actina-ativada, onde no primeiro estado o ATP localizado na cabeça da miosina sofre hidrólise ($A + M.ADP.Pi$), a miosina passa a ter afinidade para actina ($A.M.ADP.Pi$), e libera o fosfato ($A.M.ADP + Pi$). O S1 sofre uma mudança conformacional, o filamento de actina desliza sobre o filamento de miosina; na quarta etapa libera o ADP, forma a ponte de rigor ($A.M$). No último quadro, uma molécula de ATP ($A.M.ATP$) na cabeça da miosina leva à dissociação da acto-S1, em seguida volta para a primeira etapa dando continuidade ao ciclo catalítico (Vale & Milligan, 2000).

Para que cesse a contração muscular, é necessário interromper o estímulo nervoso, em que o íon cálcio retorna para dentro do retículo sarcoplásmico, e o complexo troponina-tropomiosina volta a ocupar seu lugar sobre o sítio de ligação de miosina na actina, interrompendo, dessa forma, a ligação entre as duas proteínas e, conseqüentemente, fazer cessar o ciclo catalítico.

1.7 Cinética

A análise dos transientes cinéticos permite identificar bioquimicamente as populações intermediárias durante o ciclo ATP, determinando o tempo de vida e a distribuição destes intermediários, que definem a reação dominante no ciclo da

ATPase, a qual pode explicar a velocidade e a constante de equilíbrio, observada no estado estacionário (De La Cruz & Ostap, 2009). Portanto, a análise *in vitro* do ciclo catalítico envolve a ligação de actina ao subfragmento-1 da miosina (k_{-5}); a ligação de ATP e isomerização do complexo acto-S1 ($k_{+1}k_{+2}$); a clivagem do ATP (k_{+2d}); a liberação do fosfato (k_{+3a}); a liberação do ADP (k_{+4a}); a dissociação do acto-S1 (k_{+5}), como demonstrado no esquema 2 (baseado em Shaw et al., 2003).

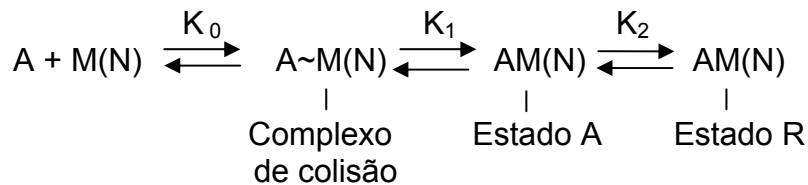


Esquema 2: Ciclo catalítico da actomiosina. A representa actina, M representa a miosina, ATP adenosina trifosfato, ADP adenosina difosfato, Pi fosfato, k_+ representa a constante de velocidade na direção da reação para hidrólise do ATP, e k_- representa a constante na direção oposta à hidrólise do ATP. A constante de equilíbrio da reação em cada passo (K) é dada pela relação k_+/k_- (baseado em Shaw et al., 2003).

1.7.1 Cinética de ligação entre actina e S1 (k_{-5})

A formação do complexo acto-S1 na ausência ou na presença de nucleotídeo ocorre em três fases (esquema 3): formação inicial do complexo (colisão – fase 1) levando ao estado A (fraca ligação do S1 a actina), no qual ocorrem as interações hidrofóbicas entre S1 e actina (equilíbrio rápido – fase 2); em seguida há um maior rearranjo do complexo acto-S1 (isomerização – fase 3), levando ao estado R (estado de forte ligação do S1 à actina) (Geeves et al., 2005). No mecanismo de isomerização (fase 3) a actina e miosina apresentam-se mais fortemente ligados ($K_2 > 100$) o que resulta maior concentração do complexo acto-miosina no estado R;

porém, na presença de nucleotídeo, esta ligação se apresenta mais enfraquecida ($K_2 \ll 1$) (De La Cruz & Ostap 2009; Geeves & Conibear 2005). Nesta tese, são utilizadas as constantes do esquema 2, mais detalhado do que o esquema 3.

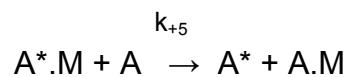


Esquema 3: Representação das três fases de ligação da actina (A) à miosina (M) na presença ou não de nucleotídeo (N) (Geeves et al., 2005).

Para obtenção da constante de ligação entre actina e S1, mistura-se pireno-actina com variadas concentrações de S1; o gradiente do ajuste entre k_{obs} vs. a concentração de S1 fornece uma constante de segunda ordem, k_{-5} .

1.7.2 Cinética de dissociação do complexo pireno-acto-S1 por actina não marcada, na ausência de nucleotídeo (k_{+5})

Na dissociação do complexo pireno-actina-S1, é usado excesso de actina não marcada. A velocidade de dissociação é a constante observada (k_{obs}), retirada por uma constante de primeira ordem (k_{+5}), como demonstrado no esquema 4.



Esquema 4: Dissociação do complexo pireno-acto-S1 por actina não-marcada. A^* representa pireno-actina, M representa miosina e A representa actina não marcada.

Estes experimentos de ligação entre pireno-actina e S1 na presença ou ausência de actina não marcada analisam a afinidade entre estas duas proteínas. A afinidade entre pireno-actina e S1, também pode ser estimado por medidas de fluorescência no estado estacionário, titulando a pireno-actina com S1.

1.7.3 Cinética de ligação do ATP ao complexo acto-S1 (K_1 e k_{+2})

A ligação do ATP ao complexo acto-S1 diminui a afinidade da miosina para actina, dissociando o complexo. A ligação do ATP também ocorre em três fases (colisão, equilíbrio rápido e isomerização). Para análise dessa etapa, novamente a melhor metodologia é a utilização de pireno-actina, a que promove melhor relação sinal-ruído, permitindo trabalhar com concentrações de ATP acima de 20 mM (De La Cruz & Ostap, 2009). Contudo, a pireno-actina também apresenta uma desvantagem que é a impossibilidade de distinguir entre o estado de fraca ligação (A.M.ADP.Pi) e o estado de desligado do complexo acto-S1 (A + M; A + M.ADP). Não obstante, a técnica é muito usada com miosina II e a dissociação do complexo acto-S1 é realizada em variadas concentrações de ATP, nas quais, em baixas concentrações de ATP, o processo representa a ligação do ATP ao complexo pireno-acto-S1 e em concentrações saturantes de ATP, o processo observado é a isomerização, k_{+2} . As constantes são obtidas através da equação 1, onde K_1 representa o rápido equilíbrio e k_{+2} representa a isomerização (Iorga et al., 2007).

$$k_{\text{obs}} = k_{+2}K_1 \frac{[\text{ATP}]}{1 + K_1[\text{ATP}]} \quad \text{Equação 1}$$

1.7.4 Afinidade para ADP (K_{4a})

A formação do estado R (Esquema 3) reduz a afinidade do ADP para miosina mais que 100 vezes e a dissociação do ADP é acelerada em mais que 500 vezes comparada com o estado A (Geeves & Holmes, 1999). A velocidade de liberação de ADP e a afinidade de ADP ao complexo pireno-acto-S1 são mensuradas pela inibição da velocidade de dissociação induzida por ATP, ao misturar ATP com o

complexo pireno-acto-S1-ADP, de acordo com o esquema 5, onde a dissociação deste complexo pelo ATP depende da afinidade do ADP pelo sítio catalítico (De La Cruz & Ostap, 2009; Iorga et al., 2007; Shaw et al., 2003).



Esquema 5: Afinidade do ADP ao complexo acto-S1. k_{1a} representa a velocidade de ligação de ATP ao S1 na ausência de ADP e $1/K_{4a}$ representa a afinidade de ADP ao complexo acto-S1 (Shaw et al., 2003).

Quanto maior a concentração de ADP, mais miosina estará ligada ao complexo, reduzindo assim a quantidade de miosina livre para a ligação de ATP que leva à redução da velocidade de dissociação. A intensidade de fluorescência do pireno-actina aumenta quando é dissociado por ATP do complexo pireno-acto-S1-ADP. A constante observada é de primeira ordem sendo descrita pela equação 2, onde $k_{1a} [ATP]$ é a velocidade de dissociação do complexo pireno-acto-S1 por ATP na falta de ADP e K_{4a} corresponde à constante da associação do ADP ao complexo pireno-acto-S1 (Shaw et al., 2003).

$$k_{obs} = \frac{k_{1a}[ATP]}{1 + [ADP]/K_{4a}} \quad \text{Equação 2}$$

1.7.5 Cinética de liberação de fosfato (k_{+3a})

Actina induz aceleração da liberação de fosfato (Pi) mais que 200 vezes, de modo que este alcança uma velocidade maior que 100 s^{-1} . Um método utilizado para medir esse passo é uma proteína ligante de Pi fluorescente (FPBP) (Brune et al., 1994). Esta proteína se liga ao Pi numa velocidade de aproximadamente 1000 s^{-1} , com $K_m < 1 \text{ } \mu\text{M}$ (Gordon et al., 2000); sendo assim, capaz de analisar uma liberação

de fosfato em tempo real com velocidade maior que 700 s^{-1} (De La Cruz & Ostap 2009). A velocidade de liberação de fosfato também pode ser avaliada de maneira qualitativa por medidas no estado estacionário, desde que neste processo esteja o passo limitante do ciclo e que a população inicial do complexo A.M.ADP.Pi se mantenha.

1.8 Fenol

O fenol é um solvente orgânico formado por um anel benzênico e um grupo hidroxila, tem característica ácida, devido ao anel aromático estar ligado fortemente ao oxigênio e a relativa perda de ligação entre o oxigênio e o hidrogênio, com pK_a em torno de 11. O fenol tem um coeficiente molar de $2.340 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $270,7 \text{ nm}$ (Berlman, 1971).

Este solvente tem sido utilizado como um bloqueador neuromuscular, através da injeção de 3-7% de fenol intramuscular no ponto motor (Jarrett et al., 2002; Koman et al., 2004; Lee & Lee 2008; McCrea et al., 2004; Sung et al., 2001). O ponto motor é identificado por estimulação elétrica através de eletrodos colocados sobre o músculo, ou por ultrassom guiado (Lee & Lee, 2008). O fenol causa a degradação da mielina e do axônio, reduzindo assim a hipertonia. É uma técnica segura e de baixo custo para o tratamento de espasticidade, rigidez muscular causada pela lesão do primeiro neurônio motor, por paralisia cerebral ou acidente vascular cerebral. O efeito do fenol dura de 2 a 36 semanas (Patel & Soyode, 2005; Tilton, 2006) até a regeneração do neurônio. O fenol pode causar enfraquecimento muscular com incapacidade de desenvolvimento da força muscular máxima devido à neurólise. Contudo, o músculo mantém uma força suficiente para a realização de movimentos funcionais (McCrea et al., 2004).

Estudos do Laboratório de Química Fisiológica da Contração Muscular do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro evidenciaram que o fenol (0,1-0,5%) diminui a tensão isométrica máxima das fibras, intensificando a afinidade aparente do cálcio pela TnC (Machado, 2001) e aumenta a atividade Mg^{2+} ATPásica do S1, sendo reversível em concentrações baixas (0,25-0,5%) e irreversível em concentrações altas (1-2%). Na Mg^{2+} ATPase, o efeito principal é de acelerar a liberação de Pi e de ADP (Coelho et al., 2009). O fenol também altera a estrutura terciária do S1 (Coelho, 2007).

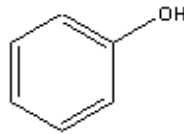


Figura 12: Estrutura do fenol.

2. OBJETIVOS

Caracterizar a modulação da interação acto-S1 de músculo esquelético na presença de fenol:

- Identificando o mecanismo de ação do fenol sobre a interação e atividade actina-ativada da Mg^{2+} -ATPase da miosina;
- Caracterizando o ciclo catalítico na presença de actina por cinética rápida;
- Analisando o efeito do fenol sobre a estrutura do S1.

Para melhor compreensão do trabalho, a tese foi dividida em duas partes:

➤ Primeira parte (a):

- Analisar a interação acto-S1 no estado estacionário na presença de fenol
- Analisar a interação acto-S1 por cinética rápida na presença de fenol.

➤ Primeira parte (b):

- Analisar a interação acto-S1 no estado estacionário, após pré-incubação do S1 com fenol por um tempo mais prolongado.

➤ Segunda parte:

- Analisar o efeito do fenol na estrutura do S1.

3. METODOLOGIA

3.1 Purificação de miosina

A miosina foi extraída da musculatura *longissimus dorsi* de coelho, seguindo o protocolo de Bremel & Weber (1975). Após morte do coelho, deve-se abrir o dorso e expor o músculo *longissimus dorsi* no gelo por 30 minutos. Retirar o músculo, limpar, moer e pesar. Para cada 100 gramas de músculo foi adicionado 300 ml de um tampão contendo KCl 1M, KH₂PO₄ 0,5 M, KOH 0,16 M pH 6,5 e deixou agitando lentamente por 10 minutos no gelo. Em seguida foi adicionado 1200 ml de água para cada 100 ml da solução contendo o músculo e permaneceu em agitação vigorosa por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado em gazes, adicionado ao mesmo 1800 ml de água para cada 100 g de músculo, e finalmente, mantido em repouso até o músculo precipitar. Em seguida, descartou-se o sobrenadante, o precipitado foi centrifugado a 8000 rpm a 4°C por 30 minutos. O precipitado foi, então, ressuspenso com KCl 600 mM e homogenizado no potter. Adicionou-se o dobro do volume com água e centrifugado novamente com 8000 rpm a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado em gazes, adicionado 7 vezes o volume de água e centrifugado a 8000 rpm a 4°C por 30 minutos. O precipitado obtido foi utilizado para repetir os passos de alta força iônica e baixa força iônica. Por fim, o precipitado foi ressuspendido (miosina purificada) com KCl 600 mM, imidazol 50 mM e glicerol 50 % e estocado a - 20°C.

3.2 Preparação do subfragmento-1

O subfragmento-1 foi obtido segundo o método de Weeds & Taylor (1975). Após a última etapa da purificação da miosina o precipitado foi ressuspenso em

NaCl 120 mM, fosfato de sódio 20 mM pH 7 e EDTA 1 mM; e quimiotripsinado por 10 min com 50 µg/ml de alfa-quimiotripsina tratada com cloridrato de N-a-tosil-L-lisina clorometil cetona (inativa a tripsina presente na quimiotripsina sem alterar sua atividade), sendo a reação parada com 300 µM de fluoreto de fenilmetilsulfonil. Após esta etapa, a solução foi dialisada durante 12 h contra Imidazol 50 mM pH 7,0 e ditioneitol (DTT) 1 mM, centrifugada a 120.000 x g por 90 min e descartado o precipitado (contendo a cauda e o material não digerido). O sobrenadante (S1) foi concentrado, submetido a cromatografia de troca iônica e dosado no espectrofotômetro a 280 nm. O S1 foi dialisado novamente em Pi 10 mM, KCl 100 mM, imidazol 20 mM pH 7,0, DTT 0,2 mM e EDTA 0,2 mM, sendo a solução final do S1 estocada em 50% de glicerol no nitrogênio líquido, em alíquotas de 0,4 ml.

Para uso experimental a proteína foi dialisada novamente por 12 h em tampão contendo Hepes 50 mM pH 7,0, KCl 50 mM e DTT 0,5 mM, centrifugada a 330.000 x g a 4°C por 22 min e dosada usando $E_{1\%}^{280}=7,5$ (Muhlrad & Chaussepied, 1990).

3.3 Purificação de actina

A actina foi extraída segundo Pardee & Spudich (1982b) do músculo peitoral de galinha. Após limpar e moer o músculo, para cada 100 g, foi adicionado 300 ml do tampão contendo KCl 100 mM, KH_2PO_4 137 mM, K_2HPO_4 63 mM pH 6,5 e ficou sob agitação por 10 minutos. Em seguida a solução foi filtrada em gazes, essa foi desprezada. Ao não filtrado foi acrescentado 600 ml de NaHCO_3 50 mM a cada 100 g para retirar a troponina, tropomiosina, miosina e colocado sob agitação por 10 minutos. A solução foi filtrada novamente, descartando o filtrado, e ao não filtrado foi adicionado agora 300 ml de NaEDTA 1 mM para quelar íons. Em seguida a solução foi filtrada e repetido este passo novamente. Ao filtrado foi acrescentado 300 ml de

acetona para cada 100 g e colocado sob agitação por 10 minutos e filtrado novamente. O processo de filtragem com acetona foi repetido por 4 vezes. Por fim, o pó cetônico de actina foi deixado na capela para evaporar toda a acetona e estocado a 4°C.

3.4 Polimerização de actina

A actina foi extraída a partir do pó cetônico de actina (3 g) com tampão contendo Tris-HCl 2,5 mM pH 8,0; CaCl₂ 0,2 mM; ATP 0,2 mM e DTT 0,5 mM com volume final de 50 ml, sob agitação a 4°C por 10 minutos. Em seguida, foi centrifugada com 25.000 x *g* a 4°C por 10 min para extrair a actina para o sobrenadante. O resíduo do pó cetônico de actina passou por este processo por mais duas vezes. Em seguida, foi adicionado KCl 50 mM e MgCl₂ 2 mM ao sobrenadante (90 - 150 ml), que foi colocado sob agitação em temperatura ambiente por 2 h para a polimerização acontecer. Em seguida, foi adicionado 550 mM KCl para retirar troponina e tropomiosina, ficando sob agitação por mais 30 min. A mistura foi centrifugada com 165.000 x *g* a 4°C por 2 h para sedimentar a actina. O sobrenadante foi descartado e a actina filamentosa no sedimento foi lavada com 1 ml de tampão contendo imidazol 20 mM pH 7,0, KCl 6,5 mM, MgCl₂ 5 mM, K₂EGTA 0,5 mM, ATP 2 mM, azida 1,5 mM e DTT 1 mM por 3 vezes. Cada tubo com actina foi estocado com 1 ml deste mesmo tampão a 4°C. Para utilização da actina, o precipitado foi ressuspenso com o tampão no qual foi estocado e dosado pelo método colorimétrico com biureto (Gornall et al., 1949), comparada com o padrão de albumina de soro bovina. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 540 nm. O rendimento foi de aproximadamente 15 mg/ml e 6 ml.

Para os experimentos de cinética rápida a actina foi colocada em diálise por dois dias com troca de três vezes do tampão (1000 ml) contendo Tris-HCl 2 mM pH 8,0; ATP 0,2 mM; CaCl_2 0,2 mM; DTT 0,5 mM e azida 1 mM para despolimerização da actina. A actina despolimerizada foi levada à centrifugação com $125.000 \times g$ a 4°C por 75 min, e o sedimento descartado. Em seguida, colocou-se o sobrenadante novamente em diálise por 4 h em 1000 ml de tampão de polimerização (Tris-HCl 25 mM pH 7,5; KCl 100 mM; MgCl_2 2,5 mM; azida 3 mM e DTT 0,5 mM) na ausência de nucleotídeo (De La Cruz et al., 2000). Após a centrifugação com $125.000 \times g$ a 4°C por 75 min, o precipitado de cada tubo, foi ressuspensão com 1 ml de tampão de polimerização e utilizado no dia seguinte.

3.5 Marcação da actina com pireno

Para marcação da actina com pireno, usou-se o protocolo de Kouyama & Mihashi (1981). Após o protocolo de polimerização da actina, a F-actina foi ressuspensa com tampão de despolimerização (Tris-HCl 2 mM pH 8,0; ATP 0,2 mM; CaCl_2 0,2 mM; DTT 0,5 mM e azida 1 mM), homogeneizada no potter, obtendo-se 5-8 ml de actina, sendo posteriormente colocada em diálise por dois dias com troca de três vezes deste mesmo tampão para despolimerização da actina. A actina foi centrifugada com $125.000 \times g$ a 4°C por 75 min; o sobrenadante dialisado novamente por 2 horas no mesmo tampão, mas sem DTT, seguido de mais 2 h em tampão contendo Tris-HCl 25 mM pH 7,5; KCl 100 mM; MgCl_2 2,5 mM; ATP 0,3 mM e azida 3 mM para repolimerização. Essa actina foi diluída a 1 mg/ml e adiciona-se lentamente um excesso molar de 10 vezes de *N*-(1-pireno) maleimida diluída em dimetilformamida (DMF) (estoque a 10 mM). Submeteu-se a actina com pireno à agitação por 12 h a 4°C para a marcação da actina, protegida da luz. Após a

marcação, centrifugou-se a pireno-actina a 125.000 x g a 4°C por 75 min, o precipitado foi ressuspenso (5-6 ml) e colocado novamente em diálise 3x12 h com o tampão de despolimerização com DTT. Após despolimerização, a pireno-actina foi centrifugada a 125.000 x g a 4°C por 75 min, e o sobrenadante (4-5 ml) aplicado na coluna (3 x 32 cm - 140 ml) de gel filtração S-300 para retirar agregados e pireno livre, eluindo com tampão de despolimerização para obtenção da pireno-actina sem contaminantes, na forma de G-actina.

Para dosagem da actina marcada usou-se a seguinte equação:

$$\text{Pireno-actina } (\mu\text{M}) = (A_{290} - 0,127 * A_{344}) \times 37,5 \quad \text{Equação 3,}$$

baseada em Kouyama e Mihashi (1980).

E para dosagem do pirene foi utilizada a equação:

$$\text{Pireno } (\mu\text{M}) = A_{344} \times 45,5 \quad \text{Equação 4}$$

baseada em Kouyama e Mihashi (1980).

Para utilização da pireno-actina, a actina que saiu da coluna foi polimerizada por diálise por 4 h em tampão contendo Tris-HCl 25 mM pH 7,5; KCl 100 mM; MgCl₂ 2,5 mM; azida 3 mM; DTT 0,5 mM na ausência de nucleotídeo (De La Cruz et al., 2000). Centrifugou-se a actina com 125.000 x g a 4°C por 75 min e o pireno-actina foi ressuspenso com 0,5 ml de tampão de polimerização. Após a polimerização da pirene-actina, adicionou-se rodamina faloidina (0,1 mg) para estabilizar o polímero da pireno-actina. A actina apresentou 90 % de marcação com rendimento de aproximadamente 1 ml com 100 – 200 μM; com marcação de 1:1 (pireno:actina).

A polimerização da actina é mais favorável na ausência que na presença de ATP. A actina polimerizada na ausência de nucleotídeo apresenta uma afinidade ligeiramente menor para rodamina-faloidina comparado aos filamentos actina-ADP (De La Cruz et al., 2000).

3.6 Atividade Mg^{2+} ATPásica do acto-S1

O S1 (0,05 mg/ml) foi pré-incubado com ou sem actina (0,5 mg/ml) na presença ou ausência de fenol no meio de reação contendo KCl 20-600 mM; Hepes 50 mM (pH 7,0); $MgCl_2$ 5 mM durante 2 min a 25°C. Iniciou-se a reação com 3 mM de ATP e parada com ácido perclórico (0,1 N), contendo carvão ativado (Grubmeyer & Penefsky, 1981) após cada tempo de hidrólise. Após centrifugação a 1430 x g a 4°C por 25 min, o sobrenadante analisado pelo método colorimétrico de Taussky & Shorr (1953) para quantificação de fosfato inorgânico a 700 nm. Os valores dos brancos (ATP que não foi hidrolisado) foram subtraídos dos valores obtidos com as preparações com ATP hidrolisadas e multiplicadas pelo fator obtido da curva padrão de fosfato.

3.7 Co-sedimentação

O S1 (0,5 mg/ml) foi pré-incubado com actina (1 mg/ml) em condição de rigor (sem nucleotídeo) na presença e ausência de fenol (0,5%) no tampão contendo Hepes 50 mM (pH 7,0); $MgCl_2$ 5 mM; EGTA 1 mM; e KCl 20 ou 50 mM em volume final de 0,2 ml. Após 2 min, a reação centrifugada a 100.000 x g por 40 min a 4°C. O S1 do precipitado foi ressuspensão neste mesmo tampão com 0,18 ml. O S1 do precipitado e do sobrenadante foi quantificado por SDS-PAGE e densitometria.

Em condição de pontes fracas na interação acto-S1 (presença de ATP), após a formação deste complexo descrito acima, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão com o mesmo tampão (0,18 ml) na presença de 5 mM de ATP, na presença ou ausência de fenol. A reação centrifugada novamente a 100.000 x g a 4°C por 40 min. O S1 do precipitado ressuspensão neste mesmo

tampão (sem ATP) com 0,18 ml. O S1 dissociado no sobrenadante quantificado por SDS-PAGE e densitometria.

3.8 Eletroforese

As amostras foram preparadas com tampão de solubilização 2 vezes concentrado, com proporção de 1:1 (v/v); aplicaram-se ao gel SDS-PAGE a 12% de acrilamida, e separadas a 40 Amps por gel com corrente constante. Para quantificação das bandas, o gel foi corado com Coomassie Blue, escaneado e analisado através do programa Image Quant.

3.9 Espalhamento de luz no estado estacionário

Utilizou-se um espectrofluorímetro 6300 (Jasco Inc., MD, EUA), cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, com excitação em 405 nm, e emissão entre 350 – 450 nm, e fendas de excitação e emissão de 2,5 nm. O complexo acto (5 μ M) - S1 (2 μ M) foi incubado na presença ou ausência de fenol (0,5%) no tampão contendo Hepes 50 mM pH 7,0; $MgCl_2$ 5 mM; EGTA 1 mM; e KCl 20 mM. Para análise do efeito do fenol sobre pontes fracas, adicionou-se ATP 1 mM após formação do complexo de rigor com ou sem fenol. A leitura realizada de 30 em 30 segundos por 2,5 min. O valor do branco subtraído do valor obtido com proteína.

3.10 Fluorescência no estado estacionário

Foi utilizado o espectrofluorímetro 6300 (Jasco Inc., MD, EUA), cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm; com excitação em 365 nm e emissão entre 400 e 415 nm, e fendas de excitação e emissão de 2,5 nm. A pirene-actina (0,4 μ M) misturada com diferentes concentrações de S1 (0,4 – 20 μ M) na presença ou

ausência de fenol (0,5%) em tampão contendo Hepes 50 mM (pH 7,0); $MgCl_2$ 5 mM e KCl 20 mM. O valor do branco subtraído do valor obtido com proteína.

3.11 Cinética rápida

Para os experimentos de cinética rápida utilizou-se um instrumento *stopped-flow* (Applied Photophysics SX17MV, UK), com comprimento de onda de excitação em 365 nm, com filtro de 387 nm para cortar os sinais anteriores a este comprimento de onda, permitindo um sinal de fluorescência de boa intensidade acima de 387 nm, segundo Kouyama e Mihashi (1981), a 21°C.

Para análise da associação acto-S1, foram empregados pireno-actina 0,2 μM , e variadas concentrações de S1 (1-10 μM) com ou sem fenol 0,5%, com tampão contendo Hepes 50 mM pH 7,0, KCl 150 mM e $MgCl_2$ 5 mM. Nos experimentos de dissociação usaram-se pireno-acto-S1 a 0,4 μM na presença ou ausência de fenol 0,5%, ATP 40 μM e KCl 20 mM quando dissociado por ATP ou pireno-acto-S1 a 0,4 μM na presença ou ausência de fenol 0,5%, actina não marcada 10 μM e KCl 150 mM quando dissociado por actina não marcada. Outros componentes no tampão foram Hepes 50 mM pH 7,0, $MgCl_2$ 5 mM. Nos experimentos de afinidade do pireno-acto-S1 ao ADP foram utilizadas pireno-actina-S1 0,5 μM , ATP 40 μM e ADP 0 – 1500 μM no tampão descrito acima com KCl 150 mM. O volume inicial de cada seringa foi de 1 ml, com ejeção a cada corrida de 100 μl . As concentrações das proteínas e dos nucleotídeos referem-se aos valores obtidos após diluição.

Para cada experimento foram utilizadas três preparações de proteína (S1) diferentes, com 5 a 10 corridas para cada ponto. Todos os experimentos aconteceram em velocidades maiores que o tempo morto do aparelho, sendo possível analisar e retirar a constante observada das curvas obtidas.

Nos experimentos de associação do complexo pireno-acto-S1 e dissociação deste mesmo complexo por actina não marcada, foi realizado um controle com a adição de apirase à pireno-actina para retirar qualquer contaminante de ATP. O tratamento com apirase não alterou o sinal.

O filtro com *cut-off* de 387 nm foi obtido através de uma lente de óculos, cortada com diâmetro de 25 mm e espessura de 1,5 mm. Foi verificado o *cut-off* através da medida de transmitância no espectrofotômetro de varredura (Figura 13). O sinal de fluorescência foi mensurado a um ângulo de 90° à luz de excitação e o filtro colocado entre a célula ótica e o detector do *stopped-flow*.

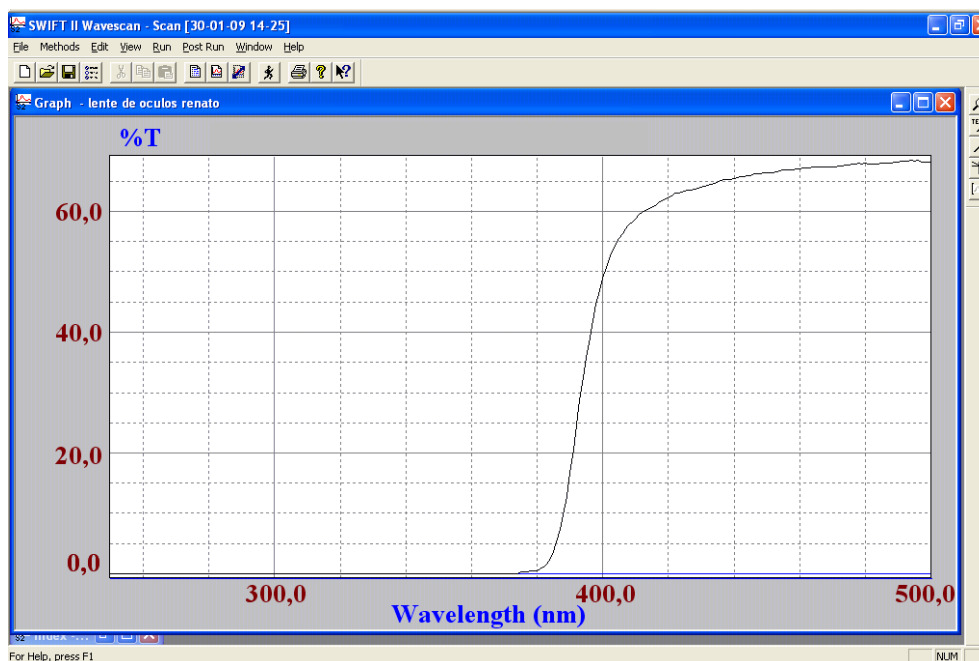


Figura 13: Transmitância do filtro utilizado para os experimentos de cinética rápida.

3.12 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os dados de RMN foram adquiridos a 25°C em um espectrômetro Bruker Avance III 800 operando a 800.22 MHz no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas do Instituto de Bioquímica da UFRJ.

Para análise da afinidade do fenol com o S1 foram realizaram-se os experimentos de Diferença de Transferência de Saturação (STD), utilizando a sequência de pulso stddiffgp19, com sequência de supressão da água 3-9-19 com gradiente (Watergate) (Piotto et al., 1992). Os espectros homonucleares foram adquiridos como um pseudo 2D, com tempos de saturação de 1, 2 e 3 s. Foi utilizado 20 μM S1, 300 – 2400 μM (0,003 – 0,022 %) fenol, num tampão contendo 10 mM ^2H Tris (pH 7,0), 20 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 100% D_2O .

Outro experimento utilizado para analisar a afinidade do fenol para o S1, foi a medida do Coeficiente de Difusão Translacional (DOSY), utilizando a sequência bipolar com eco estimulado - stebpgp1s19 com sequência Watergate. Espectros homonucleares foram obtidos em 2D, utilizando gradiente de 0 a 30 G/cm com tempo de difusão de δ de 4 ms e Δ de 50 ms, com 80 ms de tempo de mistura e 16 repetições. Usaram-se 20 μM S1, 300 – 2400 μM (0,003 – 0,022 %) fenol, no mesmo tampão descrito acima. Os valores de intensidade do sinal em função da potência do gradiente de campo magnético (g) foram utilizados na equação 5 (Stejskal & Tanner, 1965), para calcular o coeficiente de difusão D, empregando o auto-programa de DOSY para o cálculo:

$$I = I_0 \exp(-Dy^2g^2\delta^2(\Delta-\delta/3)) \quad \text{Equação 5,}$$

em que I representa pico da intensidade; I_0 é o pico da intensidade inicial; D é o coeficiente de difusão; g é o gradiente aplicado; y é o constante magnetogírica; δ é a duração do pulso de gradiente; Δ é o tempo de difusão.

Com o objetivo de detectar qualitativamente a interação do S1 com o fenol, empregou-se um experimento de Espectroscopia de Correlação Heteronuclear de um Quantum (2D [^{13}C ^1H] HSQC) com pré-saturação; para o S1 foram usados 1024 pontos complexos em t_2 e 100 pontos complexos em t_1 obtidos usando o método

States-TPPI com 64 repetições. Para o S1 com fenol foram usados 1024 pontos complexos em t_2 e 200 pontos complexos em t_1 obtidos, empregando-se o método States-TPPI com 128 repetições.

Na tentativa de identificar o(s) sítio(s) da proteína que sofreu (sofreram) perturbação do deslocamento químico provocado pelo fenol obtidos no espectro de HSQC, foram utilizados experimentos de 1D TOCSY e 1D NOEDIFF. Neste experimento, a proteína foi excitada seletivamente nas frequências de 673,48; 645,74; 621,08; 1576,59; 1504,59; 2977,50; 619,54; 3456,80; 2328,00; 3455,24 e 5474,06 Hz. O 1D TOCSY seletivo foi adquirido substituindo-se o primeiro pulso por um pulso seletivo de 50 ms formato gaussiano; 800 repetições. O 1D NOEDIFF foi obtido com tempo de saturação de 500 ms e 1 s; tempo de relaxação de 1,5 s e pulso de saturação de 9,13 Hz; 2048 repetições. Foram utilizados 80 μ M S1 e 170 μ M (0,002 %) fenol no tampão já descrito. Utilizou-se uma tabela de estatística calculada para os deslocamentos químicos selecionados dos átomos dos 20 aminoácidos (Biological Magnetic Resonance Data Bank – http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/statsel.htm)

O modelo de S1 de músculo esquelético de coelho (acesso NP_001103286 no pubmed protein) foi feito com base na estrutura de S1 de *Dictyostelium discoideum* (1FMV) (Bauer et al., 2000), utilizando o programa SWISS MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>). Foi utilizado o módulo “alignment interface” e o alinhamento feito utilizando o programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Os dois aminoácidos desconhecidos (marcados como x) da sequência de coelho foram excluídos.

```
Coelho      MRKDADMAIFGEAAPYLKSEKERIEAQNKPFDAKSSVVFVADPKE--SFVKATVQSREGG 58
1FMV- A    --MNPiHDRTSDYHKYLKVKQGSDLFKLTVSDKRYIWYNPDPKERDSYECGEIVSETSD 58
           :.      .:  **: .: :   : . * :   : .**** * :   . : * . . .

Coelho      KVTAKTEAGATVTVKEDQVFPMPNPKYDKIEDMAMMTHLHEPAVLYNLKE-YAAWMIYTY 117
1FMV- A    SFTFKTVVDGQDRQVKKDDANQRNPIKFDGVEDMSELSYLNPAVFNLRVRYNQDLIYTY 118
```


	..* ** *	**:* .	** *:*	***: .	:::*****:***:	*	:****
Coelho	SGLFCVTVNPNYKWLVPVYNAEVVTAYRGKKRQEAPPHIFSISDNAYQFMLTDRENQSILIT	177					
1FMV- A	SGLFLVAVNPFKRIPIYTOEMVDIFKGRRRNEVAPHIFAISDVAYRSMLDDRQNSLLIT	178					
	**** *:****:*	:::* .	*:*	:::*****: .	*****:***	**	** *:****:***
Coelho	GESGAGKTVNTRKVIQYFATIAVTGDKKKEEATSGKMQGTLEDQIISANPLLEAFANAKT	237					
1FMV- A	GESGAGKTENTKKVIQYLASVAG-----RNQANG---SGVLEQQILQANPILEAFGNAKT	230					
	*****	**:****:*:	*	:::* .	* .	**:****: .	*****:****
Coelho	VRNDNSSRFGKFIIRIHFGTTGKLASADIETYLLEKSRVTFQLKAERSYHIFYQIMSNNKP	297					
1FMV- A	TRNNSSRFGKFIIEIQFNAGFISGASIQSYLLEKSRVVFQSETERNYHIFYQLLAGATA	290					
	.**:****** .	** .	::* .	::* .	:::***** .	**	::** .
Coelho	DLIEMLLITNPNYDIAFVSQ-GEITVPSIDDEELMATDSAIDILGFTSDERSVIYKLTG	356					
1FMV- A	EEKKALHLAG-PESFNYNLQSGCVDIKGVSDSEEFKITRQAMDIVGFSQEEQMSIFKIIA	349					
	: : *	:: *	::: *	::: *	::: *	::: *	::: *
Coelho	AVMHYGNMFKQKQREEQAEPDGEVADKAAYLQSLNSDLLKALCYPRVKVGNFYVTKGQ	416					
1FMV- A	GILHLGNIKFEKGAGEGAVLKDKTALNAASTVFGVNPVLEKALMEPRILAGRDLVAQHL	409					
	.::** *:****: .	*	* *	:: :	* * *	**:	* .
Coelho	TVQQVYNAV GALAKAVYEKMF LWMVTRINQQLDTKQPRQYFIGVLDIAGFEIFDFNSLEQ	476					
1FMV- A	NVEKSSSRDALVKALYGRFLWLWVKKINNVLCQER-KAYFIGVLDISGFEIFKVNSEFQ	468					
	.*:: .	: ** .	**:*	::**:*	::**:*	*	:: : *****:***** .
Coelho	LCINFTEKLLQFFNHMFVLEQEEYKKEGIEWEFIDFGMDLAACIELIE--KPMGIFSI	534					
1FMV- A	LCINYNEKLLQFFNHMFVLEQEEYKKEGIEWEFIDFGMDLAACIELIE--KPMGIFSI	528					
	****:*****	:*****	** *:*	*****:*	* *:*	:*	**:::
Coelho	LEEECMFPKATDTSFKNKLYEQLGKSNFQKPKPAKRKVEAHFSLVHYAGTVDYNITGW	594					
1FMV- A	LDEQSVFPNATDNTLITKLHSHFSKKNAYEPRFSK----TEFGVTHYAGQVMYEQDW	584					
	: .	::**:*	::* .	::**:*	::* .	::**:*	** * .
Coelho	LDKNKDPLNETVVGlyQKSAMKTLAFLFTGTAAAEAGGGKGGKGGSSFQTVSALFRE	654					
1FMV- A	LEKNKDPLQDLELCKFDSSDNVVTKLFNDPNIASR-----AKKGANFITVAAQYKE	636					
	*:*****:	::* .	::**:	::**:	** .	*	***: .
Coelho	NLNKLMTNLRTHSPHFVRSIIPNETKTPGAMEHELVLHQLRCNGVLEGRICRKGFPNRI	714					
1FMV- A	QLASLMATLETNPHFVRCIIPNNKQLPAKLEDKVLDQLRCNGVLEGRITRKGFPNRI	696					
	:* .	** .	* .	*****:***:	::* .	::**:	*****:*****
Coelho	LYADFKQRYKVLNASAIPEGQFIDSKKASEKLLGSIDVDHTQYKFGHTKVFFKAGLLGLL	774					
1FMV- A	IYADFKRYLLAPNVPRDAE--DSQKATDAVLKHLNIDPEQYRFGITKIFFRAGQLARI	754					
	:****	**	* .	:::	*****:*	::**	**:****:*** .
Coelho	EEMRDDK	781					
1FMV- A	EEAREPN	761					
	**	*:	:	:	:	:	:

3.13 Reagentes

Os reagentes utilizados foram: Hepes, Tris, ²H Tris, pirene-iodoacetamida, ATP, ADP, acrilamida, DMF e DTT da Sigma Aldrich; MgCl₂, CaCl₂, KCl, KOH, KH₂PO₄, azida, acetona e imidazol da Vetec; fenol da Merck; rodamina faloidina da

Invitrogen; SDS da Calbiochem; SephacrylTM S-300 high resolution da GE Healthcare; D₂O; e membrana de diálise de 12 KDa de corte.

3.14 Análise dos resultados

Expressaram-se todos os resultados como média e erro padrão do número de experimentos com proteínas diferentes. Os experimentos foram obtidos usando as equações específicas para cada análise no programa Sigma Plot 10.0 (Jandel Scientific).

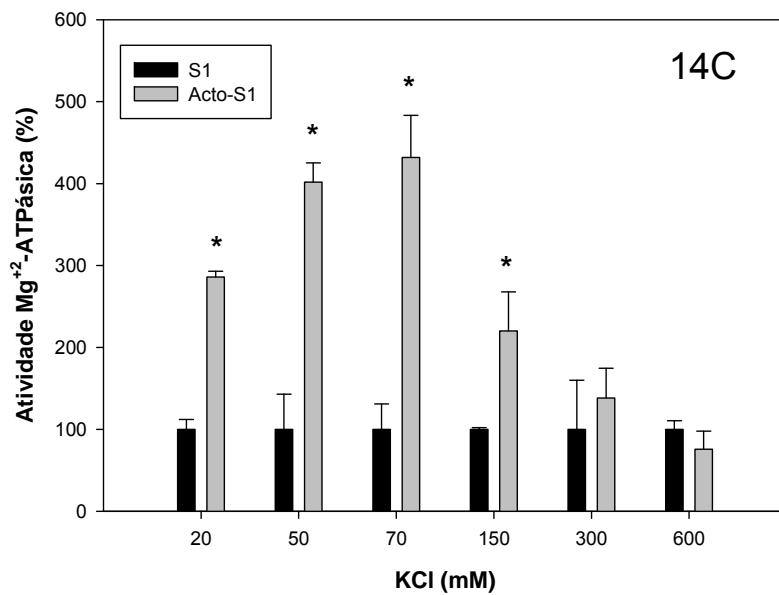
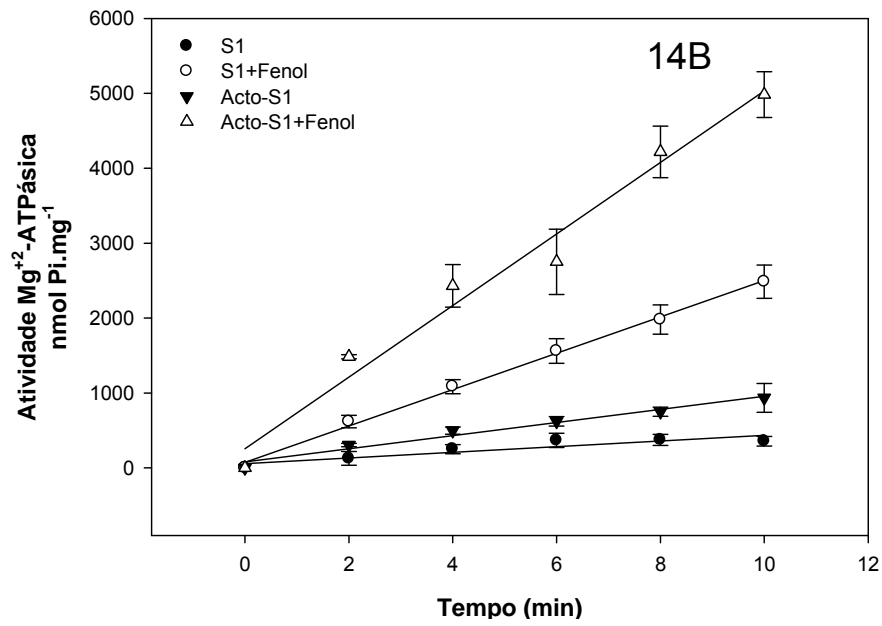
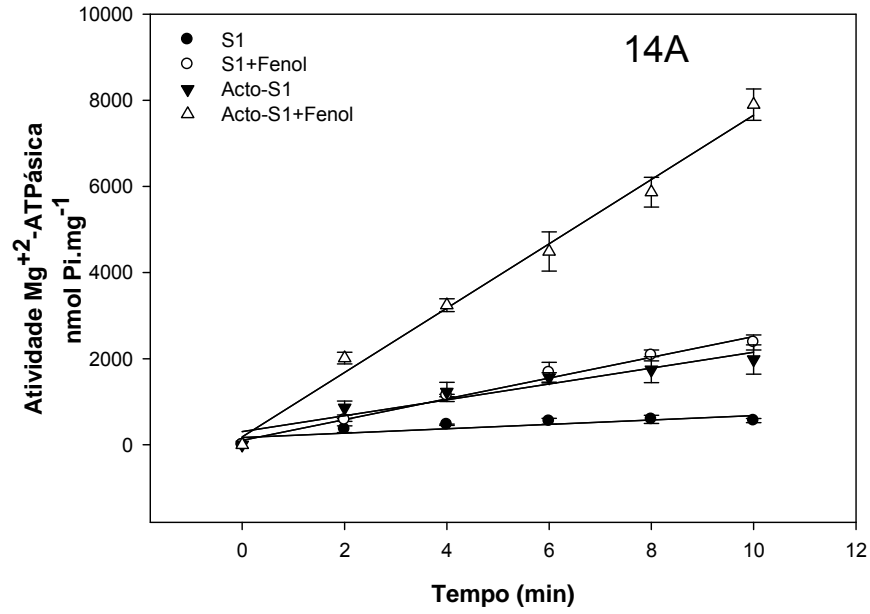
As equações para analisar ligação e isomerização do ATP ao complexo acto-S1 e afinidade do ATP ao complexo acto-S1 foram criadas no Sigma Plot de acordo com as equações retiradas do Iorga et al. (2007) e Shaw et al. (2003). Todos os dados analisados através do teste t pareado de Student no programa Sigma Plot usando $p < 0,05$ como critério para diferença significativa.

4. RESULTADOS (parte 1a)

4.1 Ação do fenol sobre a atividade Mg^{2+} ATPase actina-ativada.

A concentração de KCl foi diversificada com o objetivo de verificar se o fenol afeta a atividade Mg^{2+} ATPase actina-ativada no estado estacionário mesmo em baixas concentrações de KCl, em que o S1 é fortemente ligado à actina (Conibear, 1999; Katoh & Morita, 1996). O fenol promoveu um efeito ativador tanto na atividade Mg^{2+} ATPásica do S1 como na Mg^{2+} ATPásica actina-ativada do S1 (Figura 14A e 14B). Esta ativação provocada pelo fenol foi dependente de KCl na atividade Mg^{2+} ATPásica do S1 (Figura 14D) e ocorreu em todas as concentrações de KCl usadas neste experimento, na atividade Mg^{2+} ATPásica actina-ativada do S1 (Figura 14E).

Em concentrações maiores de KCl ocorre a redução de afinidade entre miosina e actina, conseqüentemente perdendo a ativação da atividade Mg^{2+} ATPásica do S1 promovida pela actina (Conibear, 1999), como verificado no controle (Figura 14C). O fenol promoveu uma ativação na atividade Mg^{2+} ATPásica actina-ativada do S1 mesmo em altas concentrações de KCl (Figura 14E), diferente do efeito com S1 sozinho, sugerindo que o fenol, de alguma maneira, favoreça a ativação pela actina.



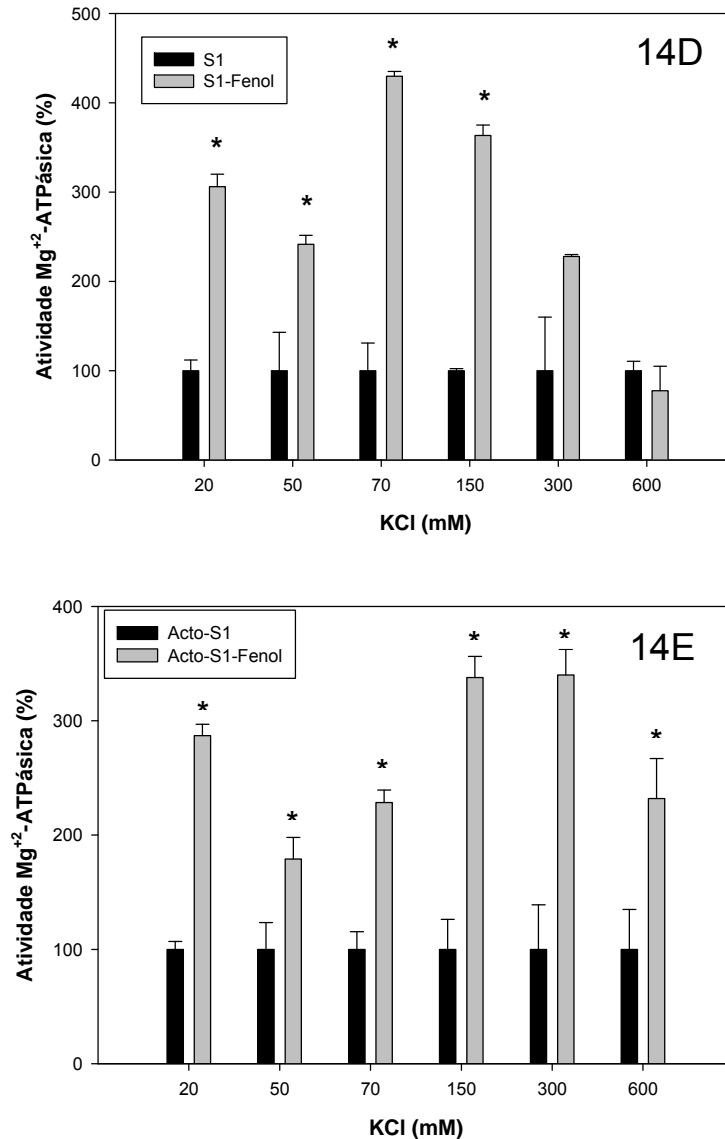


Figura 14: Efeitos do fenol na atividade S1-Mg²⁺-ATPásica e S1-Mg²⁺-ATPásica actina-ativada, variando a concentração de KCl. Condições: Fenol 0 ou 0,5%; actina 0 ou 0,5 mg/ml; S1 0,05 mg/ml; HEPES 50 mM (pH 7,0); MgCl₂ 5 mM. As proteínas foram pré-incubadas no meio de reação com ou sem fenol durante 2 min à 25°C. A reação foi iniciada com ATP 3 mM e parada com ácido após 2 a 10 min de hidrólise, (A) na presença de KCl 20 mM; (B) na presença de KCl 50 mM; (C, D e E) Atividade com 6 minutos de hidrólise na presença de KCl 20-600 mM, onde o painel C corresponde ao efeito do KCl na ausência de fenol, o painel D ao efeito do fenol sobre a atividade Mg²⁺-ATPásica do S1 e o painel E ao efeito do fenol sobre a atividade Mg²⁺-ATPásica actina-ativada. (X±SE; n=3). * teste-t pareado p < 0,05 em relação ao controle sem fenol ou, no C, sem actina. Os valores na ausência de fenol foram consideradas como 100%, e em C sem actina. O valor absoluto da atividade do S1 apresentou uma média de 84 nmol Pi.mg⁻¹/min para todas as concentrações de KCl e da atividade acto-S1 apresentou um efeito bifásico, com 419 nmol Pi.mg⁻¹/min com KCl 50 mM, reduzindo a 63 nmol Pi.mg⁻¹/min com KCl 600 mM.

4.2 Efeito do fenol na interação acto-S1

Após análise da atividade da Mg^{2+} -ATPase actina-ativada, na qual o fenol promove um efeito ativador, o próximo passo foi verificar se o fenol estaria, portanto, interferindo na interação entre estas proteínas. Para esta análise foram utilizadas as ferramentas de co-sedimentação, espalhamento de luz e fluorescência.

Nos experimentos de co-sedimentação, a ultracentrifugação do complexo acto-S1 na ausência de ATP, faz com que a actina se sedimente, levando consigo o S1 ligado a ela. Entretanto, a presença de ATP em concentração saturante, leva à dissociação do complexo acto-S1, de modo que grande parte do S1 fica no sobrenadante, ficando no precipitado somente o S1 que não foi dissociado da actina.

O fenol alterou a formação do complexo acto-S1 quando a proteína foi incubada em 20 mM KCl, apresentando menor quantidade de S1 no sobrenadante (Figura 15A e 15B), o que representa uma maior interação acto-S1 na presença do fenol em condições de rigor. Não foi detectado um efeito significativo na presença de ATP (Figura 15C).

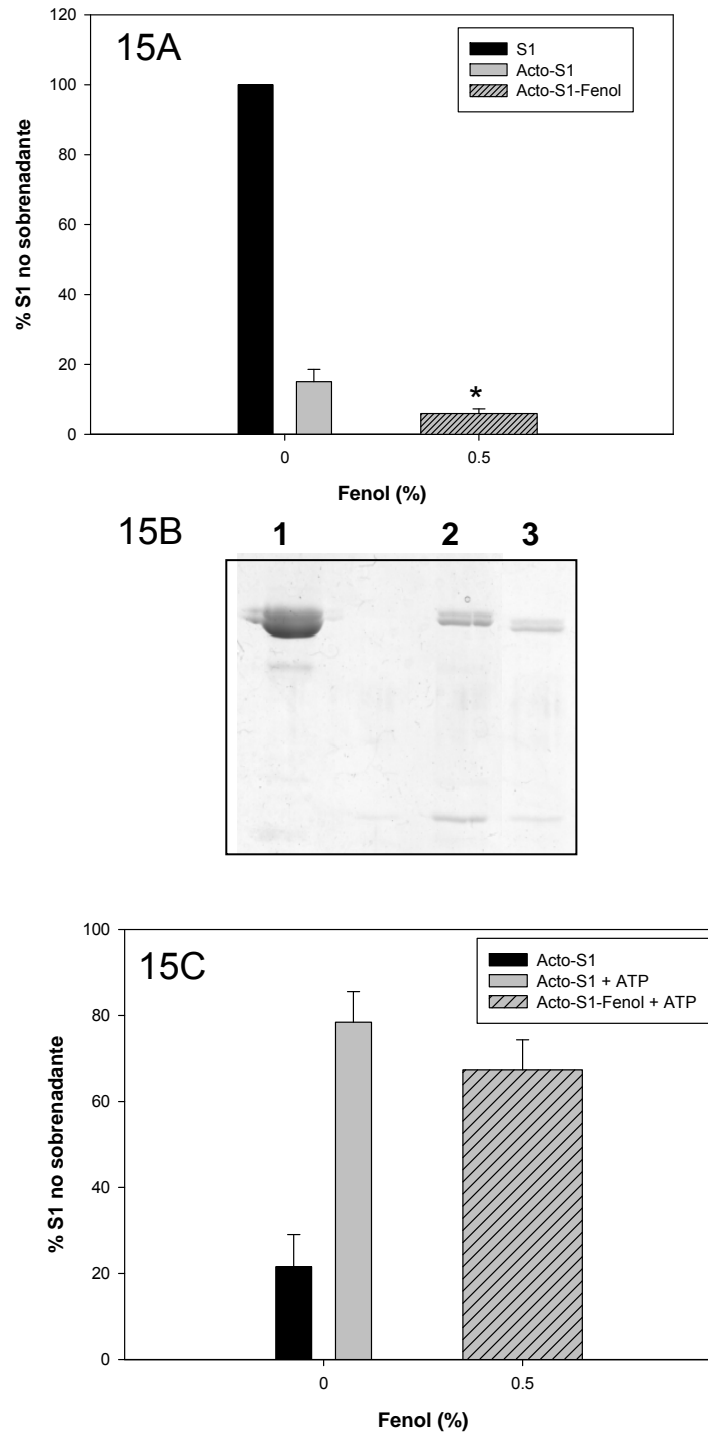


Fig.15: Efeito do fenol sobre a associação acto-S1 por Co-sed. Condições: Hepes 50 mM (pH 7,0); $MgCl_2$ 5 mM; EGTA 1 mM; KCl 20 mM. O S1 (0,5 mg/ml) foi pré-incubado com actina (1 mg/ml) com e sem fenol (0,5%). (A) Na ausência de ATP; (B) Gel demonstrando o resultado em A, que mostra sobrenadantes (lane 1 S1, lane 2 S1 sem fenol, lane 3 S1 na presença de fenol). A banda superior é do S1; a banda inferior não foi identificada. (C) Após formação do complexo na ausência de fenol, o precipitado foi ressuspensão com tampão contendo ATP 5 mM na presença ou ausência de fenol. Em seguida, foi centrifugado novamente. O S1 no sobrenadante sem fenol, na ausência de actina, considerado como 100%. O S1 no sobrenadante não ligado à actina analisado por SDS-PAGE e densitometria. * teste *t* para $p < 0,05$ em relação ao controle sem fenol ($X \pm SE$; $n=6$).

Conforme mostrado na literatura (Muhlrad, 1991), a formação do complexo acto-S1 aumenta o espalhamento de luz, o que indica partículas maiores. Esse efeito é mais rápido e muito mais pronunciado na presença de fenol, sem ATP, evidenciando que mais moléculas de S1 interagiram com actina, o que demonstra uma maior interação entre estas proteínas na presença de fenol (Figura 16A). Podemos observar que as proteínas, analisadas, separadamente, na presença ou ausência de fenol, o espalhamento de luz é muito pequeno, quando comparado após formação do complexo entre as proteínas (Figura 16A). Não há efeito de fenol quando em presença de 1 mM de ATP (Figura 16B).

Nos experimentos de fluorescência, a pireno-actina (0,4 μ M) foi titulada com variadas concentrações de S1 (0,4-20 μ M) para análise da afinidade. Com a ligação da pireno-actina com S1, ocorre redução da fluorescência (o S1 liga a actina na região entre o subdomínio 1 e 2), e, portanto, conforme aumenta a concentração de S1, mais moléculas de pireno-actina se ligam ao S1, levando à maior redução da fluorescência (Criddle et al., 1985; Kouyama & Mihashi, 1981). O fenol (0,5%) promoveu uma maior associação entre pireno-actina e S1, visto pela queda de fluorescência da pireno-actina, proporcionalmente mais acentuada em menores concentrações de S1 comparada ao controle (Figura 17).

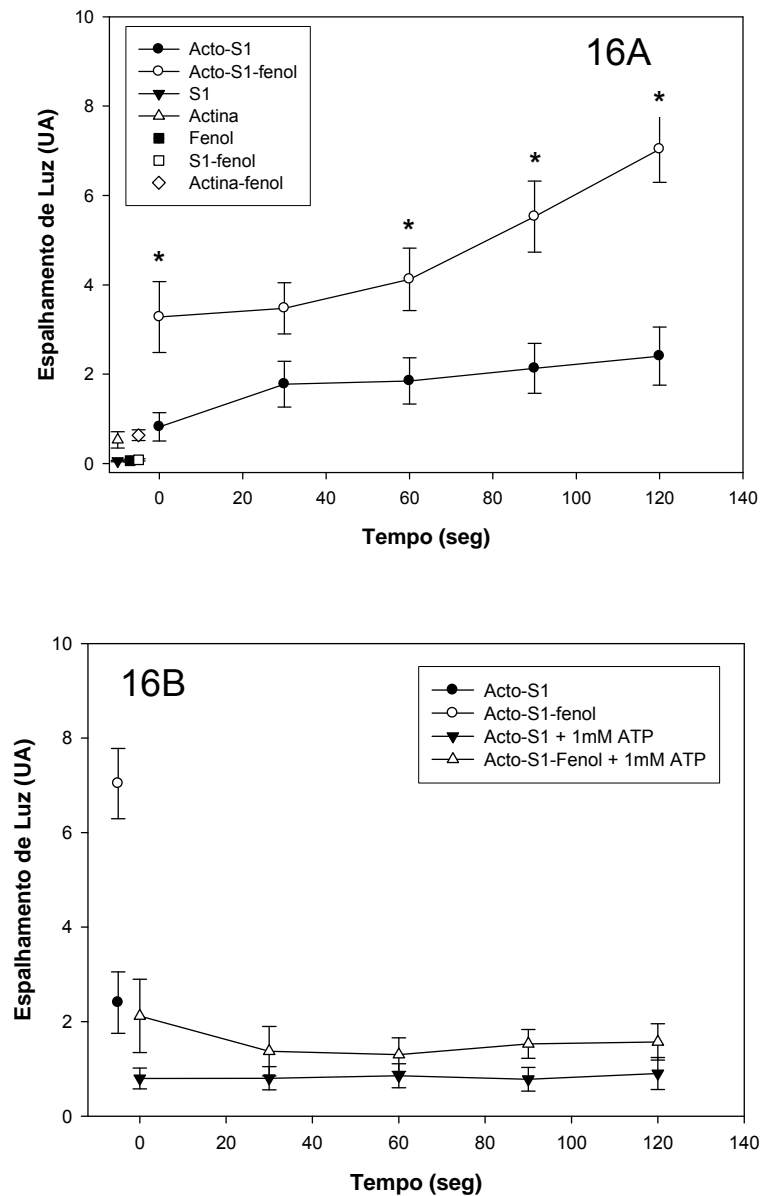


Fig.16: Espalhamento de luz: Condições do experimento: fenol 0 ou 0,5%; actina 5 μM ; S1 2 μM ; KCl 20 mM; Hepes 50 mM (pH 7,0); MgCl_2 5 mM. O S1 foi pré incubado com actina na presença ou ausência de fenol. (A) sem ATP; (B) após formação do complexo, foi adicionado 1 mM de ATP. A formação do complexo acto-S1 monitorada por 2 min (um espectro a cada 30 segundos). Comprimento de onda de excitação de 405 nm, varrendo de 350 – 450 nm. * teste *t* para $p < 0.05$ em relação ao controle sem fenol ($X \pm \text{SE}$; $n=5$).

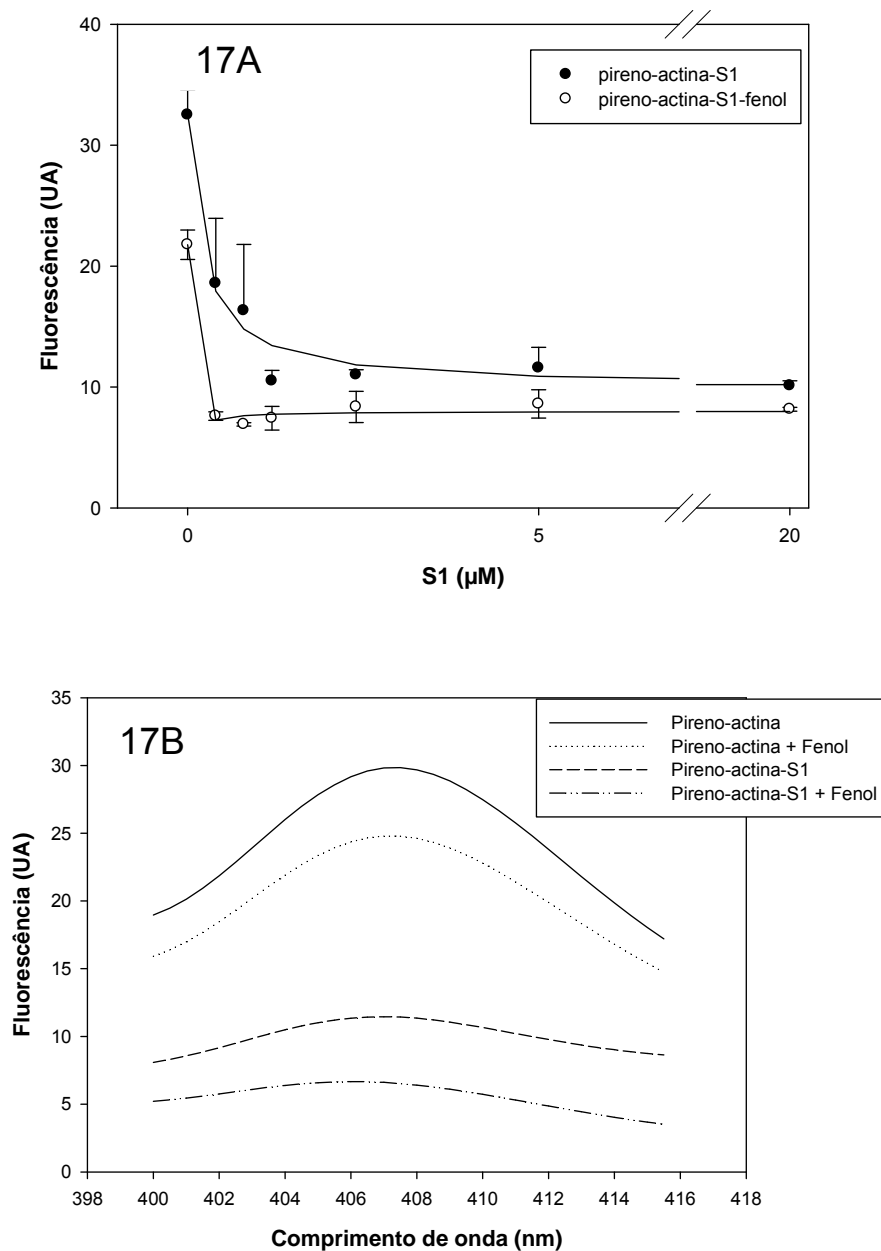


Fig.17: Fluorescência: Associação picro-acto-S1 na presença de fenol (0,5%). Fenol promoveu redução da fluorescência da picro-actina após formação do complexo com S1 em diferentes concentrações. No painel A, média de 3 experimentos. No painel B, um exemplo do sinal de fluorescência com S1 1,2 µM. Condições do experimento: fenol 0 ou 0,5%; picro-actina 0,4 µM; S1 0,4 – 20 µM; KCl 20 mM; Hesper 50 mM (pH 7,0); MgCl₂ 5 mM. Excitação: 365 nm ($X \pm SE$; n=3). Equação utilizada para retirar a constante de afinidade foi $y = y_0 + ae^{-bx}$.

A atividade Mg^{2+} ATPase actina-ativada do S1 sofreu uma ativação significativa na presença do fenol, mesmo em concentrações altas de KCl, o que sugere uma promoção de maior interação entre actina e S1. Essa hipótese foi apoiada nos experimentos de co-sedimentação, espalhamento de luz e fluorescência (titulação da pireno-actina com S1) no estado de rigor. No entanto, não observou-se maior interação na presença de ATP.

O próximo passo foi analisar em qual das etapas do ciclo catalítico poderia estar ocorrendo um efeito provocado pelo fenol, para justificar seu efeito na atividade Mg^{2+} -ATPase actina-ativada no estado estacionário. Para esta análise empregou-se actina marcada com pireno, possibilitando a análise das etapas que ocorrem em milissegundos a segundos no aparelho de cinética rápida.

4.3 Cinética de ligação do S1 à pireno-actina (k_{-5})

O S1 foi colocado em uma seringa com ou sem fenol e a pireno-actina em outra seringa com ou sem fenol. A velocidade de ligação entre pireno-actina e S1 na presença ou na ausência de fenol foi verificada em 2 segundos em um meio contendo 150 mM KCl, em que a afinidade entre actina e S1 é menor quando comparada a concentrações menores de KCl, para permitir análise da velocidade de ligação.

A ligação entre S1 e pireno-actina acontece em duas fases, uma fase rápida (k_{-5} rápida - interação entre actina e S1) e uma fase lenta (k_{-5} lenta – outras moléculas (actina e S1) vão se associando, mais lentamente, comparada ao primeiro momento), com amplitude destas fases de 2:1 respectivamente. Seguindo Shaw et al., (2003) a fase rápida foi usada para calcular a associação. As constantes de segunda ordem são obtidas do gradiente do ajuste linear entre as constantes

observadas e a concentração de S1. Não detectou-se diferença significativa na velocidade de formação do complexo pireno-acto-S1 entre o controle e o fenol, com k_{-5} de 2.63 ± 0.6 e $3.35 \pm 0.3 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ respectivamente (Figura 18B).

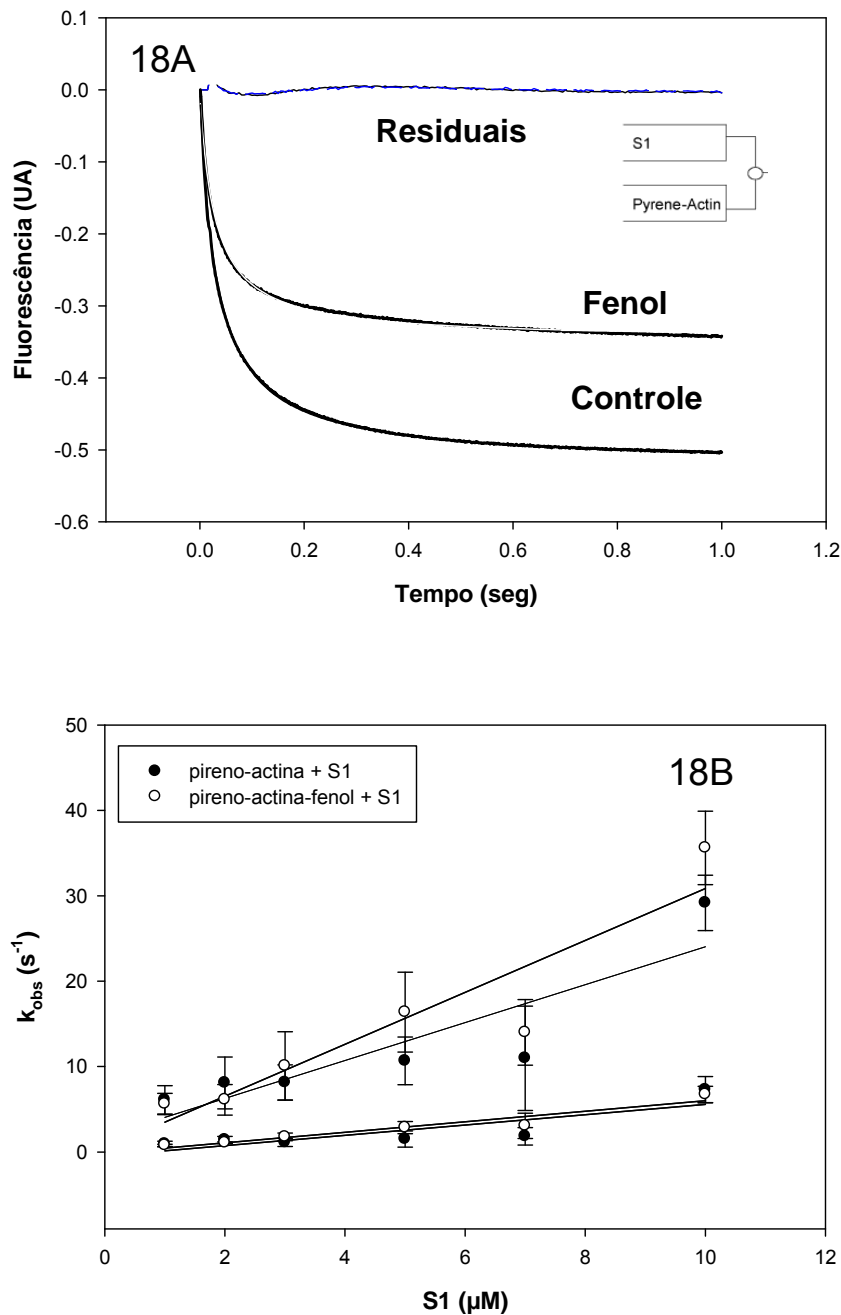


Fig.18: Associação da pireno-actina com S1 na presença de fenol (0,5%) por cinética rápida. Em A, sinal de fluorescência obtido no experimento com ajuste de dupla exponencial do controle e do fenol com S1 (1 μM). A k_{obs} da fase 1 foi 8,11 s^{-1} para ambos, com amplitudes 0,299 e 0,229 para o controle e fenol respectivamente, e a k_{obs} da fase 2 foi 1,11 e 0,78 s^{-1} com amplitude de 0,181 e 0,097 para controle e fenol respectivamente. As curvas residuais representadas acima, controle (preto) e fenol (azul). Em B, velocidade (k_{obs}) da associação pireno-actina com diferentes concentrações de S1. Condições do experimento: fenol 0 ou 0,5%; pireno-actina 0,2 μM após diluição; S1 1-10 μM após diluição; KCl 150 mM; Hepes 50 mM (pH 7,0); MgCl₂ 5 mM; 21°C. Excitação: 365 nm e filtro com *cut-off* 387 nm. ($X \pm SE$; n=3). Equação utilizada para obter k_{obs} foi $y = y_0 + ae^{-bx} + ce^{-dx}$ e para obter k_{-5} foi $y = y_0 + ax$.

4.4 Cinética de dissociação da pireno-actina do S1 por actina não marcada (k_{+5})

O complexo pireno-actina-S1 foi colocado em uma seringa com ou sem fenol e a actina não marcada em outra seringa na presença ou na ausência de fenol. A pireno-actina e a actina não marcada foram dialisadas previamente contra um tampão de polimerização na ausência de ATP, para evitar qualquer contaminação de ATP na dissociação do complexo provocada por actina não marcada.

Verificou-se a dissociação do complexo pireno-acto-S1 por competição com excesso de actina não marcada durante 20 segundos, dando uma constante de velocidade de dissociação (k_{+5}) de $0,205 \pm 0,015 \text{ s}^{-1}$ para o controle e $0,275 \pm 0,012 \text{ s}^{-1}$ na presença de fenol ($p < 0,05$) (Figura 19).

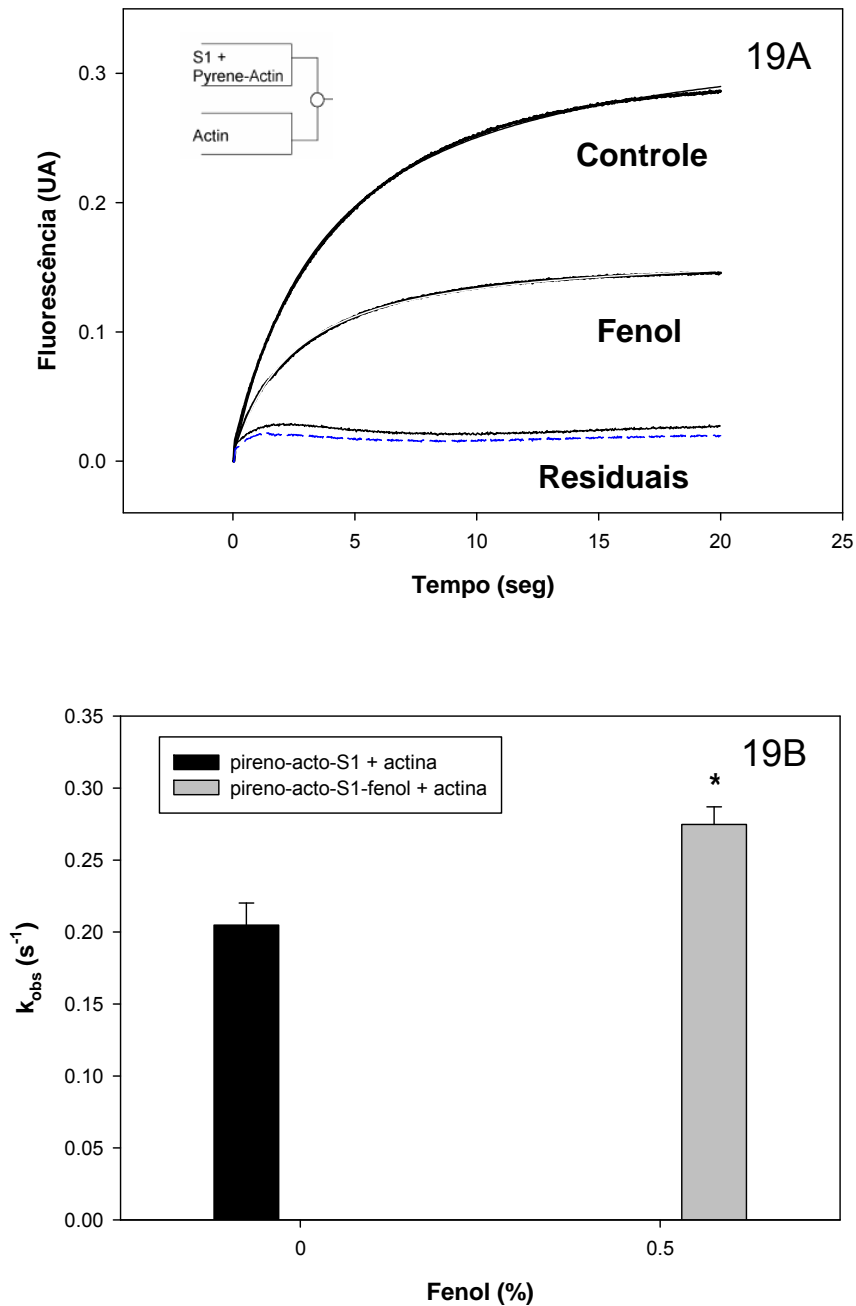


Fig.19: Dissociação da pireno-actina-S1 na presença e ausência de fenol (0,5%) por actina não marcada. Em A, sinal de fluorescência obtido no experimento com ajuste de uma exponencial simples com k_{obs} de 0,22 e 0,28 s^{-1} , com amplitude de 0,263 e 0,126 para o controle e fenol respectivamente. As curvas residuais representadas abaixo, controle (preto) e fenol (azul). Em B, velocidade (k_{obs}) de dissociação do complexo acto-S1 por 10 μM de actina não marcada. Condições do experimento: fenol 0 ou 0,5%; pireno-actina 0,4 μM ; S1 0,4 μM ; actina 10 μM ; KCl 150 mM; Hesper 50 mM (pH 7,0); $MgCl_2$ 5 mM; temperatura 21°C. A concentração das proteínas refere após a diluição. Excitação: 365 nm com filtro 387 nm. * teste *t* pareado para $p < 0.05$. ($X \pm SE$; $n=3$). Equação utilizada para obter k_{obs} foi $y = y_0 + ae^{-bx}$.

4.5 Cinética de ligação e dissociação da pireno-acto-S1 por ATP

O complexo pireno-acto-S1 foi colocado em uma seringa na presença ou ausência de fenol e na outra seringa ATP com ou sem fenol. A variação da concentração de ATP, permite, em baixas concentrações, a análise da ligação do ATP (K_1) ao complexo pireno-actina seguida pela dissociação, e em concentrações maiores de ATP permite a análise de k_{+2} , a isomerização do acto-S1.ATP que ocorre antes da dissociação da actina. Essas constantes são obtidas através do ajuste da equação 1 aos dados da Fig. 20B. O fenol causou uma grande redução da taxa de isomerização do complexo pireno-acto-S1 provocado por ATP, com $k_{+2} = 211,3 \pm 16,9 \text{ s}^{-1}$ para fenol e $348,5 \pm 21,2 \text{ s}^{-1}$ para o controle apresentando diferença significativa por teste *t* pareado com $p < 0,05$; e um pequeno aumento da afinidade do ATP para o complexo pireno-actina-S1 com $1/K_1$ de $58,4 \pm 11,4 \text{ } \mu\text{M}$ e $35,1 \pm 5,0 \text{ } \mu\text{M}$ para o controle e fenol respectivamente ($p > 0,05$) (Figura 20).

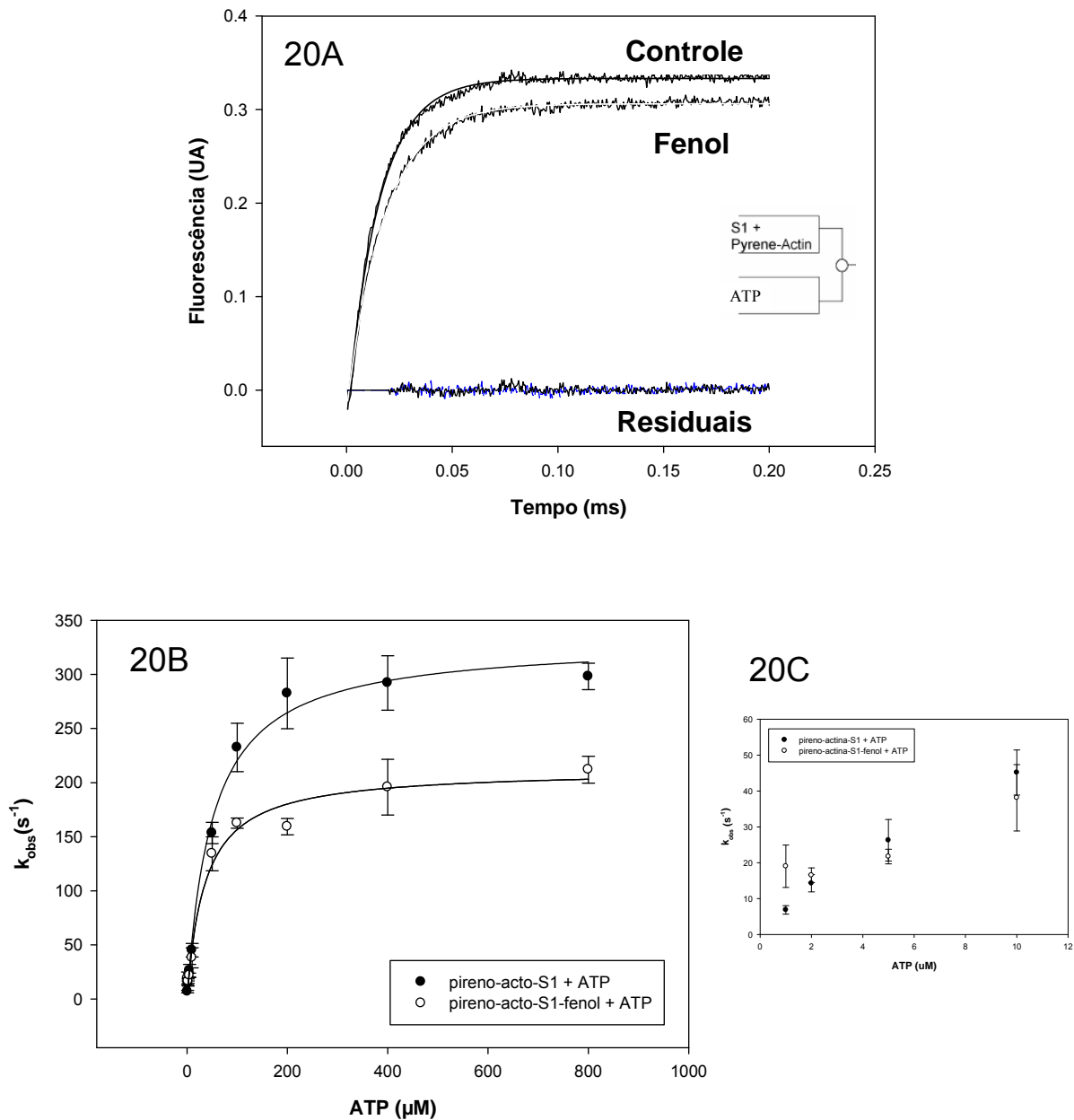


Fig.20: Ligação e isomerização do ATP a picro-actina-S1 na presença de fenol (0,5%). Em A, sinal de fluorescência obtido com a ligação de ATP (10 μM) seguida pela dissociação da picro-actina-S1, mostrando ajuste de uma exponencial simples com k_{obs} de 66,0 e 55,3 s^{-1} , com amplitude de 0,354 e 0,318 para o controle e fenol respectivamente. As curvas residuais representadas abaixo, controle (preto) e fenol (azul). Em B, velocidade (k_{obs}) de dissociação do complexo picro-actina-S1 por variação da concentração de ATP. Em C, região de 1 a 10 μM de ATP da figura B. Condições do experimento: fenol 0 ou 0,5%; picro-actina 0,4 μM ; S1 0,4 μM ; ATP 1-800 μM ; KCl 20 mM; HEPES 50 mM (pH 7,0); $MgCl_2$ 5 mM; temperatura 21°C. A concentração das proteínas e do ATP referem-se aos valores obtidos após diluição. Excitação: 365 nm com filtro 387 nm. teste t com $p < 0.05$ comparando o controle com o fenol em ambas as constantes K_1 e k_{+2} ($X \pm SE$; $n=3$). Equação utilizada para obter k_{obs} foi $y = y_0 + ae^{-bx}$, e para obter K_1 e k_{+2} foi utilizada a equação $1/k_{obs} = k_{+2}K_1 * ([ATP]/1 + K_1[ATP])$.

4.6 Cinética de afinidade do ADP ao complexo pireno-acto-S1

Para a análise da afinidade do ADP ao complexo pireno-acto-S1 foi colocado o complexo pireno-acto-S1-ADP na presença ou na ausência de fenol em uma seringa e ATP com ou sem fenol em outra seringa, de acordo com o esquema 4. Na Figura 21 observa-se que o fenol promove uma menor afinidade ($1/K_{4a}$) do ADP ao complexo, e também diminui a constante observada na ausência de ADP ($k_{1a}[ATP]$). A constante de afinidade obteve-se através da equação 2, ajustada aos dados da Figura 21B.

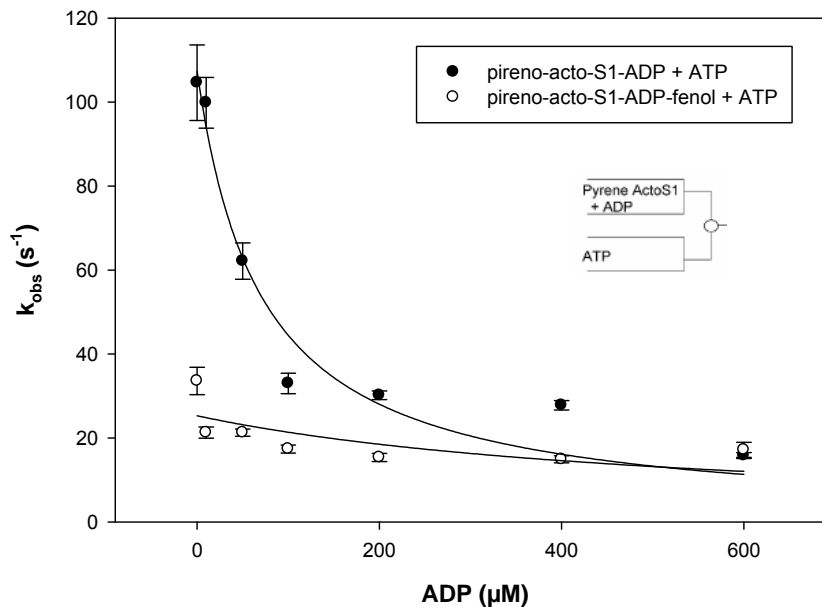


Fig.21: Afinidade do ADP ao complexo pireno-acto-S1 dissociado por ATP na presença de fenol (0,5%). Condições do experimento: fenol 0 ou 0,5%; pireno-actina 0,5 μM; S1 0,5 μM; ADP 0 – 600 μM; ATP 40 μM; KCl 150 mM; Hepes 50 mM (pH 7,0); MgCl₂ 5 mM; 21°C. A concentração das proteínas, do ATP e ADP, se refere aos valores após diluição. As constantes encontradas nesse exemplo foram $1/K_{4a} = 70,7 \mu\text{M}$ para o controle e $1/K_{4a} = 546 \mu\text{M}$ para o fenol, com $k_{+1a} = 2,68$ e $0,63 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para o controle e fenol respectivamente; e $K_{4a} = 14,1 \times 10^3$ e $1,83 \times 10^3 \text{M}^{-1}$ para o controle e fenol respectivamente. Excitação: 365 nm, com filtro 387 nm ($X \pm \text{SE}$ de 5 a 10 tiros com a mesma proteína). A Tabela 1 mostra as médias para três preparações de proteína. Equação utilizada para obter k_{obs} foi $y = y_0 + ae^{-bx}$, e para obter K_4 e k_{+1} foi utilizada a equação 2 $k_{\text{obs}} = k_{+1a} * [\text{ATP}] / (1 + [\text{ADP}] / K_{4a})$.

	KCl (mM)	Controle	Fenol
k_{-5} (fase rápida) $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	150	$2,63 \pm 0,6$	$3,35 \pm 0,3$
k_{-5} (fase lenta) $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	150	$0,6 \pm 0,19$	$0,6 \pm 0,15$
$k_{+5} \text{s}^{-1}$	150	$0,205 \pm 0,015$	$0,275 \pm 0,012^*$
$K_5 \mu\text{M}$	150	0,077	0,082
$K_{4a} \text{M}^{-1}$	150	$11,1 \pm 3,1 \times 10^3$	$1,5 \pm 0,4 \times 10^3$
$1/K_{4a} \mu\text{M}$	150	98 ± 27	736 ± 189
$k_{+1a} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	150	$1,9 \pm 0,8$	$0,63 \pm 0,00$
$K1 \mu\text{M}^{-1}$	20	$0,019 \pm 0,004$	$0,030 \pm 0,005^*$
$1/K1 \mu\text{M}$	20	$58,4 \pm 11,4$	$35,1 \pm 5,0$
$k_{+2} \text{s}^{-1}$	20	348 ± 21	$211 \pm 17^*$

Tabela 1: Parâmetros cinéticos do ciclo catalítico acto-S1 na presença e ausência de fenol. * teste *t* com $p < 0.05$ comparado com o controle.

RESULTADOS (parte 1b)

4.7 Efeito do tempo de exposição do S1 ao fenol sobre a atividade Mg^{2+} -ATPase actina-ativada

A injeção do fenol no ponto neuro-motor causa neurólise da região terminal do axônio. O fenol é absorvido também pelos tecidos adjacentes ao neurônio, como o tecido conjuntivo e muscular, e o contato com este perdura por algum tempo. O próximo objetivo foi analisar se o fenol também exerceria algum efeito na interação acto-S1, quando pré-incubado com o S1.

O S1 foi incubado em tempos variados (2-10 min) com ou sem fenol; em seguida adicionaram-se actina e ATP, e foi mensurada a atividade Mg^{2+} -ATPase actina-ativada do S1. O efeito ativador do fenol na atividade Mg^{2+} -ATPase actina-ativada perdido com o tempo (Figura 22).

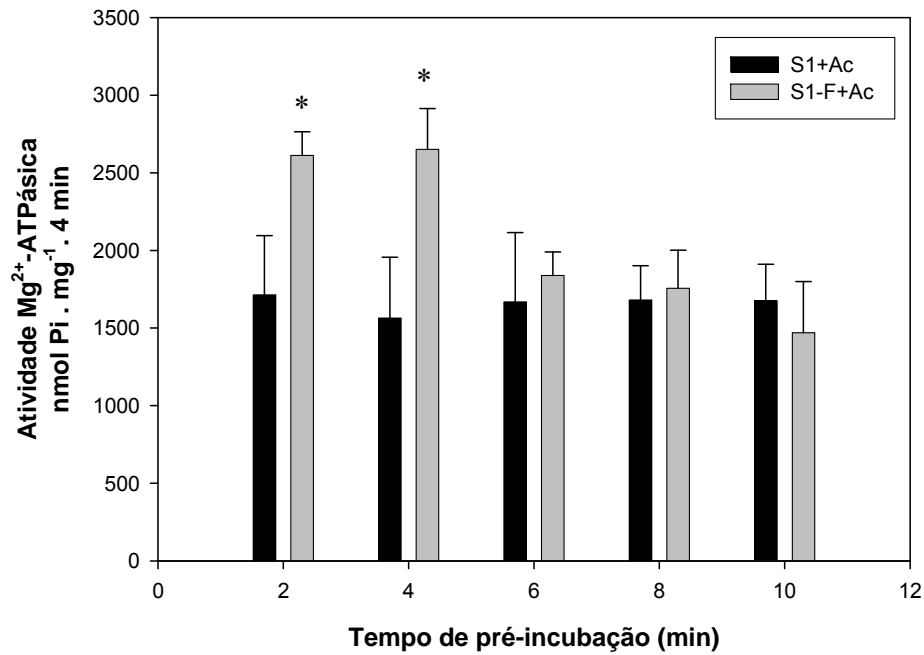
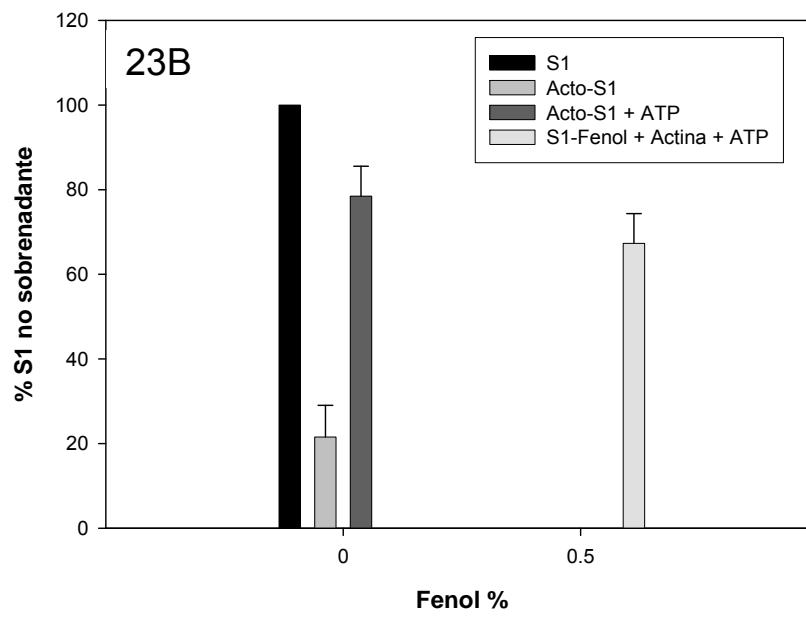
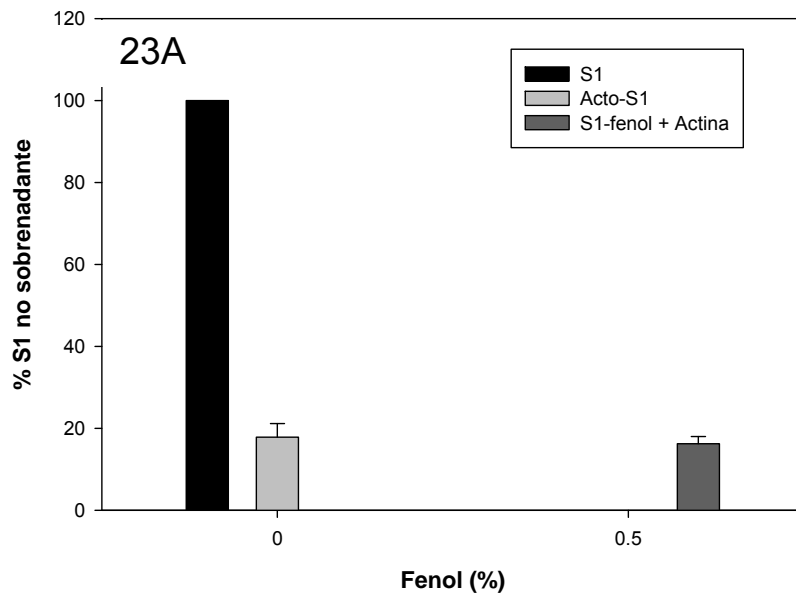


Fig.22: Efeito do tempo de exposição do S1 ao fenol sobre a atividade actina ativada do S1. O aumento da exposição do S1 ao solvente, provoca a perda do seu efeito de ativação na atividade Mg^{2+} -ATPase actina-ativada. Condições: HEPES 50 mM (pH 7,0), $MgCl_2$ 5 mM, KCl 20 mM. O S1 (0,05 mg/ml) foi pré-incubado com ou sem fenol (0,5%) com variação temporal (2-10 min) no meio de reação. Em seguida foram adicionados actina (0,4 mg/ml) e ATP 3 mM e acompanhada a hidrólise por 4 min a 25°C. * teste *t* pareado para $p < 0,05$ em relação ao controle sem fenol ($X \pm SE$; $n=3$).

4.8 Efeito do fenol na interação acto-S1, quando o S1 é pré-incubado com fenol

O objetivo do próximo experimento foi verificar se após incubação do S1 com o fenol por 10 min, este perderia a capacidade de interagir com actina.

Para isso analisou-se a interação S1-fenol (10 min) com actina na presença e ausência de ATP por cosedimentação. Não foi comprovada diferença significativa em um meio contendo KCl 20 mM com e sem ATP (Figura 23A e 23B); porém com KCl 50 mM apresentou diferença significativa na interação S1-fenol (10 min) + actina na presença de ATP, na qual menor quantidade de S1 foi dissociada pelo nucleotídeo (Figura 23D).



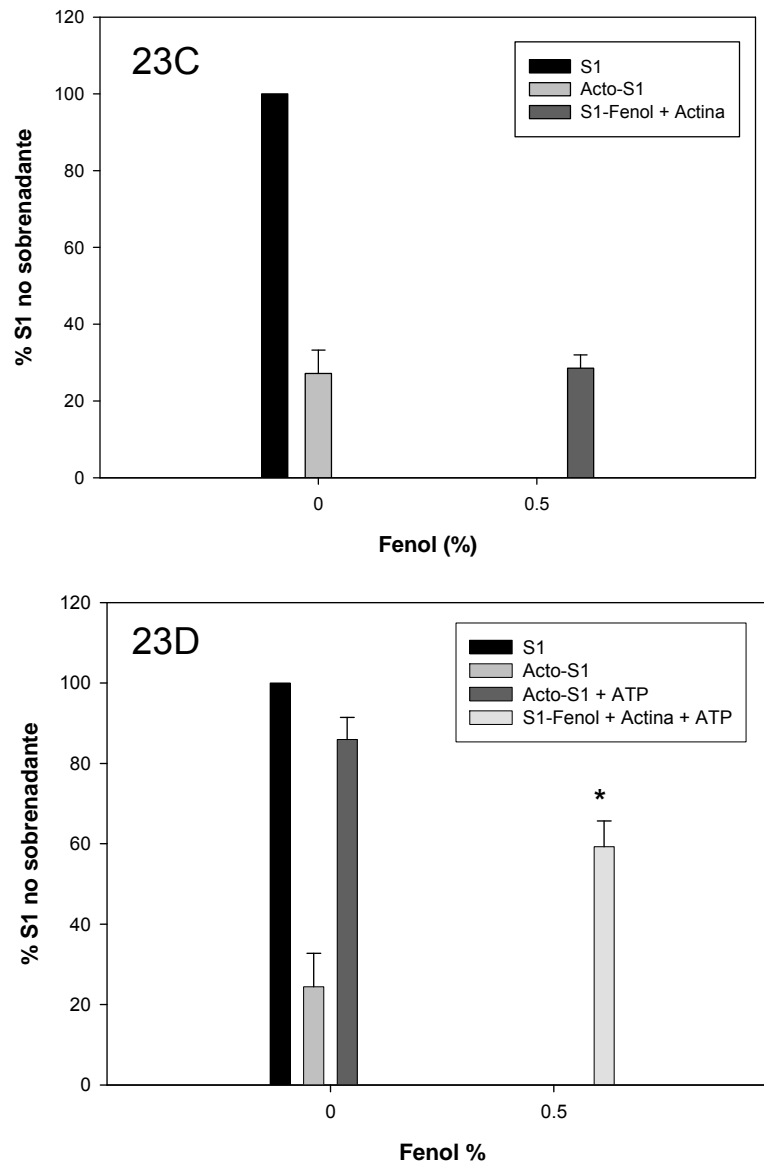


Fig.23: Efeito do fenol sobre a associação acto-S1 na presença e ausência de ATP por co-sedimentação. Condições: Hepes 50 mM (pH 7,0); $MgCl_2$ 5 mM; EGTA 1 mM; (A,B) KCl 20 mM (C,D) KCl 50 mM. (A,C) S1 (1 mg/ml) foi pré-incubado com ou sem fenol (0,5%) por 10 min antes da adição de actina (1 mg/ml). (B,D) Após incubação das proteínas na presença ou ausência de fenol, adicionou-se ATP. Quantificação do S1 no sobrenadante (não ligado) realizada por SDS-PAGE e densitometria. * teste *t* pareado para $p < 0,05$ em relação ao controle sem fenol ($X \pm SE$; $n=5$).

Nos experimentos de espalhamento de luz, utilizou-se a mesma metodologia descrita para os experimentos de co-sedimentação. O S1 pré-incubado com ou sem fenol por 10 min, e em seguida adicionada actina, e analisado o espalhamento de luz. A interação acto-S1 na presença de fenol levou a um espalhamento de luz maior quando comparado com o controle (Figura 24A). Pode ser observado novamente que o espalhamento de luz, das proteínas isoladas na presença ou ausência de fenol, é muito pequeno. Esta observação mostra que o fenol promove maior interação do S1 com a actina, mesmo quando a proteína é pré-incubada com o solvente, embora o nível de espalhamento esteja menor do que quando analisada a interação imediatamente, sem tempo de pré-incubação com o solvente (Figura 16A).

Após formação do complexo acto-S1 com ou sem pré-incubação com fenol por 10 min, foi adicionado ATP e verificado o espalhamento de luz. Na presença de ATP, a actina dissociada do S1 quase por completo (68 %) na ausência de fenol, mantendo-se dissociado até 2 min de pós-incubação. Na presença de fenol, o ATP levou a uma dissociação igual ao controle no primeiro tempo de análise, porém a dissociação não se manteve até o final da análise (Figura 24B e Tabela 2), sugerindo uma maior interação do S1 com actina na presença do fenol.

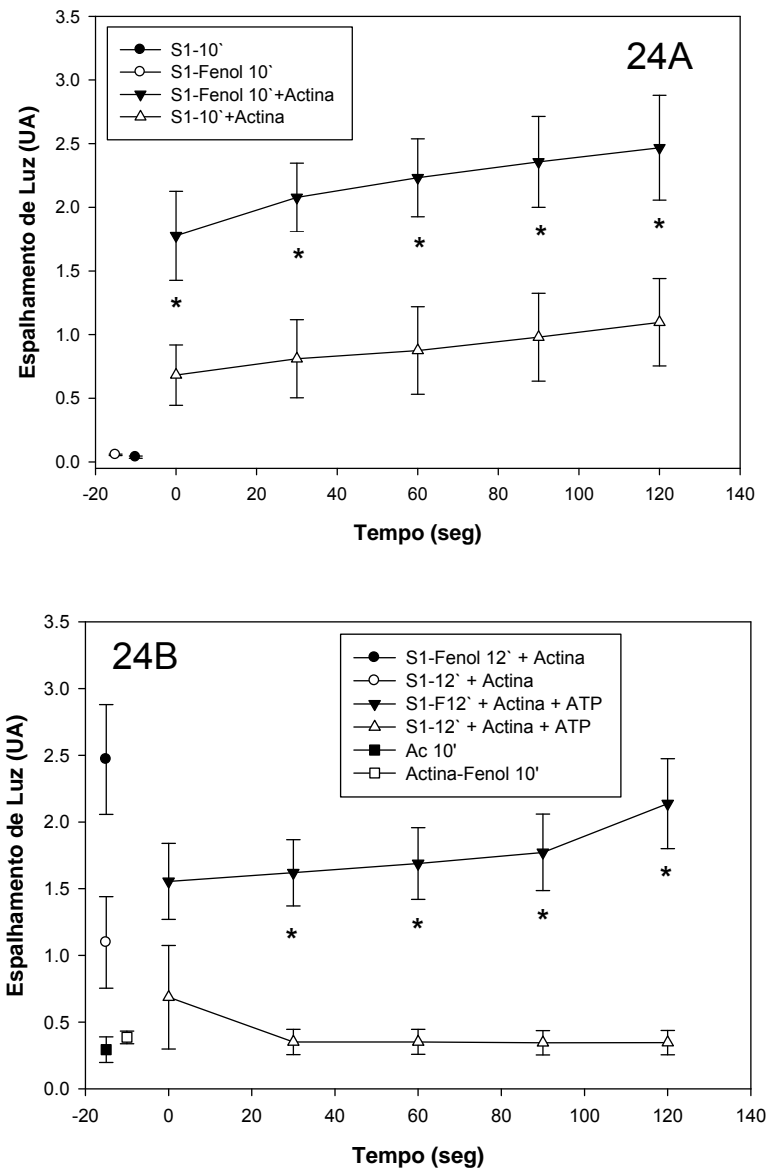


Fig.24: Espalhamento de luz: Efeito do fenol na interação acto-S1 na ausência (A) ou presença (B) de ATP. (A) Após 10 min de incubação do S1 com ou sem o solvente, a actina é adicionada e a formação do complexo acto-S1, acompanhada por 2 min (um espectro a cada 30 segundos). (B) Análise da dissociação do complexo acto-S1 por ATP 1 mM durante 2 min (um espectro a cada 30 s), após formação do complexo S1-fenol (12 min) - actina. Condições do experimento: fenol 0,5%; actina 5 μ M; S1 2 μ M; ATP 0 ou 1 mM; KCl 20 mM; Hepes 50 mM (pH 7,0); $MgCl_2$ 5 mM. * teste *t* para $p < 0,05$ em relação ao controle sem fenol ($X \pm SE$; $n=3$).

	Espalhamento de luz (U.A.)		Espalhamento de luz (U.A.)	
Tempo (seg)	S1-F10' + Ac + ATP	%	S1 10' + Ac + ATP	%
0	1,55	37,7	0,69	37,4
30	1,62	34,5	0,35	68
60	1,69	31,6	0,35	68
90	1,77	28,2	0,35	68,6
120	2,14	13,5	0,35	68,5

Tabela 2: Dissociação do complexo acto-S1 após pré-incubação do S1 com fenol por 10 min. % indica a porcentagem de desligamento (queda do espalhamento de luz) em função do último ponto de ligação acto-S1 com ou sem fenol por 10', sem ATP (mostrado aos 15 s). Dados da Fig. 24B.

RESULTADOS (parte 2)

4.9 Análises da interação S1-fenol por RMN

De acordo com os resultados registrados por Coelho (2007) e pelos resultados encontrados neste trabalho, o fenol parece ligar diretamente ao S1. Com isso vem o interesse de verificar como seria este tipo de ligação (fraca ou forte) e o possível local de ligação do fenol na proteína. Foram, então, realizadas algumas análises por ressonância magnética nuclear, as quais evidenciaram que o fenol liga-se com média a alta afinidade à proteína S1 (Figuras 26, 27).

Para analisar a afinidade do fenol para S1, realizaram-se experimentos de STD (Diferença de Transferência de Saturação), nos quais se dá um pulso de saturação seletiva na proteína. A saturação se espalha por todos os hidrogênios da proteína através de difusão de spin (Mayer & Meyer, 1999). Se o fenol se encontrar ligado ao S1, a saturação será transferida também para esta molécula. Este experimento é eficiente somente se o regime de troca entre o fenol ligado e desligado ocorrer rapidamente, tipicamente em microsegundos. Se o regime de troca rápida for verificado, pode-se utilizar excesso do ligante (fenol) em relação ao receptor (S1). Tipicamente, obtém-se o regime de troca rápida entre o estado de fenol ligado ao S1 e fenol livre, em uma ligação de média a baixa afinidade ($K_d > 10^{-6}$ M), onde é verificada mudanças no espectro com redução da intensidade do pico na região do fenol (demonstrando a transferência de saturação da proteína para os hidrogênios do fenol).

No caso de ocorrer uma ligação em regime de troca lenta entre o estado de fenol ligado ao S1 e fenol livre, o fenol no estado ligado permanecerá por mais tempo ligado. Assim, não é possível detectar mudanças no espectro pela transferência de saturação, o que significa uma ligação de média a alta afinidade

entre o fenol e S1, verificando-se somente o sinal do fenol livre. A Figura 25 demonstra um esquema de interação entre um receptor e um ligante, e a formação deste complexo, ilustrando o experimento de STD.

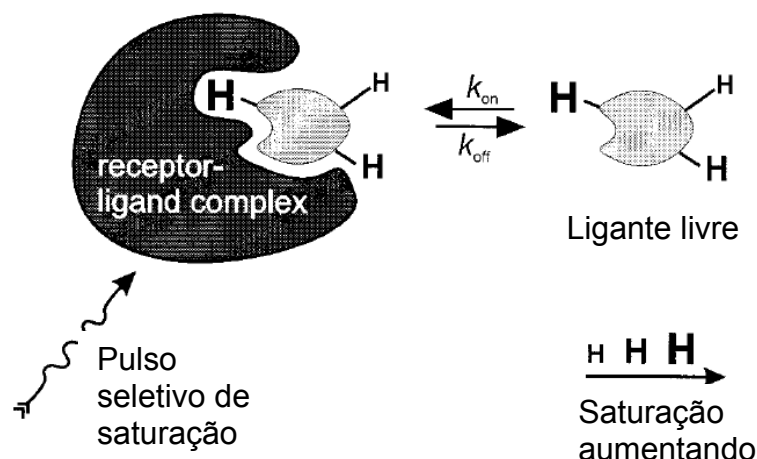


Figura 25: Ilustração da formação de complexo entre um receptor e um ligante: A esquerda da figura demonstra a formação deste complexo, com um pulso de saturação na proteína sendo transferido para os hidrogênios destacados do ligante. Isto demonstra uma ligação em regime de troca rápida entre o ligante complexado e o ligante livre, o que leva a transferência de saturação. Note que quanto mais próximo o hidrogênio do ligante estiver do receptor, mais eficiente é a transferência de saturação (Mayer & Meyer, 2001).

Como resultado no experimento de STD, temos duas hipóteses. A primeira é de estar havendo uma ligação em regime de troca lenta entre fenol e S1, devido a uma ligação de média a alta afinidade. Esta conclusão se deve ao fato de não termos encontrado diferenças de saturação no espectro na região do fenol (Figura 26B), assim como demonstrado no sinal da região do tampão Tris (Figura 26A) onde o tampão tem uma ligação de troca rápida com a proteína. A segunda hipótese é não haver ligação entre fenol e S1.

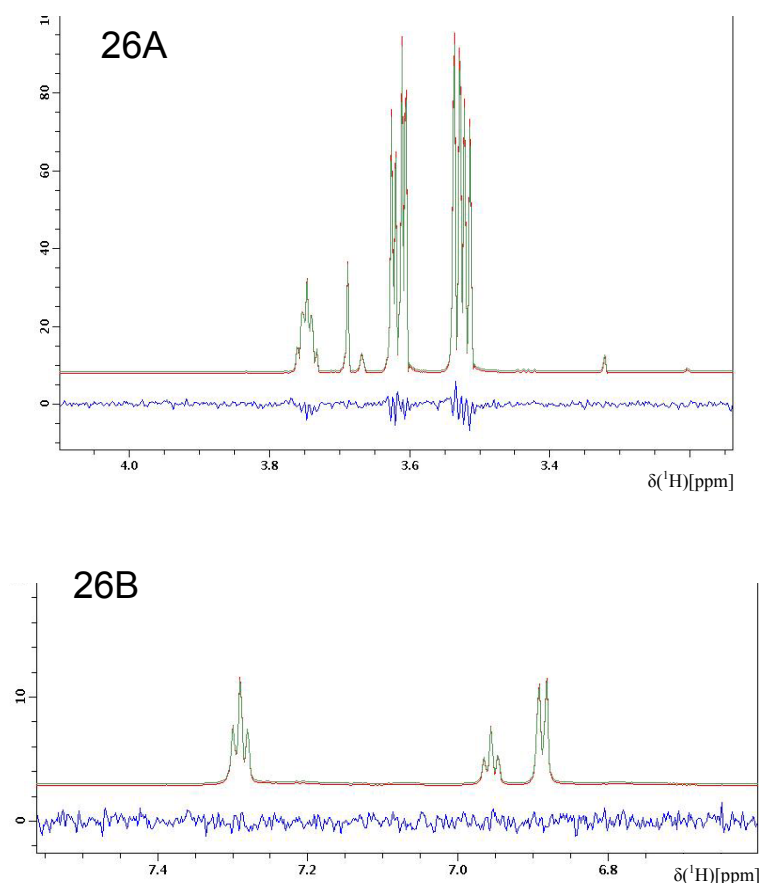


Fig.26: RMN – Diferença de Transferência de Saturação (STD): O fenol liga ao S1 em regime de troca lenta, sugerindo média - alta afinidade de ligação S1-fenol. (A) Sinal do espectro na região do tampão. A ligação do tampão à proteína ocorre em regime de troca rápida; observa-se o sinal de diferença de saturação em azul. (B) Sinal do espectro na região do fenol (300 μ M). Não há sinal de diferença (azul) Condições do experimento: S1 20 μ M, fenol 300 – 2400 μ M (0,003 – 0,022 %), ²H Tris 10 mM (pH 7,0), KCl 20 mM, MgCl₂ 5 mM, D₂O 100%.

Outro experimento utilizado para analisar a interação entre fenol e S1, foi a medida do Coeficiente de Difusão Translacional (D) do fenol, em que empregaram-se vários pulsos de gradiente que levam à redução de intensidade do sinal proporcional a D (Figura 27A). Obtém-se uma curva de intensidade do sinal em função da potência do gradiente, na qual é possível retirar a medida de D (Morris & Johnson Jr, 1993; Balayssac et al., 2009).

Utilizaram-se diferentes concentrações de fenol para uma concentração fixa de S1. Se a ligação ocorresse em regime de troca rápida, esperar-se-ia uma dependência de D em função da concentração de fenol. Assim, em menores concentrações de fenol, o coeficiente de difusão seria menor, no valor aproximado ao da proteína. Com o aumento da concentração de fenol, D aumentaria, atingindo valores de D do fenol livre.

Nossos experimentos mostraram que em todas as concentrações de fenol testadas obtive-se o mesmo valor de D, valor este relativo ao fenol livre. Portanto, tem-se, de novo, duas possibilidades, ou a ligação fenol-S1 se dá em regime de troca lenta, compatível com ligação de média a alta afinidade para o S1, ou não há ligação (Figura 27B).

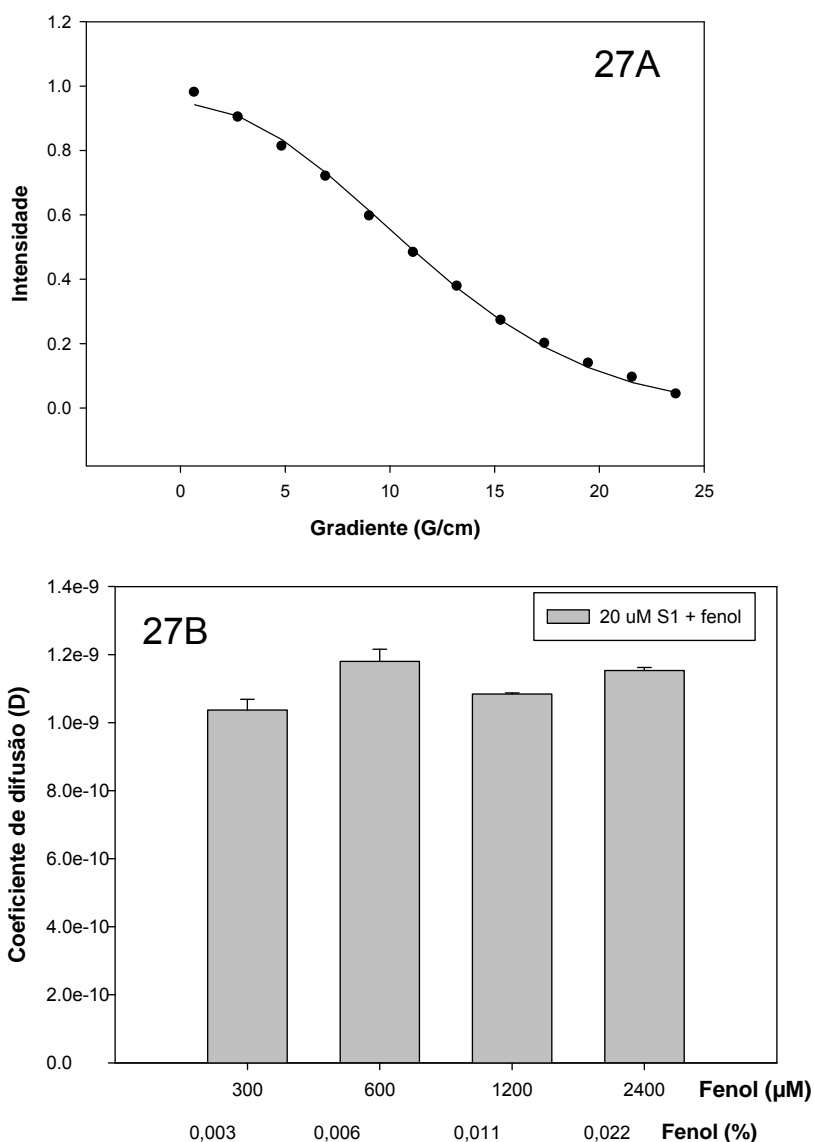


Fig.27: RMN – Medida de Coeficiente de Difusão Translacional (DOSY): A. Exemplo dos valores obtidos de intensidade do sinal a 7,238 ppm com $D = 1,16 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ (fenol 600 μM) em função da potência do gradiente de campo magnético. B. Valores de D em função da concentração de fenol. Observou-se que o fenol se liga ao S1 em regime de troca lenta, sugerindo média - alta afinidade de ligação S1-fenol. Valor esperado para o fenol livre $0,6 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ e para o S1 $6 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. Condições do experimento: S1 20 μM , fenol 300 – 2400 μM (0,003 – 0,022 %), ^2H Tris 10 mM (pH 7,0), KCl 20 mM, MgCl_2 5 mM, D_2O 100%.

Nos experimentos acima não conseguiu-se demonstrar interação do fenol com o S1. Para comprovar esta interação foi feito um espectro de correlação heteronuclear entre ^1H e ^{13}C naturais (2D [$^{13}\text{C},^1\text{H}$] HSQC) do S1 na ausência e presença de fenol. A Figura 28 mostra que houve ligação, pois a presença do fenol provocou pequenas, mas significativas perturbações de deslocamento químico de hidrogênios e carbonos do S1.

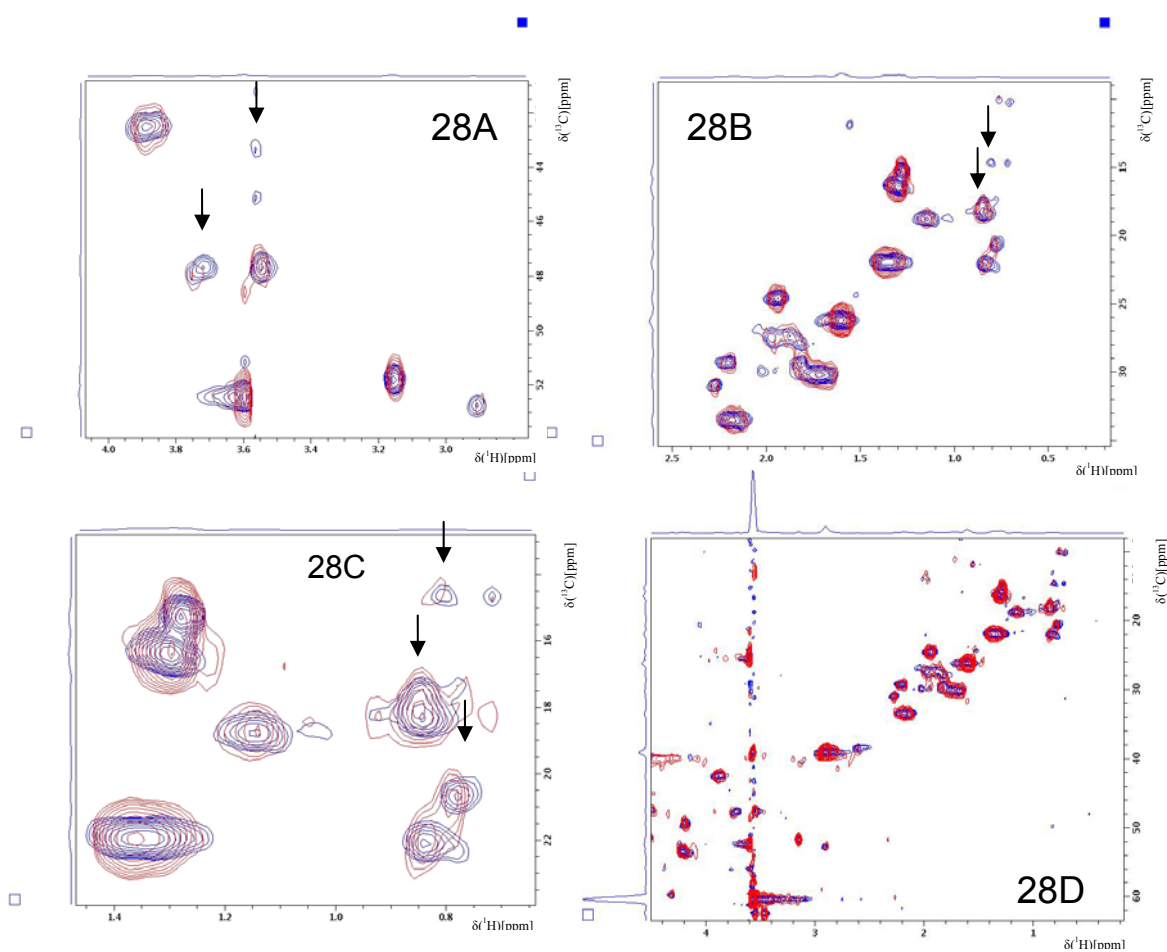


Fig.28: 2D [$^{13}\text{C},^1\text{H}$] HSQC: Alguns aminoácidos sofreram deslocamento químico na presença do fenol, demonstrando ligação do mesmo ao S1 (setas pretas). (A,B,C) Regiões do espectro de HSQC (mostrada em D) aumentadas. (D) Espectro de HSQC. O espectro em vermelho representa o S1 sozinho e em azul S1 com fenol. Condições do experimento: S1 80 μM , fenol 170 μM (0,002 %), ^2H Tris 10 mM (pH 7,0), KCl 20 mM, MgCl_2 5 mM, D_2O 100%.

O S1 tem aproximadamente 110 kDa, com 840 aminoácidos, não sendo possível observar todos os aminoácidos neste espectro, o que é agravado pelo fato de se ter utilizado a proteína sem marcação isotrópica. O espectro de 2D [^{13}C , ^1H] HSQC mostra sinais de ressonância de regiões mais flexíveis da proteína. Como a proteína é muito grande, espera-se que as regiões mais rígidas não estejam representadas no espectro, pois relaxam muito rapidamente, via T2, levando ao alargamento dos sinais para além da capacidade de detecção. O 2D [^{13}C , ^1H] HSQC pode demonstrar mudanças no deslocamento químico das cadeias laterais alifáticas e aromáticas (Skinner & Laurence, 2008).

Tentou-se identificar o(s) sítio(s) de interação de fenol no S1. Após observar alguns aminoácidos com perturbação do deslocamento químico na presença do fenol, foram realizados, então, experimentos de 1D TOCSY e 1D NOEDIFF com excitação seletiva nestes locais que sofreram a perturbação do deslocamento químico. Evidenciaram-se alguns sinais de correlação que correspondem a hidrogênios adjacentes ao hidrogênio saturado. O 1D TOCSY identifica hidrogênios adjacentes dentro do próprio aminoácido, pois a correlação homonuclear se dá através de, no máximo, três ligações químicas entre dois ^1H . O 1D NOEDIFF utiliza o NOE (efeito nuclear Overhauser) que conecta hidrogênios próximos em até 5 Å no espaço (Figura 29).

Tanto os experimentos de 1D TOCSY seletivo, bem como de 1D NOEDIFF geram correlações que permitirão sugerir possíveis aminoácidos envolvidos na interação. Após analisar o aparecimento destes picos de correlação em determinadas frequências, foram então identificados os possíveis aminoácidos perturbados pela ligação do fenol (Tabela 3), através da tabela de estatística calculada para os deslocamentos químicos selecionados dos átomos dos 20

aminoácidos (Biological Magnetic Resonance Data Bank – http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/statsel.htm). Estes dados são bastante limitados para identificação do(s) sítio(s) de interação do fenol; porém, podemos verificar a presença de aminoácidos apolares na Tabela 3, principalmente o triptofano.

Com isso fez-se um modelo de S1 de músculo esquelético de coelho, com molde no S1 de *Dictyostelium discoideum* 1FMV (Bauer et al., 2000), no qual evidenciaram-se 5 triptofanos: W111, W130, W439, W509 e W594 (Figura 30A). Os dois primeiros triptofanos se encontram na região de 27 KDa e os três últimos na região de 50 KDa (Park & Burghardt, 2000). Já é conhecido que o W511 é sensível à ligação de ATP. No espectro de 2D [¹³C,¹H] HSQC verificam-se somente os aminoácidos que estão em regiões mais flexíveis, sendo provável a ligação do fenol nestes triptofanos que se encontram mais na superfície são os W111, W130 e W509 (Figura 30B e 30C).

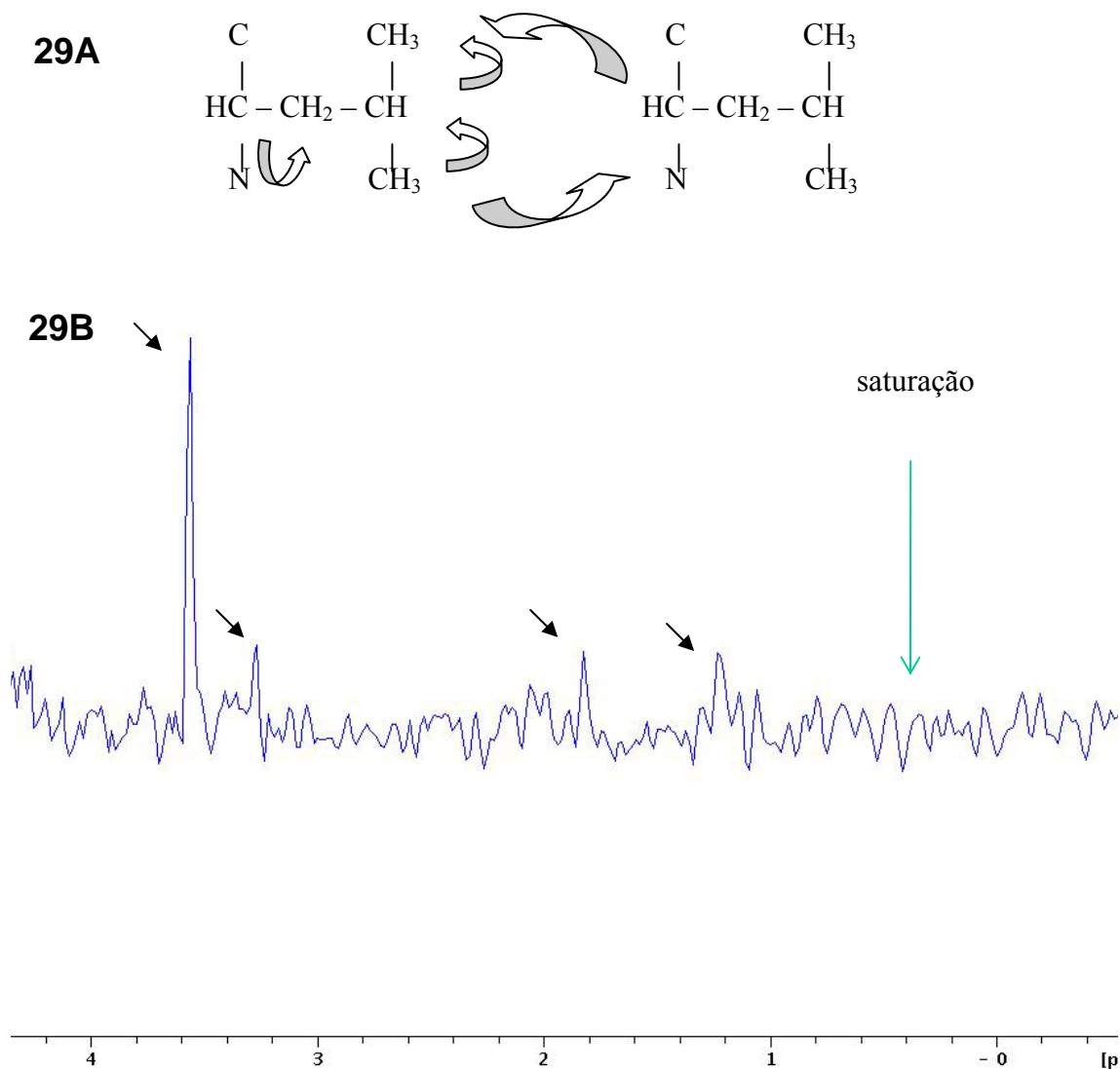


Fig.29: RMN – NOEDIFF com pulso seletivo: Em A, o esquema exemplifica a interação entre hidrogênios do mesmo aminoácido ou com aminoácidos vizinhos. Em B, a seta verde indica o pulso seletivo na região do aminoácido que sofreu perturbação do deslocamento químico na presença do fenol. Setas pretas indicam o aparecimento dos sinais que representam proximidade entre hidrogênios. Condições do experimento: S1 80 μM , fenol 170 μM (0,002 %), ^2H Tris 10 mM (pH 7,0), KCl 20 mM, MgCl_2 5 mM, D_2O 100%.

Sinais de ressonância modificados pelo fenol (ppm)	Sinais do NOEDIFF após pulso de excitação seletiva (ppm)	Sinais do TOCSY após pulso de excitação seletiva (ppm)	Possíveis aminoácidos
-	-		Obs. controle
0,848 / 18,149	3,27; 1,81	4,031; 4,703	Trp, Tyr, Lys, Ile, Cys, Arg, Asn
0,819 / 14,612	3,27; 1,81	4,671	Trp, Lys, Ile, Cys, Arg, Asn
0,790 / 20,69	3,26; 1,23; 8,44;	4,71; 0,72	Trp, Tyr, Ile, Cys, Asn, Pro, Leu
1,958 / 27,478	3,26; 1,24		Trp, Ile
1,834 / 27,69	3,27	1,86; 1,84	Trp, Ile, Cys, Val
3,75 / 47,98	3,27	4,68	Trp, Cys, Asn
0,774 / 20,68	3,29; 10,49	4,72; 0,812; 0,78	Trp, Ile, Cys, Asn, Leu, His, Val
4,319 / 59,87		4,68; 4,33; 1,31	Trp, Lys, Ile, Cys, Arg, Asn, Leu, Ala
2,9085 / 52,735		4,72	Trp, Cys, Asn
4,3169 / 59,89	1,08	1,33; 4,33; 4,71	Trp, Lys, Ile, Cys, Asn, Leu, Ala, Val, Thr
6,84	8,49; 1,24		Cys, Ile, Pro

Tabela 3: RMN – 1D NOEDIFF e 1D TOCSY seletivo: Listagem dos possíveis aminoácidos (tabela de estatística calculada para os deslocamentos químicos selecionados dos átomos dos 20 aminoácidos) com que o fenol pode estar interagindo no S1 de acordo com os resultados obtidos com os experimentos de 1D NOEDIFF e 1D TOCSY. Condições do experimento: S1 80 μ M, fenol 170 μ M (0,002 %), 2 H Tris 10 mM (pH 7,0), KCl 20 mM, MgCl₂ 5 mM, D₂O 100%.

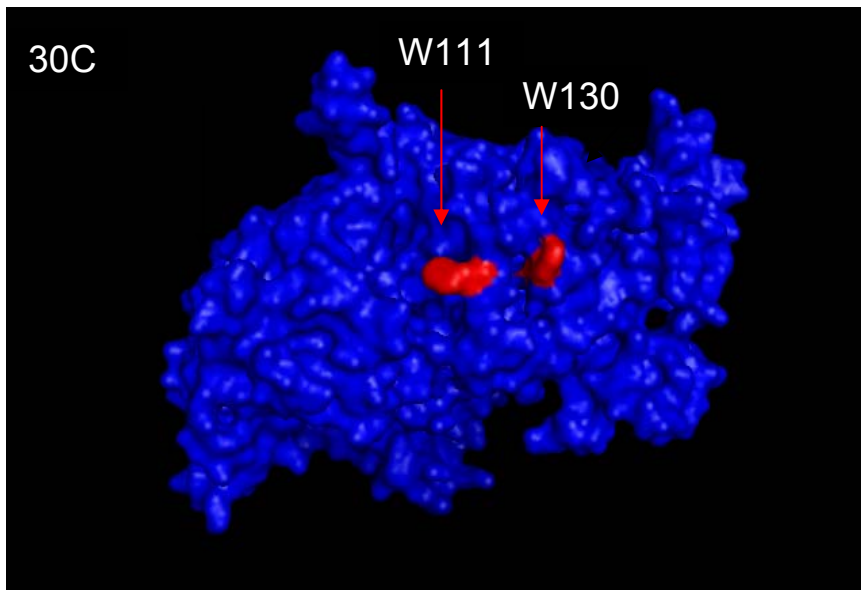
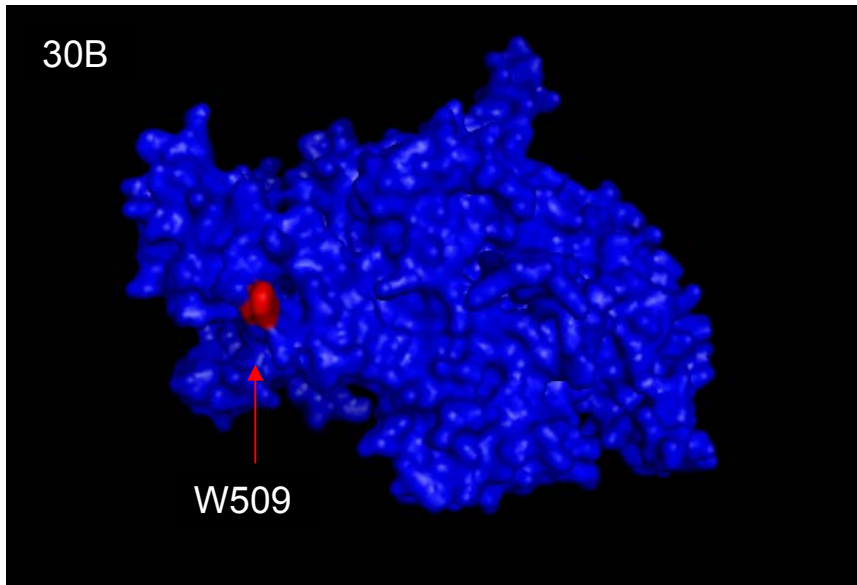
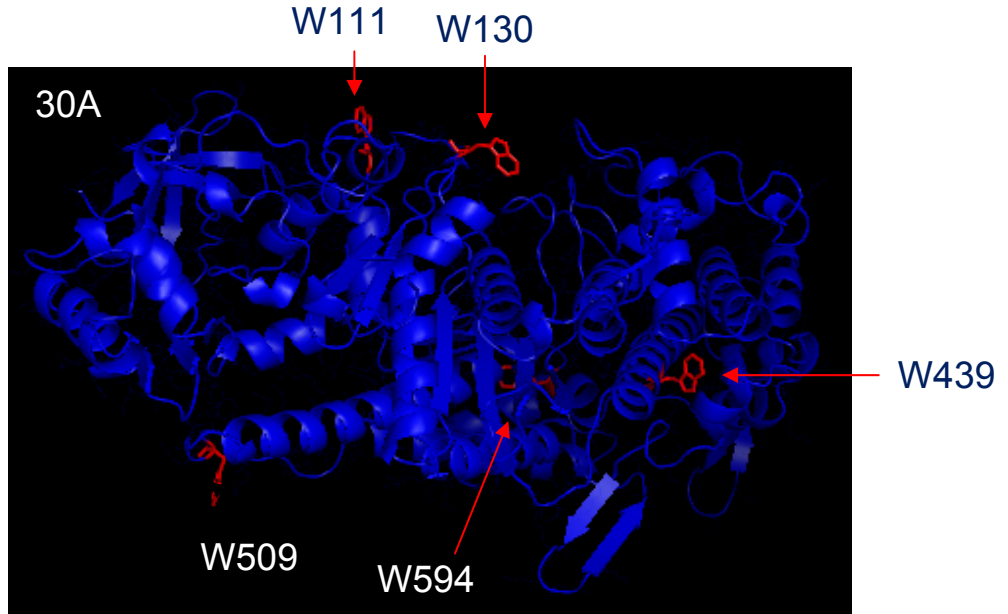


Figura 30: Modelo do S1: A. Modelo de S1 de coelho feito a partir do molde do S1 de *Dictyostelium discoideum*. Em vermelho são os triptofanos destacados (W111, W130, W439, W509, W594), sendo três na superfície (W111, W130, W509) e dois mais no interior (W439 e W594) da molécula. B. Modelo do S1 de coelho com o W509 na superfície marcado e em C os W111 e W130 marcados.

DISCUSSÃO

Os experimentos desta tese representam uma tentativa de entender os efeitos do fenol na enzima (subfragmento-1) *in vitro*, mas também na força desenvolvida em fibras musculares esqueléticas. O fenol reduz a tensão isométrica máxima de fibras descascadas, sendo reversível até 0,8 % de fenol (Machado, 2003). Entretanto, ele aumenta a tensão de repouso (na ausência de cálcio), o que pode significar a promoção de interação entre os filamentos de miosina e actina em alguma etapa do ciclo catalítico (Machado et al., dados não publicados).

O fenol aumenta a atividade Mg^{2+} -ATPase do S1 em cinco vezes (Coelho, 2007). Na presença de actina, mostrado neste trabalho, o fenol também ativa a atividade Mg^{2+} -ATPase do S1 em aproximadamente três vezes, mesmo em altas força iônica do meio (Fig. 14E). Estas proteínas num meio com baixa força iônica (20 – 100 mM) apresentam forte afinidade uma com a outra, e em alta força iônica (300 – 600 mM) elas perdem afinidade, levando à não ativação da Mg^{2+} -ATPase do S1 pela actina (Conibear, 1999; Gordon et al., 2000) como visto na Figura 14C. Portanto, a ativação na presença de fenol sugere que este promove uma maior interação entre actina e miosina em alguma etapa do ciclo catalítico, pois a ativação pela actina persiste em alta força iônica. Nossos dados seguintes dedicam-se a investigar quais as etapas do ciclo catalítico que podem estar sendo afetadas pelo fenol.

O fenol não afeta a afinidade aparente do S1 para actina na presença de ATP, visto pela dependência da atividade na concentração de actina (K_{ATPase}) (Machado et al., dados não publicados). Não obstante, nossos dados mostram claramente que o fenol aumenta a interação entre actina e S1 no estado estacionário na ausência de ATP (Figs. 15A e 16A) e uma maior afinidade acto-S1, com $K_{0,5}$ para

S1 \cong 0,2 μ M na ausência de fenol e um valor menor, abaixo do limite mensurável, na presença de fenol (Fig. 17A). Na presença de ATP, por outro lado não ocorreu diferença significativa na interação acto-S1 dentro do tempo limite necessário para realização da medida no estado estacionário (Figs. 15C e 16B).

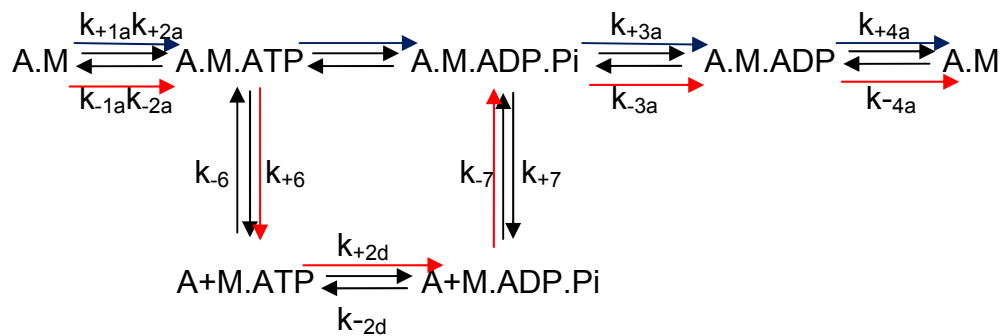
Coelho (2007) demonstrou que o aumento da atividade Mg^{2+} -ATPase do S1 na presença de fenol se deve provavelmente a um aumento na liberação de fosfato. Esse aumento persiste na presença de actina.

O fenol promove uma redução na afinidade ($1/K_{4a}$) do complexo acto-S1 pelo ADP (Tabela 1). A relação entre os valores para controle e fenol em dois experimentos foi de 7,4 vezes, o que é consistente com um aumento na liberação do ADP pelo acto-S1 na presença de fenol.

Outros dados deste projeto demonstram que o fenol também promove uma menor velocidade para ligação de ATP e isomerização do complexo acto-S1.ATP, sendo esta isomerização o passo que limita a velocidade de dissociação do S1 da actina provocada pelo ATP (Fig. 20B). Este achado é consistente com a redução na ligação do ATP ao S1 isolado (Coelho, 2007). Estes dados se somam aos dados obtidos no estado estacionário (Fig. 17A) para indicar que o fenol promove uma maior afinidade entre actina e S1, o que explicaria uma maior interação destas proteínas por co-sedimentação e espalhamento de luz (Figs. 15A e 16A), assim como o aumento da atividade Mg^{2+} -ATPase actina-ativada do S1 mesmo em concentrações maiores de KCl (Fig. 14E). Uma maior interação entre actina e S1 explicaria porque a ativação pela actina persiste na presença de fenol apesar de haver concentrações altas de KCl.

Nosso laboratório começou a trabalhar com nitrofenóis (NPs), análogos de fenol, há mais de 10 anos. Tanto a tensão isométrica quanto a atividade

Mg^{2+} ATPase actina-ativada do S1 são reduzidas na presença de 2,4-DNP (Salerno et al., 1997; Ribeiro et al., 2005), enquanto que a atividade do S1 e a afinidade entre actina e S1 (vista na K_{ATPase}) são aumentadas (Ribeiro et al., 2005). Isto sugere que o DNP leva a uma maior afinidade entre actina e S1 em pontes fracas (A.M.ATP), favorecendo a via de clivagem mais lenta do estado (A.M.ATP \rightarrow A.M.ADP.Pi) (Gordon et al., 2000). No caso do fenol, a via preferida seria a do controle, com a miosina dissociada (M.ATP \rightarrow M.ADP.Pi) (via de clivagem mais rápida), de acordo com o esquema 6:



Esquema 6: O fenol aumenta a atividade actina ativada passando do estado A.M.ATP \rightarrow A + M.ATP, enquanto o DNP inibe a atividade actina-ativada passando do estado A.M.ATP \rightarrow A.M.ADP.Pi (processo mais lento), reduzindo a população A + M.ATP. (A) actina, (M) miosina. Setas vermelhas indicam o trajeto do efeito do fenol e em azul o trajeto do DNP.

Analisando os efeitos de outros compostos na interação acto-S1, a atividade Mg^{2+} ATPase actina-ativada foi reduzida na presença de hexanol, embora houvesse aumento da liberação de fosfato do S1 (Komatsu et al., 2004); e na presença de BTS, com redução da liberação de fosfato em mais de 100 vezes na presença de actina e em mais de 20 vezes na ausência de actina, assim como uma redução da afinidade do S1.ADP a actina (Shaw et al 2003).

Podemos observar que o fenol parece potencializar os estados de forte ligação entre actina e S1, que são os estados A.M (estado de rigor) e o estado A.M.ADP. O contrário foi visto por Komatsu et al. (2004), onde o hexanol levou a um

aumento na afinidade do S1 para actina na presença de ATP e redução na presença de ADP ou na falta de nucleotídeo. Isto resultou em aumento na interação acto-miosina no estado de fraca ligação (A.M.ATP, A.M.ADP.Pi), reduzindo esta interação no estado de forte ligação, efeito atribuído a uma diminuição na interação hidrofóbica na interface entre miosina e actina.

Para tentar desvendar a origem do aumento da afinidade acto-S1 provocado por fenol, foi aplicada a técnica de cinética rápida na ausência de ATP. Neste estudo a análise da velocidade de ligação (k_{-5}) entre pireno-actina e S1 foi realizada em alta força iônica (150 mM), assim como outros trabalhos com 200 mM KCl (Shaw et al., 2003; Taylor, 1991). Shaw et al. (2003) analisaram o efeito do BTS sobre a velocidade de ligação entre S1 e actina na ausência de ATP, não verificando efeito significativo. Resultado semelhante foi demonstrado neste trabalho na presença de fenol (Fig. 18).

Outro experimento para analisar a interação entre actina e S1 foi mostrado na Figura 19, onde a dissociação do complexo pireno-actina-S1 por actina não marcada foi maior na presença de fenol. Contudo, o efeito é muito pequeno e a relação ($K_5 = k_{+5}/k_{-5}$) mostra um efeito desprezível.

Em princípio, um aumento na liberação de fosfato do S1 (Coelho, 2007) e um aumento na atividade Mg^{2+} -ATPase actina-ativada, junto com qualquer aumento na interação entre os filamentos de actina e S1, levaria a uma maior tensão isométrica máxima em fibras descascadas, pois a entrada no estado M.ADP (capaz de formar pontes fortes) seria facilitada. Entretanto, Machado (2003) mostrou que há uma redução da tensão isométrica máxima destas fibras. Acreditamos que esta queda possa ser atribuída à diminuição da afinidade para ADP, um dos maiores efeitos encontrados neste trabalho (Fig. 21). Essa queda de afinidade é consistente com a

observação da aceleração da saída de ADP mostrada para S1 (Coelho et al., 2009) e deve diminuir a população de pontes fortes, responsáveis para a tensão isométrica.

Efeito contrário foi visto por Shaw et al. (2003) com BTS: o BTS reduz a liberação da saída de fosfato na presença e ausência de actina, reduzindo a atividade Mg^{2+} -ATPase do S1 e do acto-S1, sem afetar a afinidade para ADP, e foi observada uma grande redução da tensão isométrica máxima de fibras descascadas. Outro efeito contrário ao do fenol, foi visto por Komatsu et al. (2004) que demonstrou que o hexanol promove uma redução da atividade Mg^{2+} -ATPase actina ativada e redução na tensão isométrica máxima, similar ao efeito provocado por BTS.

Como o fenol injetado na clínica perdura nos tecidos por algum tempo, neste trabalho foi verificado o efeito do fenol após 10 minutos de incubação com S1 e posteriormente complexado a actina. Vimos que após este tempo de incubação o fenol perde seu efeito ativador na atividade actina-ativada do S1 (Fig. 22), o que não ocorre quando o ATP está ligado ao complexo acto-S1-fenol desde o segundo minuto e a hidrólise é analisada durante 10 minutos, onde o efeito ativador do fenol se mantém (Fig.14 A,B). Isto pode levar à conclusão que a ligação do ATP e isomerização do complexo ternário acto-S1-ATP após 10 minutos com fenol deve apresentar-se mais lenta comparada ao controle. Entretanto na atividade Mg^{2+} -ATPase do S1 após pré-incubação com fenol, este manteve seu efeito ativador, mesmo com tempos maiores de incubação com S1, embora ocorreu mudança do centro de massa do espectro de fluorescência intrínseca do S1 para o vermelho (Coelho, 2007). A mudança do espectro sinaliza uma maior exposição do triptofano

ao meio, o que sugere um desenovelamento da proteína com possível perda da sua estrutura.

Contudo, nos experimentos de interação acto-S1 após pré-incubação do S1 com fenol por 10 min foi verificada uma maior interação acto-S1 provocada por fenol na ausência de ATP (Fig. 24A) e inclusive na presença de ATP (Figs. 23D e 24B e Tabela 2). Possivelmente, após um tempo de exposição do S1 ao fenol, este passa a ter efeito também nas pontes fracas entre actina e S1 (A.M.ATP; A.M.ADP.Pi). Outro fator que nos chama a atenção é que a abertura do sítio catalítico provocada pela actina promove uma redução na afinidade para o ATP de 10.000 vezes e vice-versa (Geeves et al., 2005). O que temos neste trabalho é uma maior interação (Figs. 15A, 16A e 24A) e maior afinidade acto-S1 (Fig. 17A) provocada pelo fenol, baseada em experimentos no estado estacionário.

O sítio de ligação para a actina atravessa a boca da fenda entre a região superior e inferior do domínio de 50 KDa do S1; a ligação do nucleotídeo ocorre no lado oposto ao sítio para actina. Quando a actina liga fortemente a miosina, esta fenda se fecha, favorecendo a abertura do switch I, levando à ativação da liberação do fosfato (Conibear et al., 2003; Reubold et al., 2003; Zeng et al., 2004) e posteriormente à abertura do switch II, o que favorece a liberação de ADP (Reubold et al., 2003). O fenol também promoveu ativação na liberação de fosfato e ADP do S1 na ausência de actina (Coelho 2007).

Com o objetivo de analisar a interação S1-fenol e identificar o possível local de ligação do fenol ao S1, foram utilizados experimentos de STD e DOSY por RMN, os quais evidenciaram uma afinidade de média a alta entre fenol e S1, corroborando com os dados de mudanças estruturais no S1 provocadas pelo fenol (Coelho, 2007) e as mudanças na interação do S1 com actina como evidenciadas nesta tese.

No experimento de HSQC foi confirmada a ligação do fenol ao S1, já que o fenol perturbou o deslocamento químico de diversos resíduos do S1. Com isso foram realizados os experimentos de NOEDIFF e TOCSY com saturação de pulso nas frequências destes resíduos que sofreram perturbação no deslocamento químico, visando analisar qual o tipo de aminoácidos o fenol interagiu. Usando a tabela de estatística calculada para os deslocamentos químicos selecionados dos átomos contido nos 20 aminoácidos, foi verificado que o fenol possa estar interagindo com um ou mais triptofanos, provavelmente na superfície.

Fizemos um modelo do S1 mostrando seus cinco triptofanos, e vimos que três deles se encontram na superfície do domínio de 50 KDa, próximo aos sítios de interação com ATP e com actina. Podemos sugerir que o fenol interaja com esses triptofanos de modo a levar a uma maior interação acto-S1, provocando abertura do switch I e II e reduzindo assim a ligação de ATP e a isomerização do complexo ternário A.M.ATP, seguido pela dissociação da actina.

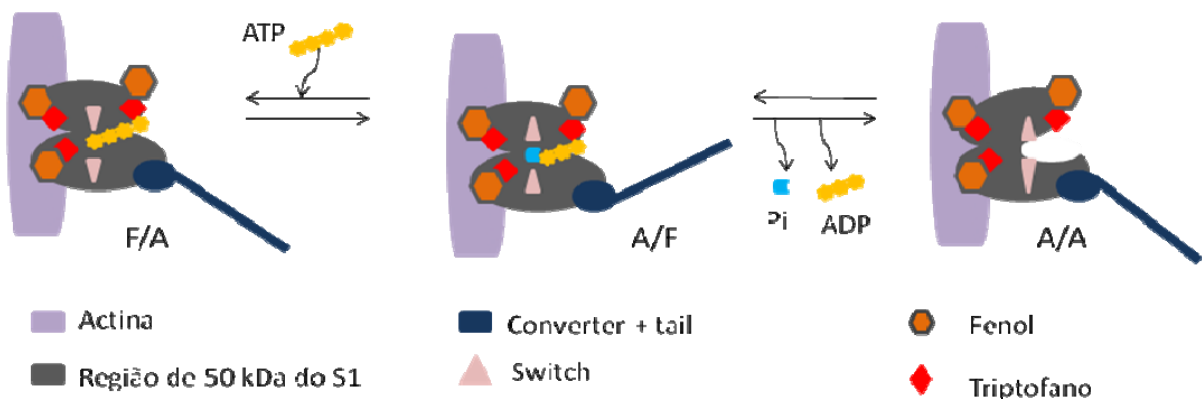


Figura 31: Modelo estrutural do ciclo ATPase actina-ativada do S1 na presença de fenol. O fenol possivelmente liga-se aos triptofanos na superfície próxima à ligação de actina e nucleotídeo, levando a uma forte interação acto-S1 e acelerando a liberação dos produtos Pi e ADP. F/A switch 1 e 2 fechado e aberto respectivamente. A/F switch 1 e 2 aberto e fechado respectivamente. A/A switch 1 e 2 abertos. Modelo baseado em Reubold et al. (2003).

REFERÊNCIAS

Balayssac S, Delsuc MA, Gilard V, Prigent Y, Malet-Martino M. Two-dimensional DOSY experiment with excitation sculpting water suppression for the analysis of natural and biological media. *J Mag Res* 2009; 196:78-83.

Bauer CB, Holden HM, Thoden JB, Smith R, Rayment I. X-ray structures of the apo and MgATP-bound states of Dictyostellium discoideum myosin motor domain. *J Biol Chem* 2000; 275:38494-38499.

Berlman IB. Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules. Academic Press 1971, 473p.

Bremel RD, Weber A. Calcium binding to rabbit skeletal myosin under physiological conditions. *Biochim Biophys Acta* 1975;376:366-374.

Brown JH, Cohen C. Regulation of muscle contraction by tropomyosin and troponin: How structure illuminates function. *Adv Prot Chem* 2005; 71:121-159.

Brune M, Hunter JL, Corrie JET, Webb MR. Direct real time measurement of rapid inorganic phosphate release using a novel fluorescent probe and its application to actomyosin subfragment 1 ATPase. *Biochemistry* 1994;33:8262-8271.

Coelho RG. Caracterização dos efeitos do fenol na cinética enzimática da miosina II. Rio de Janeiro, 2007:106p. Tese (Mestrado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Conibear PB. Kinetic studies on the effects of ADP and ionic strength on the interaction between myosin subfragment-1 and actin: implications for load-sensitivity and regulation of the crossbridge cycle. *J Muscle Res Cell Motil* 1999; 20:727-742.

Conibear PB, Bagshaw CR, Fajer PG, Kovács M, Málnási-Cszmadia A. Myosin cleft movement and its coupling to actomyosin dissociation. *Nature Struct Biol* 2003; 10:831-835.

Cooper JA, Walker SB, Pollard TD. Pyrene actin: documentation of the validity of sensitive assay for actin polymerization. *J Muscle Res Cell Motil* 1983;4:253-262.

Criddle AH, Geeves MA, Jeffries T. The use of actin labeled with N-1(pyrenyl)iodoacetamide to study the interaction of actin with myosin subfragments and troponin/tropomyosin. *Biochem J* 1985; 232:343-349.

De La Cruz EM, Mandinova A, Stinmetz MO, Stoffler D, Aebi U, Pollard TD. Polymerization and structure of nucleotide-free actin filaments. *J Mol Biol* 2000; 295:517-526.

De La Cruz EM, Ostap, EM. Kinetic and equilibrium analysis of the myosin ATPase. *Meth Enzymol* 2009, 455:157-192.

Geeves M, Conibear PB. The role of three-state docking of myosin S1 with actin in force generation. *Biophys J* 1995; 68:194-201.

Geeves MA, Holmes KC. Structural mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Biochem* 1999;68:687-728.

Geeves MA, Fedorob R, Manstein DJ. Molecular mechanism of actomyosin-based motility. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1462-1477.

Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* 2000;80:853-924.

Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; 177:751-766.

Grubmeyer C, Penefsky HS. Cooperativity between catalytic sites in the mechanism of action of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 1981;256:3728-3734.

Hanson J, Huxley HE. Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature* 1953;172:530-532.

Huxley AF, Hanson J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 1954;173:973-976.

Huxley AF. Electron microscope studies of organization in striated muscle. *Biochim Biophys Acta* 1953; 12:387-394.

Iorga B, Adamek N, Geeves MA. The slow skeletal muscle isoform of myosin shows kinetic features common to smooth and non-muscle myosins. *J Biol Chem* 2007; 282:3559-3570.

Jarrett L, Nandi P, Thompson AJ. Managing severe lower limb spasticity in multiple sclerosis: does intrathecal phenol have a role?. *J Neurol Neurosurg Psych* 2002;73:705-709.

Kato T, Lowey S. Mapping myosin light chains by immunoelectron microscopy. Use of anti-fluorescyl antibodies as structural probes. *J Cell Biol* 1989; 109:1549-1560.

Kato T, Morita F. Binding of myosin subfragment 1 to actin. *J Biochem* 1996; 126:189-192.

Koman LA, Smith BP, Shilt JS. Cerebral palsy. *Lancet* 2004;363:1619-1631.

Komatsu H, Shigeoka T, Ohno T, Kaseda K, Kanno T, Matsumoto Y, Suzuki M, Kodama T. Modulation of actomyosin motor function by 1-hexanol. *J Muscle Res Cell Motil* 2004; 25:77-85.

Kouyama T, Mihashi K. Pulse-fluorometry study on actin and heavy meromyosin using F-actin labeled with *N*-(1-pyrene)maleimide. *Eur J Biochem* 1980; 105:279-287.

Kouyama T, Mihashi K. Fluorimetry study of *N*-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin: Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur J Biochem* 1981; 114:33-38.

Lee J, Lee YS. Percutaneous chemical nerve block with ultrasound-guided intraneural injection. *Eur Radiol* 2008; 18:1506-1512.

Lehman W, Galinska-Rakoczy A, Hatch V, Tobacman LS, Craig R. Structural basis for the activation of muscle contraction by troponin and tropomyosin. *J Mol Biol* 2009; 388:673-681.

Mayer M, Meyer M. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew Chem* 1999; 38:1784-1788.

Mayer M, Meyer M. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc* 2001; 123:6108-6117.

Machado CJV. Caracterização dos efeitos do neurobloqueador químico fenol nas proteínas contráteis e regulatórias de músculo esquelético. Rio de Janeiro, 2003:109p. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) – Medicina Física e Reabilitação da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

McCrea PH, Eng JJ, Willms R. Phenol reduces hypertonia and enhances strength: a longitudinal case study. *Neurorehabil Neural Repair* 2004;18:112-116.

Morris KF, Johnson Jr CS. Resolution of discrete and continuous molecular size distributions by means of diffusion-ordered 2D NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* 1993; 115:4291-4299.

Muhlrad A. The isolated 21 KDa N-terminal fragment of myosin binds to actin in an ATP and ionic strength-dependent manner. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1077:308-315.

Muhlrad A, Chaussepied N. Effect of nucleotides, actin and temperature on thermolysin digestion of myosin subfragment-1. *Eur J Biochem* 1990;192:663-668.

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier. 3ed. 2002.

Ohtsuki I, Morimoto S. Troponin: regulatory function and disorders. *Biochem Bioph Res Com* 2008;369:62-73.

Otterbein LR, Graceffa P, Dominguez R. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science* 2001; 293:708-711.

Pardee JD, Simpson A, Stryer L, Spudich J. Actin filaments undergo limited subunit exchange in physiological salt conditions. *J Cell Biol* 1982; 94:316-324.

Pardee JD, Spudich JA. Mechanism of K⁺-induced actin assembly. *J Cell Biol* 1982a;93:648-654.

Pardee JD, Spudich JA. Purification of muscle actin. *Methods Enzymol* 1982b;85:164-181.

Patel DR, Soyode O. Pharmacologic interventions for reducing spasticity in cerebral palsy. *Indian J Pediat* 2005;72:869-872.

Piotto M, Saude V, Sklenár V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR* 1992; 2:661-665.

Pollard TD. Polymerization of ADP-actin. *J Cell Biol* 1984; 99:769-777.

Pollard TD. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol* 1986; 103:2747-2754.

Prochniewicz E, Thompson LV, Thomas DD. Age-related decline in actomyosin structure and function. *Exp Gerontol* 2007, 42:931-938.

Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Bäse K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 1993;261:50-58.

Reubold TF, Eschenburg S, Becker A, Kull FJ, Manstein DJ. A structural model for actin-induced nucleotide release in myosin. *Nature* 2003, 10:826-830.

Ribeiro AS, Salerno VP, Sorenson M. Probing actomyosin interactions with 2,4-dinitrophenol. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1748:165-173.

Rostkova EV, Moiseeva LN, Teplova MV, Nikolaeva OP, Levitsky DI. Use of stable analogs of myosin ATPase intermediates for kinetic studies of the "weak" binding of myosin heads to F-actin. *Biochemistry (Moscow)* 1999; 64:875-882.

Rould MA, Wan Q, Joel PB, Lowey S, Trybus KM. Crystal structures of expressed non-polymerizable monomeric actin in the ADP and ATP states. *J Biol Chem* 2006; 281:31909-319.

Salerno VP, Ribeiro AS, Dinucci AN, Mignaco JA, Sorenson MM. Specificity and kinetic effects of nitrophenol analogues that activate myosin subfragment 1. *Biochem J* 1997; 324:877-884.

Shaw MA, Ostap EM, Goldman YE. Mechanism of inhibition of skeletal muscle actomyosin by n-benzyl-p-toluenesulfonamide. *Biochemistry* 2003;42:6128-6135.

Skinner AL, Laurence JS. High-field solution NMR spectroscopy as a tool for assessing protein interactions with small molecule ligands. *J Pharm Sci* 2008; 97:4670-4695.

Stejskal EO, Tanner JE. Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *J Chem Phys* 1965; 42:288-292.

Szent-Györgyi AG. Meromyosins the subunits of myosin. *Arch Biochem Biophys* 1953;42:305-320.

Sung DH, Han TR, Park W, Bang HJ, Kim J, Chung S, Woo E. Phenol block of peripheral nerve conduction: titrating for optimum effect. *Arch Phys Med Rehabil* 2001;82:671-676.

Tajsharghi H. Thick and thin filament gene mutations in striated muscle diseases. *Int J Mol Sci* 2008;9:1259-1275.

Tausky HH, Shorr E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem* 1953;202:675-685.

Telley IA, Denoth J. Sarcomere dynamics during muscular contraction and their implications to muscle function. *J Muscle Res Cell Motil* 2007; 28:89-104.

Thanbichler M, Shapiro L. Getting organized – how bacterial cells move proteins and DNA. *Nature* 2008; 6:28-40.

Tilton AH. Therapeutic Interventions for tone abnormalities in cerebral palsy. *J Am Soc Exp Neurotherap* 2006;3:217-224.

Vale RD, Milligan RA. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* 2000; 288:88-95.

Weeds AG, Taylor RG. Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin. *Nature* 1975;257:54-56.

Zeng W, Conibear PB, Dickens JL, Cowie RA, Wakelin S, Malnasi-Csizmadia A, Bagshaw CR. Dynamics of actomyosin interactions in relation to the cross-bridge cycle. *Phil Trans R Soc B* 2004; 359:1843-1855.

Curriculum Vitae

Nome: Luciana Elena de Souza Fraga Machado

Nascimento: 05/08/1982

Naturalidade: Rio de Janeiro

➤ Formação Acadêmica:

- Graduação de Fisioterapia na Universidade Estácio de Sá (Fevereiro 2000 – Fevereiro 2004).
- Mestrado no curso de Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) - Setembro/2007 – Setembro/2009. Tese: “Efeito do fenol na interação acto-S1 de músculo esquelético”, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Martha Sorenson.

➤ Apresentação poster em Congresso

- 10 em congressos nacionais.
- 1 em congresso internacional.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)