



**Universidade de São Paulo**

**Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto**

**Departamento de Química**

**Programa de Pós – Graduação em Química**

***Na,K-ATPase reconstituída em lipossomos de fosfolipídios e  
colesterol: caracterização biofísica e bioquímica.***

**Juliana Sakamoto Yoneda**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de  
São Paulo, como parte das exigências para a obtenção  
do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**.

**RIBEIRÃO PRETO – SP**

**2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.



**Universidade de São Paulo**

**Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto**

**Departamento de Química**

**Programa de Pós – Graduação em Química**

***Na,K-ATPase reconstituída em lipossomos de fosfolipídios e  
colesterol: caracterização biofísica e bioquímica.***

**Juliana Sakamoto Yoneda**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de  
São Paulo, como parte das exigências para a obtenção  
do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**.

**RIBEIRÃO PRETO – SP**

**2010**



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós – Graduação em Química

*Na,K-ATPase reconstituída em lipossomos de fosfolipídios e  
colesterol: caracterização biofísica e bioquímica.*

**Juliana Sakamoto Yoneda**

Orientador: Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de  
São Paulo, como parte das exigências para a obtenção  
do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**.

**RIBEIRÃO PRETO – SP**

**2010**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Yoneda, Juliana Sakamoto

Na,K-ATPase reconstituída em lipossomos de fosfolípídeos e colesterol: caracterização biofísica e bioquímica. Ribeirão Preto, 2010.

88 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia,

Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração:

Química.

Orientador: Ciancaglini, Pietro.

1. Na,K-ATPase. 2. Proteolipossomo. 3. Lipossomo. 4. Calorimetria 5. Agregação Térmica

## *Dedicatória*

*Dedico esse trabalho à minha família:*

*Aos meus pais, Hiroshi e Yvone e deixo os meus sinceros agradecimentos por tantos esforços e sacrifícios investidos na minha educação, além de toda confiança em mim depositada. Pelas orações, pelo incentivo e pelo amor. Obrigada!*

*E às minhas irmãs Luciane e Giane. Agradeço pela amizade, por serem pessoas tão especiais, das quais eu posso ter sempre o apoio e incentivo, tão essenciais para que mais este trabalho fosse concretizado.*

*Todas minhas conquistas também são de vocês!*

## *Agradecimentos Especiais*

*À toda minha família, tias, tios, primas, primo e avó Terezinha  
agradeço imensamente pelas orações e apoio.*

*Vocês são essenciais!*

*Agradeço a **Deus** por estar sempre presente em minha vida, me  
protegendo, dando a serenidade e sabedoria para que eu conseguisse  
finalizar mais essa etapa da minha vida. Obrigada Senhor!*

*Ao Professor e orientador **Pietro Ciancaglioni**, agradeço imensamente pelos conhecimentos transmitidos, de maneira excepcional. Por toda a disposição em ajudar, sempre que necessário independente de qual seja o problema.*

*Aos colegas de laboratório **Ana, Carol, Daniela, Dudu, Maytê, Simone, Rosângela** pelo companheirismo e pela ótima convivência... por saber que estão sempre dispostos a ajudar quando preciso. À **Marcelle** pela amizade e convivência. Obrigada por estar sempre presente, ajudando em todos os momentos difíceis e compartilhando as alegrias dos bons momentos!*

*Aos alunos de iniciação científica, **Andréia, Bruno, Cynara, Thaís e Raíssa**. Obrigada pelo auxílio concedido, pela oportunidade de poder ensiná-los e com isso aprender também. Vocês são indispensáveis em nosso trabalho.*



*Aos técnicos de laboratório Ivana Aparecida Borin e Nilton Rosa Alves, pela competência e pelo auxílio indispensável na nossa rotina de trabalho. Obrigada pela disposição em ajudar sempre.*

*Aos funcionários do biotério Rinaldo e "Zé"; sempre prestativos no fornecimento dos animais.*

*À Priscila Cerviglieri Ciancaglino, pela correção dos textos em inglês*

*Aos professores e funcionários do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP*

*A CAPES, FAPESP e CNPq, pela bolsa e auxílios concedidos ao laboratório*

*Obrigada a todos também que não estão atualmente no laboratório, mas que quando presentes sempre estiveram dispostos e me ajudaram.*

*Obrigada a todos os meus amigos, que direta ou indiretamente contribuíram com esse trabalho.*

“A Percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o mistério passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

## SUMÁRIO

Siglas e Abreviaturas.....	I
Resumo.....	II
Abstract.....	IV
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Propriedades Gerais da Na,K-ATPase.....	1
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>17</b>
3.1 Preparação da Na,K-ATPase solubilizada e purificada na forma ( $\alpha\beta$ ) <sub>2</sub> .....	17
3.2 Dosagem de proteína.....	17
3.3 Preparação dos proteolipossomos.....	18
3.4 Determinação da atividade ATPase.....	19
3.5 Medidas de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico.....	20
3.6 Preparação de lipossomos por extrusão.....	21
3.7 Calorimetria Diferencial de Varredura.....	23
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>25</b>
4.1 Estudos empregando-se a enzima solubilizada e purificada.....	25
4.1.1 <i>Espalhamento de luz dinâmico – DLS</i> .....	25
4.1.2 <i>Calorimetria Diferencial de Varredura – DSC</i> .....	35
4.2 Estudos com Lipossomos e Proteolipossomos.....	45
4.2.1 <i>Espalhamento de Luz Dinâmico – DLS</i> .....	48
4.2.2 <i>Calorimetria Diferencial de Varredura</i> .....	52
<b>5. Conclusão.....</b>	<b>76</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>78</b>

## **Siglas e Abreviaturas**

$\alpha$ M – Segmento transmembrana da subunidade  $\alpha$ .  
Ala – Alanina  
Arg - Arginina  
Asn - Asparagina  
Asp - Aspartato  
ATP – Adenosina trifosfato  
BSA – Albumina de soro bovino  
C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> - Octaetileno Glicol Monododecil Éter  
CMC - Concentração Micelar Crítica  
Cp – Capacidade calorífica a pressão constante  
CTS – Esteróides Cardiotônicos  
Cys - Cisteína  
DLOPE - Dioleoilfosfatidiletanolamina  
DLS – Espalhamento dinâmico de luz  
DPPC – Dipalmitoilfosfatidilcolina  
DPPE – Dipalmitoilfosfatidiletanolamina  
DSC – Calorimetria Diferencial de Varredura  
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético  
Glu - Glutamato  
Gly – Glicina  
HEPES – Ácido hidroexietil piperazina etanosulfúrico  
Phe – Fenilalanina  
Pi – Fosfato Livre  
PI – Índice de Polidispersão  
PKA – Proteína Quinase A  
PKG – Proteína Quinase G  
Pro – Prolina  
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio  
Ser – Serina  
Tc – Temperatura Crítica de Transição  
TCA – Ácido Tricloroacético  
Thr – Treonina  
Tris – Tris-(hidroximetil)-aminoetano  
Trp – Triptofano  
Tyr – Tirosina  
Val – Valina

## Resumo

A Na,K-ATPase é uma proteína integral que utiliza a energia derivada da hidrólise do ATP para transportar íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> através da membrana contra seus gradientes eletroquímicos. É composta por três subunidades, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Alguns autores defendem que o protômero ( $\alpha\beta$ ) seja a unidade estrutural e funcional da enzima, porém outros consideram que a enzima nativa da membrana funciona como um oligômero, na forma de um dímero ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub>.

Em estudos com proteínas de membrana, o uso de detergentes é bastante comum para manter a proteína de interesse em um estado funcional após ser retirada da bicamada lipídica, além disso, sabe-se que vários fatores interferem a atividade enzimática da Na,K-ATPase e existem evidências que mostram que a bicamada lipídica, na qual a enzima está inserida, também controla a interação entre os protômeros da proteína e alterações nas suas propriedades biofísicas podem modular a atividade da enzima.

O objetivo do trabalho foi verificar o efeito de diferentes razões detergente/proteína na estabilidade da Na,K-ATPase solubilizada e de diferentes microambientes lipídicos na sua atividade, analisando as alterações no comportamento termotrópico da bicamada com a mudança da composição lipídica, observando as alterações da incorporação e recuperação da atividade enzimática quando a proteína foi reconstituída em sistemas miméticos de membrana.

Utilizando o espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi possível acompanhar o processo de agregação térmica da enzima, fornecendo informações da sua estrutura, bem como avaliar a sua estabilidade quando solubilizada.

A desnaturação térmica da Na,K-ATPase também foi avaliada por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e verificou-se que é um processo irreversível, e ocorreu entre 50 e 70°C, sendo a soma de três transições. Utilizando DSC, analisou-se ainda o comportamento termotrópico dos sistemas de lipossomos e proteolipossomos constituídos de DPPC, DPPE e colesterol. Para os sistemas vesiculares, na ausência da proteína, foi observado que para o sistema binário de DPPC e DPPE, o aumento da proporção do último lipídio induz uma separação de fase, assim como a presença de colesterol, tanto nos sistemas binários (DPPC:Col e DPPE:Col), quanto no ternário (DPPC:DPPE:Col).

Avaliou-se ainda como o microambiente lipídico interfere na incorporação e atividade da Na,K-ATPase. Verificou que diferentes quantidades de colesterol alteram a atividade enzimática, confirmando que este possui um importante papel na modulação da atividade, alterando propriedades da membrana e influenciando na conformação da proteína.

## **Abstract**

Na,K-ATPase is an enzyme that is intrinsic to the plasma membrane, responsible for the coupled active transport of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> across animal cell membranes. The enzyme consists of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunits. It has been demonstrated that the  $\alpha\beta$  form of Na,K-ATPase is capable of both ATP hydrolysis and active ion transport, however accumulating evidence suggest that the enzyme normally self-associates as  $(\alpha\beta)_2$  dimers.

In membrane protein research, the most typical use of a detergent is to maintain a target membrane protein in a functional, folded state in the absence of a membrane. Moreover, it is known that several factors influence the enzymatic activity of Na, K-ATPase and there is evidence that the lipid bilayer, in which the enzyme is located, also controls the interaction between protomers and that changes in their biophysical properties can modulate the activity of the enzyme.

The objective of this study was to investigate the effect of different detergent/protein ratios on the stability solubilized of Na, K-ATPase and different lipid microenvironments in their activity by analyzing changes in the thermotropic behavior of the bilayer, analysing the incorporation changes and the recovery of enzyme activity when the protein was reconstituted in a membrane mimetic systems.

Dynamic light scattering (DLS) was used to monitor the process of thermal aggregation of the enzyme, providing information on their structure and evaluating its stability when solubized.

The thermal denaturation of Na, K-ATPase was also evaluated by differential scanning calorimetry (DSC) and it was verified that it is an irreversible process, which occurred between 50 and 70 ° C, being the sum of three transitions. Using DSC, we analyzed the thermotropic behavior of proteoliposomes and liposomes consisting of DPPC, DPPE and cholesterol. For vesicular systems in the absence of the protein, it was observed that for the binary system of DPPC and DPPE, increasing the proportion of the latter induces a lipid phase separation and the presence of cholesterol in both binary systems (DPPC: Chol and DPPE: Chol), and in the ternary system (DPPC: DPPE: Chol) it induces a lipid phase separation.

It was also evaluated how the lipid microenvironment interferes on the incorporation and activity of Na, K-ATPase. It was found that different amounts of cholesterol alter the enzyme activity, confirming cholesterol has an important role in the modulation of the activity by altering the membrane properties and influencing the protein conformation.



## **1. Introdução**

### ***1.1 Propriedades gerais da Na,K-ATPase***

A Na,K-ATPase é uma proteína integral encontrada na membrana plasmática de praticamente todas as células animais. Ela utiliza a energia derivada da hidrólise do ATP para transportar íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> através da membrana contra seus gradientes eletroquímicos, o que colabora para manter a concentração de Na<sup>+</sup> baixa (12 mM) e de K<sup>+</sup> alta (cerca de 140 mM) dentro das células eucarióticas. Esse gradiente eletroquímico gerado é a fonte de energia para transportar (para dentro das células) solutos vitais como a glicose e aminoácidos, além de outras vias de transporte, responsáveis pela regulação do volume celular; para processos epiteliais de secreção, dentre outros (Lopina, 2001; Rajasekaran et al., 2005; Panayiotidis et al., 2006). A medula interna do rim é o local onde a enzima se apresenta em maior concentração. Em um animal em repouso, cerca de 25% do ATP celular é consumido pela Na,K-ATPase para realizar as funções descritas (Martin, 2005). Esta enzima faz parte da família das ATPases do tipo P, que representam uma família de transportadores caracterizados pela formação de um intermediário fosforilado (Hu e Kaplan, 2000), e de todos os membros, somente a Na,K-ATPase e a H,K-ATPase apresentam mais que uma subunidade (Blanco, 2005; Panayiotidis et al, 2006).

A bomba de sódio e potássio é composta por uma subunidade que apresenta atividade catalítica, denominada  $\alpha$ , e outra regulatória

denominada  $\beta$ , que se encontra altamente glicosilada (Noguchi et al., 1987; Hu e Kaplan, 2000, Jorgensen et al., 2003).

A subunidade  $\alpha$  contém aproximadamente 1000 resíduos de aminoácidos e possui massa molecular cerca de 110 kDa (Pressley, 1996; Kaplan, 2002). Diversos estudos bioquímicos determinaram que há 10 segmentos transmembrana (Canfield e Levenson, 1993; Karlsh et al., 1993; Pressley, 1996; Fiedler e Scheiner-Bobis, 1996; Jorgensen et al., 1998a, 2003; Béguin et al., 1997 Hu e Kaplan, 2000; Kaplan, 2002) e que existem 5 alças extracelulares e 4 intracelulares em sua estrutura (Kaplan, 2002; Kühlbrandt, 2004). Esta subunidade é responsável pelas propriedades catalítica e transportadora e sofre as mudanças conformacionais (designadas  $E_1$  e  $E_2$ ) acopladas à ligação, oclusão e transporte dos cátions, além de possuir os sítios de ligação de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , ATP e de esteróides cardiotônicos, como a ouabaína (Blanco, 2005).

A subunidade  $\beta$  possui massa molecular aparente cerca de 50 kDa e é composta por cerca de 370 aminoácidos. Destes, aproximadamente 30 resíduos são expostos no citosol e 300 formam a porção extracelular (Skou e Esmann, 1992; Lingrel et al., 1994; Pedersen et al., 1996; Jorgensen et al., 1998a, 1998b, 2003; Geering, 2000; Hasler et al., 2001; Kaplan, 2002). Esta subunidade apresenta um único segmento transmembrana e um ectodomínio que carrega três pontes de sulfeto e diversas cadeias de açúcar. Diversos estudos têm reportado que a subunidade  $\beta$  está envolvida na afinidade aparente de  $\text{K}^+$  pela enzima, além de ser essencial para a translação, estabilidade e

correta inserção da subunidade  $\alpha$  na membrana (Jaisser et al., 1992; Lutsenko e Kaplan, 1993; Geering et al., 1996; Fontes et al., 1999; Hasler et al., 1998, 2001; Barwe et al., 2007). Outras funções estão sendo atribuídas à subunidade  $\beta$ , por exemplo, um importante papel em processos relacionados à polaridade da célula, como a adesão e mobilidade celular, transição de célula epitelial a mesenquimal e transformação oncogênica (Geering, 2008).

A contribuição da Na,K-ATPase para diversos processos fisiológicos requer que as suas funções sejam ajustadas especificamente com a necessidade de cada tecido. Uma das estratégias desenvolvida pelo organismo para conferir tal versatilidade é a expressão de isoformas com capacidades funcionais distintas (Blanco, 2005).

Foram identificadas quatro isoformas para a subunidade  $\alpha$  em diferentes tecidos. A isoforma  $\alpha_1$  é encontrada praticamente em todas as células, principalmente em rim, onde uma regulação especialmente fina da Na,K-ATPase é requerida (Lopina, 2001). As isoformas  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  são encontradas distribuídas em diversos tecidos, como cérebro, coração, cartilagem, útero e placenta e finalmente, a forma  $\alpha_4$  é normalmente localizada em testículos, encontrada em humanos e ratos (Woo et al., 2000; Kaplan, 2002, Blanco, 2005). As isoformas  $\alpha$  possuem similaridade na estrutura primária. Comparações entre a seqüência de aminoácidos para uma variedade de espécies indicam um alto índice de conservação. Para  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  a similaridade é de aproximadamente 92% e para  $\alpha_3$ , cerca de 96%. A isoforma  $\alpha_4$  de rato, camundongo e humano

possuem 90% de identidade (Blanco, 2005).

Para a subunidade  $\beta$  têm sido reportadas três isoformas (Shull et al., 1986; Martin-Vasallo et al., 1989; Gloor et al., 1990; Malik et al., 1996; Blanco, 2005; Madan et al., 2007). Assim como no caso da subunidade  $\alpha_1$ , a  $\beta_1$  é predominante em rim de mamíferos. As isoformas  $\beta_2$  e  $\beta_3$  estão presentes em diversos tecidos, como cérebro, cartilagem, músculo esquelético, dentre outros. Além disso, a existência de uma possível quarta isoforma tem sido proposta em músculo ( $\beta_m$ ) (Skou e Esmann, 1992; Lingrel e Kuntzweiler, 1994; Pestov et al., 1999; Blanco, 2005; Geering, 2008). As  $\beta$ -isoformas também possuem alto índice de conservação dos aminoácidos para as diferentes espécies, cerca de 95% para  $\beta_1$  e  $\beta_2$  e 75% para  $\beta_3$ . (Blanco, 2005).

As interações entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  através de seus segmentos transmembrana e domínios citoplasmáticos parecem ter importância tanto estrutural quanto funcional, pois tentativas de separação das subunidades levam à perda da atividade catalítica ou resulta em uma subunidade  $\alpha$  com atividade catalítica bastante diferente daquela da forma associada (Skou e Esmann, 1992; Ivanov et al., 2000; Jorgensen et al., 2003). As isoformas podem ser combinadas de diferentes maneiras, resultando em alta heterogeneidade da enzima. As combinações  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_1\beta_2$ ,  $\alpha_1\beta_3$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_2$ ,  $\alpha_2\beta_3$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_2$ ,  $\alpha_3\beta_3$ ,  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_4\beta_3$  já foram estudadas e se mostraram enzimas cataliticamente competentes (Blanco, 2005).

Considera-se também em alguns tecidos, a existência de uma

pequena proteína com um único segmento transmembrana, apresentando a extremidade N-terminal voltada para o meio extracelular e C-terminal para o citoplasma. Pertencente à família FXYP foi descoberta por Forbush et al. (1978), expressa principalmente no rim, possui massa molecular cerca de 10 kDa (Therien e Blostein, 2000; Geering, 2006) e é considerada a terceira subunidade da bomba de sódio e potássio, denominada  $\gamma$  (FXYP2) (Béguin et al., 1997; Garty e Karlish, 2005). Esta subunidade está localizada próxima ao segmento transmembrana M9 e modula a atividade da enzima pela mudança da afinidade aparente pelo sódio, potássio e ATP (Geering, 2008).

O contra-transporte de íons realizado pela Na,K-ATPase segue o mecanismo bem conhecido proposto há cerca de trinta anos por Albers e Post onde, em certas condições fisiológicas, três íons sódio são movidos para fora da célula e dois íons potássio são transportados para o citoplasma, na estequiometria de uma molécula de ATP hidrolisada e envolve um ciclo no qual a enzima apresenta dois estados conformacionais: uma forma  $E_1$ , que tem uma alta afinidade pelos íons sódio, e  $E_2$ , com alta afinidade pelo íon potássio (Albers, 1967; Post et al., 1969; Martin, 2005). O modelo atualmente descrito sugere ainda que a ligação dos íons à molécula da enzima passa por dois estágios: uma forma não ocluída e outra ocluída (Jorgensen et al., 2003). Um passo chave para a transferência de energia necessária no transporte ativo desta enzima é que, durante o ciclo reacional, há formação de um intermediário fosforilado (na presença de  $\text{Na}^+$ ), sendo esse fosfato de alta energia e ligado covalentemente à enzima. O íon  $\text{K}^+$  promove a liberação

do grupo fosfato no decorrer do ciclo como um fosfato livre (Pi), fazendo com que a enzima retorne a um estado pronto para a ligação com outro ATP (Jorgensen et al., 2003; Martin, 2005).

A estrutura cristalina da Na,K-ATPase de rim de porco foi resolvida e revelou uma estrutura composta por três subunidades (Morth et al., 2007).

A subunidade  $\alpha$  possui uma topologia similar a da Ca-ATPase com três domínios citoplasmáticos característicos: o atuador (A), o de ligação de nucleotídeo (N) e o de fosforilação (P), os quais, juntos com os dez segmentos transmembranas  $\alpha$ M1 -  $\alpha$ M10, foram bem resolvidos em mapas de densidade eletrônica (Morth et al., 2007).

A unidade assimétrica do cristal consiste de duas  $\alpha\beta\gamma$ -unidades com limitado contato entre os domínios A e não há interação entre os segmentos transmembrana das  $\alpha$ -subunidades. A única interação entre domínios da membrana ocorre entre  $\beta$ -subunidades, que estão opostamente orientadas em relação ao plano da membrana (Morth et al., 2007).

Foram identificados dois sítios de ligação na subunidade  $\alpha$  para íons  $K^+$ , localizados entre as hélices transmembrana  $\alpha$ M4,  $\alpha$ M5 e  $\alpha$ M6 (Morth et al., 2007).

A hélice transmembrana da subunidade  $\beta$  foi claramente visível no mapa de densidade eletrônica, atravessando a membrana com uma inclinação próxima de  $45^\circ$  e fazendo um contato direto com  $\alpha$ M7 e  $\alpha$ M10. Está mais próxima da  $\alpha$ M7 e aproxima-se de  $\alpha$ M10 na

extremidade extracelular, em concordância com conclusões prévias que a subunidade  $\beta$  juntamente com  $\alpha M7$  permanecem ancoradas na membrana, enquanto que  $\alpha M8$ - $\alpha M10$  são liberadas na desnaturação térmica (Morth et al., 2007).

Além disso, de acordo com dados de microscopia eletrônica, os mapas de densidade eletrônica indicam que a  $\beta$ -subunidade cobre as porções extracelulares  $\alpha M5$ - $\alpha M6$  e  $\alpha M7$ - $\alpha M8$  e isso pode estar relacionado à sua função essencial na oclusão dos íons  $K^+$  (Morth et al., 2007).

Já a subunidade  $\gamma$  possui uma estrutura predominantemente em  $\alpha$ -hélice e está localizada próxima a  $\alpha M9$  e não entre  $\alpha M9$  e  $\alpha M2$ , como foi sugerido por estudos baseados na estrutura da Ca-ATPase (Morth et al., 2007).

A estrutura cristalina da Na,K-ATPase extraída de glândulas retais de tubarão também foi descrita em resolução de 2,4 Å (Shinoda et al., 2009).

Uma comparação detalhada entre a estrutura da Ca-ATPase e da Na,K-ATPase revelou importantes diferenças pertinentes às suas funções, embora cada um dos três domínios citoplasmáticos e as 10 hélices transmembranas sejam sobreponíveis. Na Ca-ATPase, o domínio citoplasmático tem uma configuração compacta, estabilizada, em parte, por duas ligações de hidrogênio entre os domínios atuador (A) e nucleotídeo (N). Na Na,K-ATPase os domínios A e N interagem fortemente, somente por uma ponte salina envolvendo a Glu 223 (A;

correspondendo a Val 185 na Ca-ATPase) e Arg 551 (N; Arg 550). O domínio N da Na,K-ATPase está aproximadamente 22° mais afastado do domínio P que na Ca-ATPase, o que é talvez pertinente ao seu turnover enzimático muito mais rápido ( $200\text{s}^{-1}$  versus  $30\text{s}^{-1}$ ) (Shinoda et al., 2009).

Na região transmembrana, o desenrolamento da  $\alpha\text{M5}$  (em Asn 783) e  $\alpha\text{M7}$  (em Gly 855) se destaca. O segmento da  $\alpha\text{M7}$ , próxima da superfície citoplasmática tem uma dobra diferente de aproximadamente 18°, que parece ter uma importância central na ligação do  $\text{K}^+$ . Na resolução de 2.4 Å, a geometria de coordenação do  $\text{K}^+$  com a associação de moléculas de água é evidente. O sítio 1 é feito essencialmente de apenas cinco átomos de oxigênio, de uma única cadeia principal (Thr 779), três cadeias laterais (Ser 782, Asn 783 e Asp 811) e uma molécula de água. O átomo de oxigênio mais próximo da Glu 786 está 3.4 Å afastado e não tem contribuição. O sítio 1 tem uma valência de 1,06 e está bem qualificado para ser um sítio de alta afinidade por  $\text{K}^+$  (valência ideal = 1,0) (Shinoda et al., 2009).

O sítio 2 está desviado 1.3 Å para o lado extracelular em comparação com o sítio 1. O sítio 2 é coordenado por três cadeias principais (Val 329, Ala 330 e Val 332), três ou quatro oxigênio de cadeias laterais (Asn 783, Glu 786, Asp 811 e possivelmente Glu 334) e nenhuma molécula de água. Embora o número de coordenação seja alto, a soma das valências parciais é mais baixa que do sítio 1, sendo 0,64. Glu 334 na  $\alpha\text{M4}$  é um resíduo estruturalmente muito importante,



consistente com resultados de mutagêneses. Assim, os dois sítios de coordenação de íons  $K^+$  têm características diferentes, mas a geometria de coordenação é bastante distorcida em ambos. A soma das valências parciais calculada para  $Na^+$  é de 0,62 no sítio 1 e 0,54 no sítio 2, explicando a menor afinidade para  $Na^+$  neste estado (Shinoda et al., 2009).

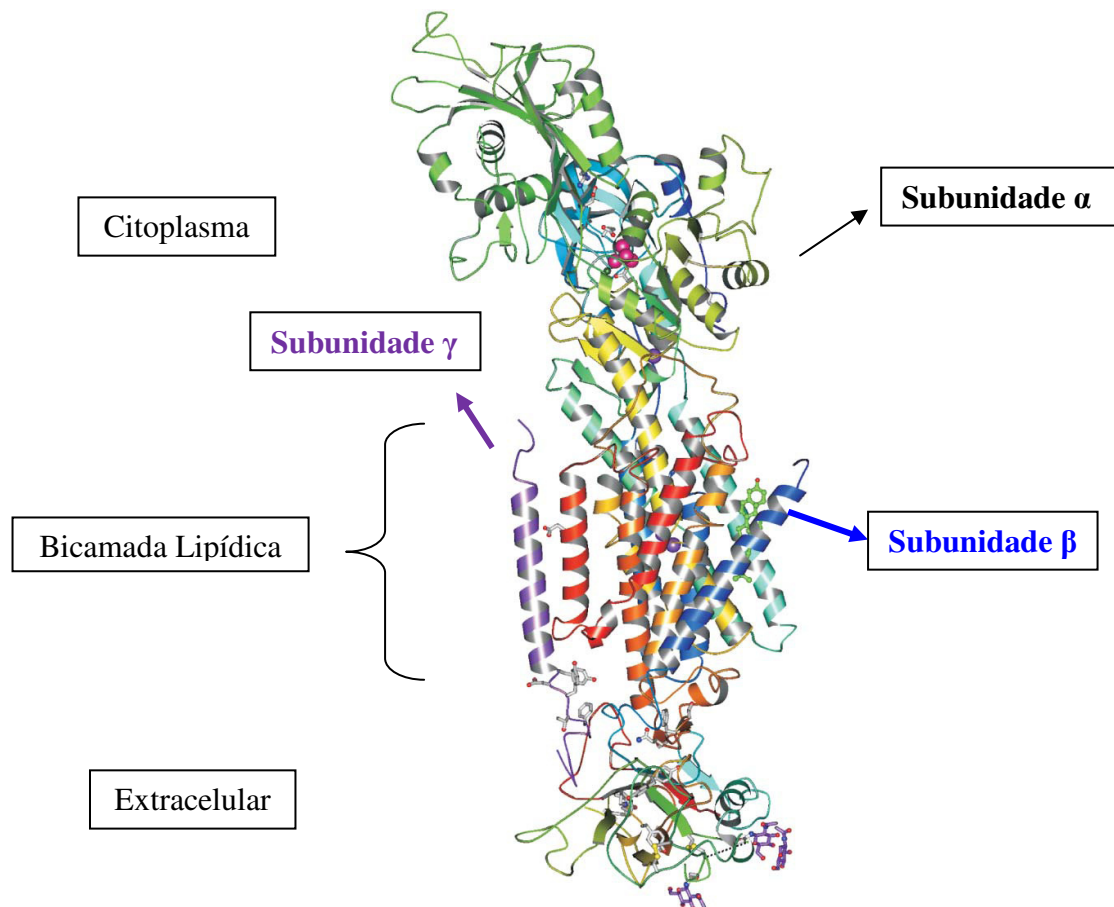
Uma diferença evidente é a presença da Pro785 na hélice  $\alpha M5$  na Na,K-ATPase ao invés de Gly 770 na Ca-ATPase. Devido a esse resíduo de prolina, a  $\alpha M5$  é desenrolada e dobrada ( $\sim 18^\circ$ ) de tal maneira que o oxigênio da Thr 779 torna-se disponível para a coordenação de  $K^+$ . A  $\alpha M5$  da Ca-ATPase é similarmente dobrada, mas é uma hélice contínua, criando um pequeno espaço extra. O desdobraimento da  $\alpha M7$  parece então ser de grande importância na ligação de  $K^+$ . Este desdobraimento é estabilizado pela ligação de hidrogênio da Tyr 44 da subunidade  $\beta$  com a Gly 855, que por outro lado ficaria exposta na porção hidrofóbica da bicamada lipídica. Portanto, a Ca-ATPase não pode se ligar a íons  $K^+$ , porque não possui a subunidade  $\beta$ . Nota-se também a presença de uma molécula de colesterol, que parece proteger a parte desenrolada da  $\alpha M7$ . A sua presença então está potencialmente relacionada à forte dependência da atividade da Na,K-ATPase pelo colesterol (Shinoda et al., 2009).

A subunidade  $\beta$  é uma proteína de membrana com um único segmento de grande importância na orientação e estabilização, mas que também afeta a ligação dos íons e as propriedades de transporte. O seu

domínio extracelular é grande, glicosilado e rico em resíduos aromáticos. A hélice transmembrana está inclinada aproximadamente 32° da normal da membrana, quase paralela a  $\alpha$ M7. Entretanto, forma quatro ligações de hidrogênio e numerosos contatos com duas hélices transmembranas da subunidade  $\alpha$ , primariamente usando dois clusters de resíduos aromáticos. O primeiro cluster, próximo do colesterol, é formado a partir de quatro resíduos (Phe 39 – Tyr 44) da subunidade  $\beta$  e um (Tyr 1001) da M10 da subunidade  $\alpha$ . Ambos, Tyr 40 e Tyr 44 interagem com  $\alpha$ M7 e colesterol. O outro cluster está na parte extracelular, do qual sete resíduos de quatro hélices participam. Tais interações complexas entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , explicam em parte, resultados prévios que implica na participação da subunidade  $\beta$  na modulação dos transportes dos cátions (Shinoda et al., 2009).

A Na,K-ATPase extraída de glândulas retais de tubarão possui ainda uma proteína regulatória, FXYD10. A sua parte transmembrana está aproximadamente perpendicular à membrana, interagindo quase que exclusivamente com a parte extracelular da  $\alpha$ M9. Dois conservados resíduos de Gly, em particular a Gly 34, são evidentemente importantes para isso. Ligações de hidrogênio são encontradas somente entre Cys 31 e  $\alpha$ Glu 960. Como a  $\alpha$ Glu 960 será exposta a parte hidrofóbica da membrana se a FXYD estiver ausente, ela terá que encontrar um par para fazer a ligação de hidrogênio dentro da subunidade  $\alpha$ . Por isso é concebível que a FXYD10 desempenha um papel importante de regulação através das interações com a  $\alpha$ Glu 960. A função do motivo

FXYD parece claro. O primeiro resíduo, Phe 12, ancora o segmento para a subunidade  $\beta$  e o último resíduo, Asp 15, cobre a hélice. O terceiro resíduo, Tyr 14, e o subsequente Tyr 16 formam um cluster de resíduos aromáticos com  $\beta$ Tyr 69 e  $\alpha$ Trp 987 para formar um sanduíche da subunidade  $\beta$  junto com a subunidade  $\alpha$ . Glu 10/Arg 11 e Tyr 16 mediam uma complexa rede de ligações de hidrogênio entre ambas as subunidades. Então, funcionalmente, o motivo deveria ser considerado FXYD/W. O último resíduo Tyr é substituído por Trp em FXYD3 e FXYD4, mas o seu anel irá funcionar similarmente como doador de hidrogênio para  $\beta$ Asp 71 (Shinoda et al., 2009).



**Figura 1.** Arquitetura da Na,K-ATPase com  $\text{MgF}_4^{2-}$  e  $\text{K}^+$  ligados. (Shinoda et al., 2009)

A relação entre a estrutura quaternária e a função da Na,K-ATPase ainda é contestável. O principal questionamento é se o protômero ( $\alpha\beta$ ) é suficiente para o transporte dos cátions ou se este mecanismo de transporte requer associações do tipo  $(\alpha\beta)_n$ . É geralmente aceito que o heterodímero ( $\alpha\beta$ ) seja a unidade estrutural mínima da enzima e vários estudos mostraram a presença de associações entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  com estequiometria 1:1, tanto para a enzima na membrana quanto para a enzima solubilizada com detergente, demonstrando que o complexo formado não ocorre devido a colisões ao acaso na membrana, mas sim por associações funcionais proteína:proteína (Glynn, 1985; Askari, 1987; Boldyrev, 2001; Ivanov et al., 2002; Martin, 2005; Rigos et al., 2008; 2010).

Embora existam autores que consideram o protômero como a unidade funcional e estrutural da enzima (Ward e Cavieres, 1993, 1996; Martin et al., 2000; Takeda e Kawamura, 2001), há outros que consideram que a enzima nativa da membrana funciona como um oligômero, na forma de um dímero:  $(\alpha\beta)_2$  (Thoenges e Schoner, 1997; Antolovic et al., 1999; Santos e Ciancaglini, 2003, Costa et al., 2003, Laughery et al., 2004, Rigos et al., 2006, Pilotelle-Buner et al., 2008), ou ainda na forma de um tetraprotômero:  $(\alpha\beta)_4$  (Mahaney et al., 1990; Taniguchi et al., 2001; Donnet et al., 2001).

A Na,K-ATPase possui várias funções fisiológicas. Alterações de expressão e/ou seu mau funcionamento pode estar relacionado à patogênese de diversas doenças. De fato, alterações na expressão e

atividade da Na,K-ATPase foi observada em pacientes com doença de Alzheimer, diabetes, hipertensão e câncer. Portanto, a bomba de sódio e potássio pode ser o alvo para o desenvolvimento de diferentes drogas, como, por exemplo, drogas anticâncer, pois funciona como um versátil transdutor de sinal, fator fundamental na adesão celular (Chen et al., 2006).

A atividade catalítica da Na,K-ATPase pode ser regulada diretamente pela proteína quinase A (PKA) e proteína quinase G (PKG) na subunidade  $\alpha$  (Therien e Blostein, 2000; Panayiotidis et al., 2006). Além disso, a atividade da bomba pode ser modulada por outros determinantes, como a concentração dos substratos, sendo a bomba ativada por  $\text{Na}^+$  e ATP no lado intracelular e por  $\text{K}^+$  no lado extracelular, ou ainda a presença de componentes de membrana associados como espectrina, actina e anquirina, dentre outros, e finalmente, a presença de hormônios como corticoesteróides e inibidores endogênicos como glicosídeos cardíacos (Panayiotidis et al., 2006).

Esteróides cardiotônicos (CTS), conhecidos como ligantes da bomba de sódio e potássio têm sido amplamente utilizados para o tratamento da insuficiência cardíaca. Embora CTS fossem anteriormente considerados importantes na regulação do transporte de sódio renal e pressão arterial, trabalhos recentes implicam que esses hormônios estão envolvidos no crescimento celular, diferenciação, apoptose, modulação de imunidade e metabolismo de carboidrato, além de várias funções do sistema nervoso. Estes inibidores possuem sítios

de ligação específicos nas porções extracelulares  $\alpha$ M1- $\alpha$ M2;  $\alpha$ M5- $\alpha$ M6 e  $\alpha$ M7- $\alpha$ M8 e há evidências que concentrações extremamente baixas de CTS, que provavelmente não inibe a bomba, são capazes de iniciar a sinalização de diversos processos, o que é extremamente importante para diversas funções celulares (Bagrov et al., 2009).

Dentre os hormônios, a ouabaína é o mais importante e se insere no domínio transmembrana, muito próximo aos íons  $K^+$ . A estrutura cristalina da Na,K-ATPase ligada a ouabaína e potássio descrita por Ogawa et al.(2009) apoia a proposta de que as hélices M5 e M6 são os principais sítios de ligação da ouabaína, porém solicita reconsideração de estudos anteriores de que o hormônio se liga à porção extracelular da enzima.

Tem sido descrito que essa ligação da ouabaína à Na,K-ATPase afeta múltiplas funções celulares, como por exemplo a ocorrência de efeitos na expressão gênica, ligação celular, modificação da resposta imune, dentre outros (Xie et al. 2003). O mecanismo no qual a Na,K-ATPase atua como biosinalizador é baseado na ligação da ouabaína e então a enzima passa a ter uma interação física com outras moléculas sinalizadoras (Chen et al., 2006; Aperia, 2007). De acordo com Costa et al. (2003), esse papel “secundário” da interação da Na,K-ATPase com outras proteínas pode estar relacionado com a dimerização da enzima, uma vez que foi sugerido que essas interações ocorram no “loop” M4 e M5 da subunidade  $\alpha$ , o que justificaria a formação de dímeros na célula, ainda que essa formação, como já descrito, não seja essencial

para o transporte dos cátions na membrana.

Além desses fatores, existem evidências que mostram que a bicamada lipídica, na qual a enzima está inserida, também controla a interação entre os protômeros da Na,K-ATPase (Mimura et al, 1993; Askari, 2000, Lopina, 2001) e que alterações nas propriedades biofísicas da membrana podem modular a atividade da enzima (Zhang et al., 2008).

## **2. Objetivos**

1. Determinar os estados oligoméricos e parâmetros termodinâmicos da Na,K-ATPase solubilizada e purificada, através do mecanismo de desnaturação da enzima, analisado por espalhamento dinâmico de luz e por calorimetria diferencial de varredura em diferentes proporções de proteína e detergente;
2. Determinação de parâmetros termodinâmicos do lipossomo e proteolipossomo constituído de DPPC, DPPE e colesterol.
3. Correlacionar a temperatura de transição lipídica com a atividade catalítica da enzima.



### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Preparação da Na,K-ATPase solubilizada e purificada na forma $(\alpha\beta)_2$**

As frações de membrana da Na,K-ATPase foram extraídas da medula externa de rim de coelho e solubilizadas com C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> na relação proteína:detergente de 1:1 (p/p), instantaneamente a 4°C, conforme descrito por Santos et al. (2002).

A Na,K-ATPase solubilizada foi purificada em sistema Äkta purifier (Amersham Biosciences) empregando-se coluna de Sepharose 6FF (2,6 x 200 cm), equilibrada e eluída com tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM e C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 0,005 mg/mL, a 4°C. O eluato foi monitorado continuamente a 280 nm e as frações coletadas foram acompanhadas por atividade PNFFase e ATPase. As frações que apresentaram atividade ATPase foram reunidas e concentradas por ultrafiltração em sistema Amicon, dialisadas em tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,0, contendo C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 0,005 mg/mL por 2 horas, a 4°C, congeladas empregando-se gelo seco e acetona e finalmente armazenadas em freezer a -20°C.

#### **3.2 Dosagem de proteína**

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método descrito por Hartree (1972) na presença de SDS 2% (p/v) utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

### 3.3 Preparação dos proteolipossomos

O fosfolipídio ou mistura de fosfolipídios foi dissolvida em clorofórmio, que foi removido através da passagem de uma corrente de nitrogênio, formando um filme nas paredes do recipiente. Estes filmes foram mantidos a vácuo por 1 hora, para garantir a completa desidratação do meio. Em seguida os filmes foram ressuspensos em tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM e C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 10 mg/mL e deixados em banho à temperatura de 60°C durante uma hora com agitações a cada 10 minutos em Vortex. Posteriormente a mistura lipídio-detergente foi sonicada por 1 minuto, utilizando-se um sonicador de ponta (VibraCell VC-600) e deixada por 1 hora à temperatura ambiente.

Os proteolipossomos foram preparados pela co-solubilização de lipídios, proteína e detergente em diferentes relações conforme descrito por Santos et al. (2005). A Na,K-ATPase solubilizada e purificada em tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM e C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 0,005 mg/mL foi incubada com a mistura de lipídio-detergente por 10 minutos, em banho de gelo. O detergente foi então removido pela adição da resina Bio-Beads (200 mg/mL), em intervalos repetidos de 5, 10 e 45 minutos. A resina foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos e finalmente, a suspensão de vesículas foi ultracentrifugada por 1 hora, a 100.000xg a 4°C.

As atividades PNFFase e ATPase total, antes da ultracentrifugação bem como a atividade presente no sobrenadante e

no pellet foram usadas para calcular a porcentagem de incorporação da Na,K-ATPase aos lipossomos.

### **3.4 Determinação da atividade ATPase**

A atividade ATPase foi determinada descontinuamente, a 37°C, utilizando-se um espectrofotômetro Spectronic Modelo Genesis 2 (Milton Roy), pela dosagem do fosfato inorgânico liberado, em meio reacional HEPES 50 mM contendo ATP 3 mM, pH 7,5 e KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM e NaCl 50 mM em volume final de 1,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de enzima ao meio reacional e interrompida pela adição de solução gelada de TCA 30% (p/v), em tempos reacionais pré-estabelecidos (Santos et al., 2005).

Os tubos foram então colocados em banho de gelo para diminuir a hidrólise do ATP e imediatamente centrifugados por 10 minutos. Em seguida, foi efetuada a dosagem de fosfato, seguindo o método descrito por Heinomen e Lahti (1981). Em cada experimento foram incluídos controles sem a enzima para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato. As determinações foram feitas em duplicatas e tomando-se o cuidado para não hidrolisar mais que 5% de substrato. Uma unidade de enzima foi definida arbitrariamente como sendo 1 nmol de fosfato liberado por minuto, nas condições padrões do teste.

### 3.5 Medidas de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico.

As medidas de distribuição de tamanho dos lipossomos e proteolipossomos foram realizadas empregando-se o equipamento da Beckman Coulter (modelo N5 Submicron Particle Size Analyser).

Nos experimentos de espalhamento de luz dinâmico, o diâmetro médio é determinado a partir do coeficiente de difusão,  $D$ , das vesículas quando estas se movem ao acaso devido ao movimento Brawniano. O coeficiente de difusão das vesículas é calculado a partir da flutuação da intensidade da luz espalhada, expressa através do decaimento da função de correlação:

$$g(\tau) = 1 + e^{(-2Dq^2 \tau)} \quad (\text{Equação 1})$$

onde  $g(\tau)$  é função de auto-correlação temporal,

$D$  é o coeficiente de difusão das partículas,

$q$  é o módulo do vetor de espalhamento

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (\text{Equação 2})$$

onde  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação e  $\theta$  é o ângulo da luz coletada em relação ao feixe incidente.

A intensidade de luz espalhada é modulada através do movimento Brawniano das vesículas que se difundem resultando na ampliação da largura da linha do laser (efeito Doppler). Pelo exame da amplitude espectral da luz espalhada, o tamanho da vesícula pode ser calculado.

O raio hidrodinâmico pode ser obtido pela equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{K_B T}{6\Pi\eta R_H} \quad (\text{Equação 3})$$

onde  $K_B$  é a constante de Boltzmann

$T$  é a temperatura (kelvin)

$\eta$  é a viscosidade do solvente

$R_H$  é o raio hidrodinâmico

Para a medida do diâmetro médio dos lipossomos, diluíram-se as amostras em água Mili-Q, até que a intensidade estivesse dentro da faixa requerida pelo equipamento (entre  $5 \times 10^4$  e  $1 \times 10^6$ ).

Quando se realizou os estudos com a proteína solubilizada, utilizou-se uma concentração de 0,3 mg/mL, alterando a concentração de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> e temperatura de acordo com cada experimento.

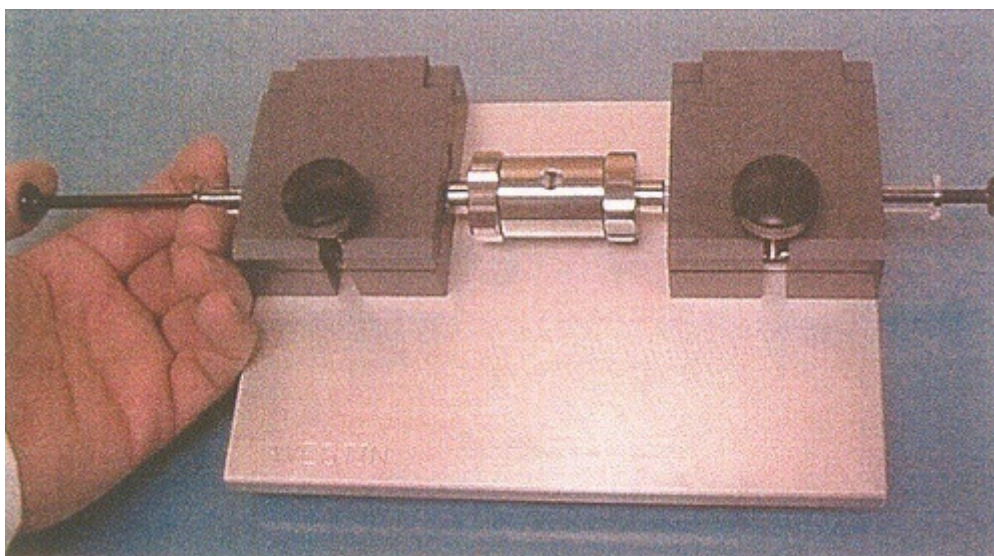
Para o estudo de agregação térmica, a enzima solubilizada ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub> foi incubada em banho termostaticado na temperatura requerida por trinta minutos. Após esse tempo a medida de espalhamento de luz foi feita em temperatura ambiente (25°C).

### **3.6 Preparação de lipossomos por extrusão**

Os lipídios foram pesados de acordo com a composição desejada e dissolvidos em clorofórmio. O clorofórmio foi removido através da passagem de uma corrente de nitrogênio formando um filme nas paredes do tubo. Estes filmes foram mantidos a vácuo por 1 hora, para garantir a completa desidratação do meio. Em seguida o filme foi

ressuspensão no tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM a fim de formar uma solução de concentração final total de lipídio de 1 mg / mL. A solução foi deixada em banho à temperatura de 60°C durante uma hora com agitações a cada 10 minutos em Vortex.

Um mini extrusor (Liposofast da Sigma-Aldrich) foi montado com duas seringas de 0,50 mL, como mostrado na Figura 2 e a solução de lipídeos foi transferida de uma seringa para outra por 21 vezes, passando através de uma membrana de policarbonato colocada entre dois suportes na forma de anel para que não houvesse a ruptura dessa. Isto foi realizado sob fluxo de ar quente para que o sistema atingisse a temperatura de transição. A solução extrusada foi então recolhida e a medição do diâmetro dos lipossomos formados foi feita por espalhamento de luz (Beckman Coulter – N5 Submicron Particle Size Analyser).



**Figura 2.** Esquema do extrusor utilizado na preparação dos lipossomos.

### 3.7 Calorimetria Diferencial de Varredura

Os estudos de calorimetria foram realizados utilizando um aparelho N - DSC II: Differential Scanning Calorimeter da Calorimetry Sciences Corporation.

A amostra de lipossomo e a referência (tampão) foram inicialmente desaeradas e aplicadas no calorímetro (300  $\mu$ L de cada). Foi realizada uma varredura de temperatura de 10°C a 90°C, com velocidade de aquecimento de 0,5 °C/min e uma varredura de 90°C a 10°C com velocidade de resfriamento de 0,5 °C/min. Esse ciclo foi repetido por pelo menos mais uma vez.

Um sistema de controle aumenta imediatamente a energia fornecida para a amostra quando o processo é endotérmico, e aumenta a energia fornecida para a referência quando o processo é exotérmico, conservando assim o sistema com a mesma temperatura. Um gráfico da energia fornecida pelos aquecedores é formado, possibilitando quantificar as transformações, uma vez que a compensação de potência é proporcional à energia envolvida na reação.

Os dados de potência ( $\mu$ W) são transformados em capacidade calorífica molar (Equação 4) e finalmente determinam-se os valores de temperatura de transição, variação de entalpia (Equação 5), variação de entropia (Equação 6) e a energia livre de Gibbs (Equação 7).

$$C_p(T) = \frac{\frac{dt}{dT} \cdot \Delta P \cdot V_{cel} \cdot \rho \cdot C_{solvente} - (V_{cel} - V_{soluto}) \cdot \rho \cdot C_{solvente}}{V_{cel} \cdot [Soluta]} \cdot MM \quad (\text{Equação 4}),$$

onde

$V_{\text{cel}}$  = volume da célula do calorímetro

$\rho$  = densidade do solvente

$V_{\text{soluto}}$  = volume do soluto na célula da amostra

$C_{\text{solvente}}$  = capacidade calorífica do solvente

MM = massa molar do soluto

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_t) + \int_{T_t}^T \Delta C_p(T) dT \quad (\text{Equação 5})$$

$$\Delta S(T) = \frac{\Delta H(T_t)}{T_t} + \int_{T_t}^T \Delta C_p(T) d \ln(T) \quad (\text{Equação 6})$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Equação 7})$$



## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1 Estudos empregando-se a enzima solubilizada e purificada**

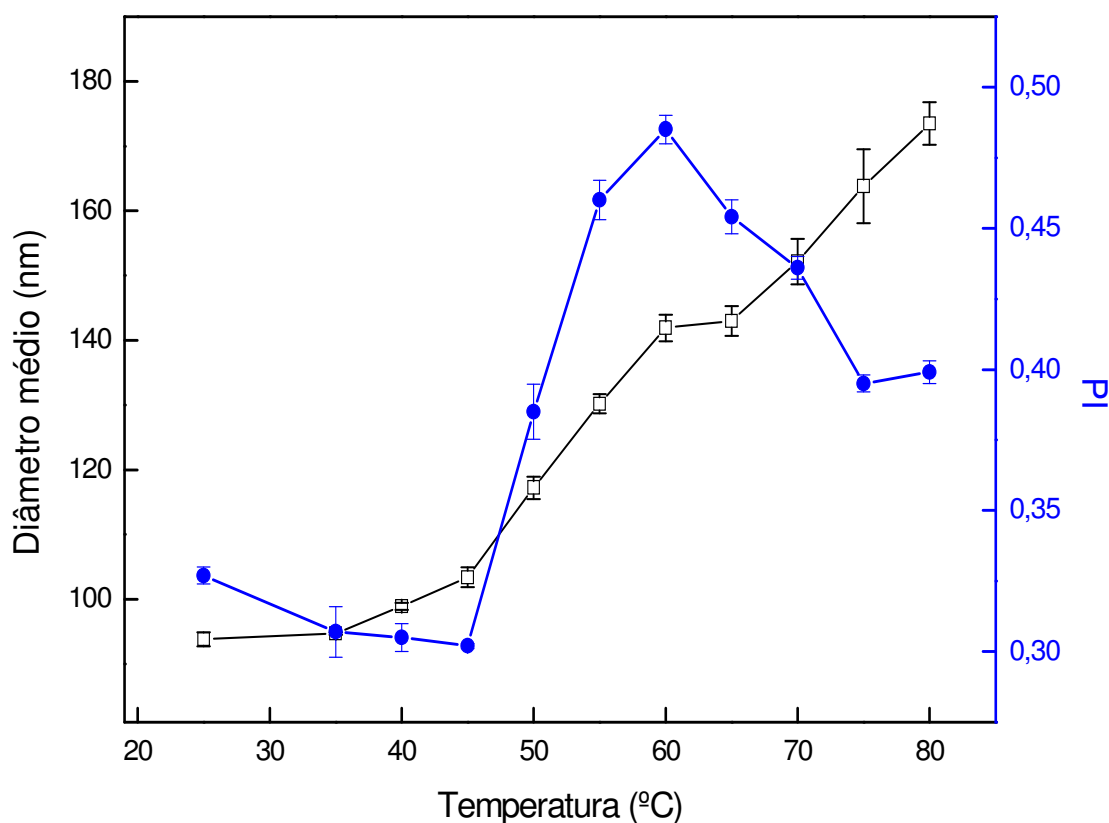
#### **4.1.1 Espalhamento dinâmico de luz - DLS**

A interpretação dos resultados de experimentos com a enzima solubilizada tem sido dificultada devido a relativa instabilidade e tendência de agregação entre as subunidades  $\alpha$  da enzima. Diferentes agregados entre subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  podem ser formados dependendo do método usado para solubilizar e purificar a proteína e diferentes estequiometrias entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da Na,K-ATPase são observadas (Rigos et al., 2006).

Para avaliar o comportamento da Na,K-ATPase solubilizada realizou-se um estudo de agregação térmica por espalhamento dinâmico de luz (DLS). Como a proteína agregada possui uma habilidade maior de espalhar a luz que a molécula original, uma maneira conveniente de estudar a cinética de agregação seria o registro do aumento da intensidade da luz espalhada. Um grande número de investigações de agregação para diferentes proteínas foi realizado, nos quais o tamanho dos agregados foi estimado por DLS (Markossian et al., 2009).

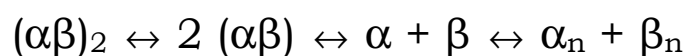
Além do diâmetro hidrodinâmico, o índice de polidispersão (PI) é um parâmetro importante para auxiliar na interpretação dos resultados, já que nos fornece informações sobre a distribuição de tamanho das partículas, mostrando o quão homogênea está a solução.

De acordo com a Figura 3 verifica-se que o diâmetro médio aumenta conforme se aumenta a temperatura, indicando que deve ocorrer o processo de agregação térmica, além disso, há o aparecimento de um pico nos valores de PI entre 50 e 70°C.



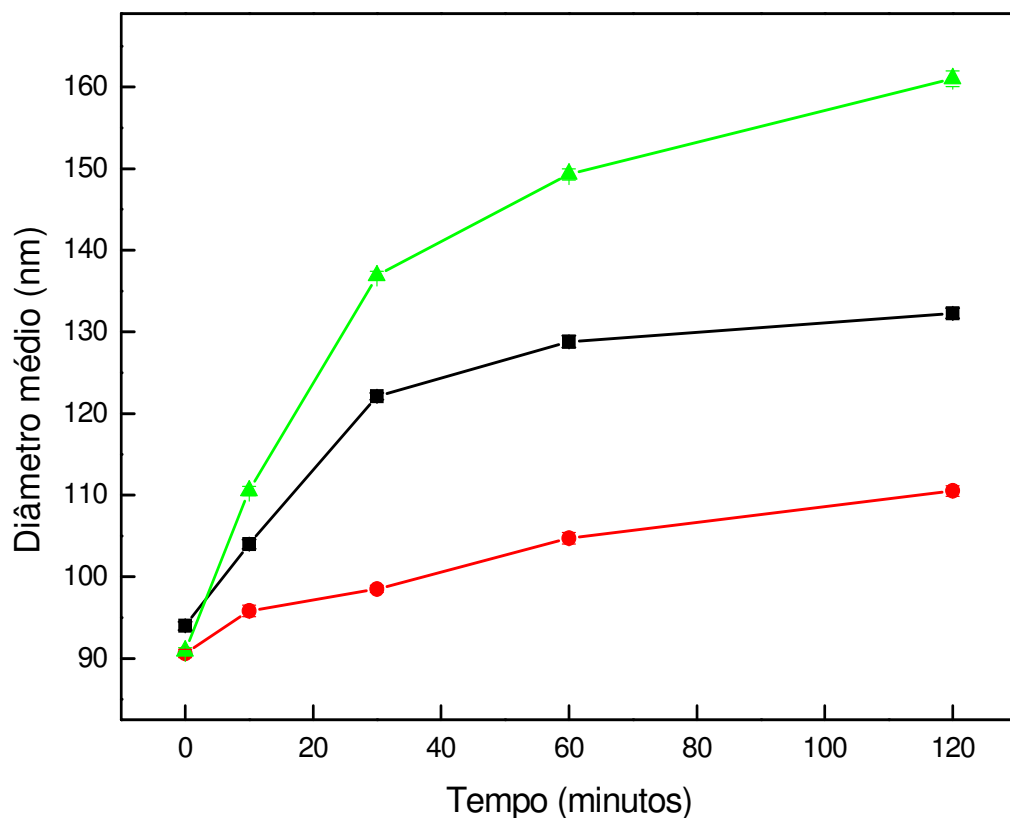
**Figura 3.** Medidas do diâmetro médio ( $\square$ ) e índice de polidispersão ( $\bullet$ ) realizadas por DLS à 25°C da enzima solubilizada ( $0,3\text{mg mL}^{-1}$ ) em tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM e  $\text{C}_{12}\text{E}_8$   $0,005\text{ mg mL}^{-1}$ , incubada por 30 minutos em diferentes temperaturas.

Resultados de inativação térmica da enzima solubilizada, monitorando a atividade PNPPase e estudos de dicroísmo circular numa faixa de temperatura de 10 a 80°C foram descritos por Rigos et al. (2006). Esse trabalho mostrou que a atividade catalítica da enzima foi reduzida em duas etapas, uma primeira em 32°C e outra em 52°C. Esta última ocorre provavelmente devido a um processo de desenovelamento e agregação da proteína. Estes resultados, portanto, estão de acordo com os obtidos por DLS, confirmando que a partir de 50°C deve ocorrer separação das subunidades com posterior agregação entre subunidades  $\alpha$ , o que deve provocar o aumento do índice de polidispersão, já que partículas de diferentes tamanhos estão presentes, resultando em uma solução mais heterogênea. A partir dessa temperatura a formação de agregados permanece, visto que o diâmetro continua a aumentar, mas por outro lado, uma diminuição dos valores de PI é observada, já que deve predominar agora, a presença de agregados com tamanhos semelhantes, formando, portanto uma solução mais homogênea.



Para verificar se o processo de agregação térmica é tempo dependente, a amostra foi incubada em determinada temperatura em diferentes tempos. Escolheram-se temperaturas na faixa onde deve ocorrer a desnaturação térmica da enzima e observa-se pela Figura 4 que altas temperaturas resultam em agregados maiores, mas depois de

duas horas, os valores de diâmetro médio dos agregados se mantêm constantes.



**Figura 4.** Medidas do diâmetro médio realizadas por DLS à 25°C da enzima solubilizada ( $0,3\text{mg mL}^{-1}$ ) em tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM e  $\text{C}_{12}\text{E}_8$   $0,005\text{ mg mL}^{-1}$ , incubada em diferentes tempos em 50°C (●); 60°C (■) e 70°C (▲).

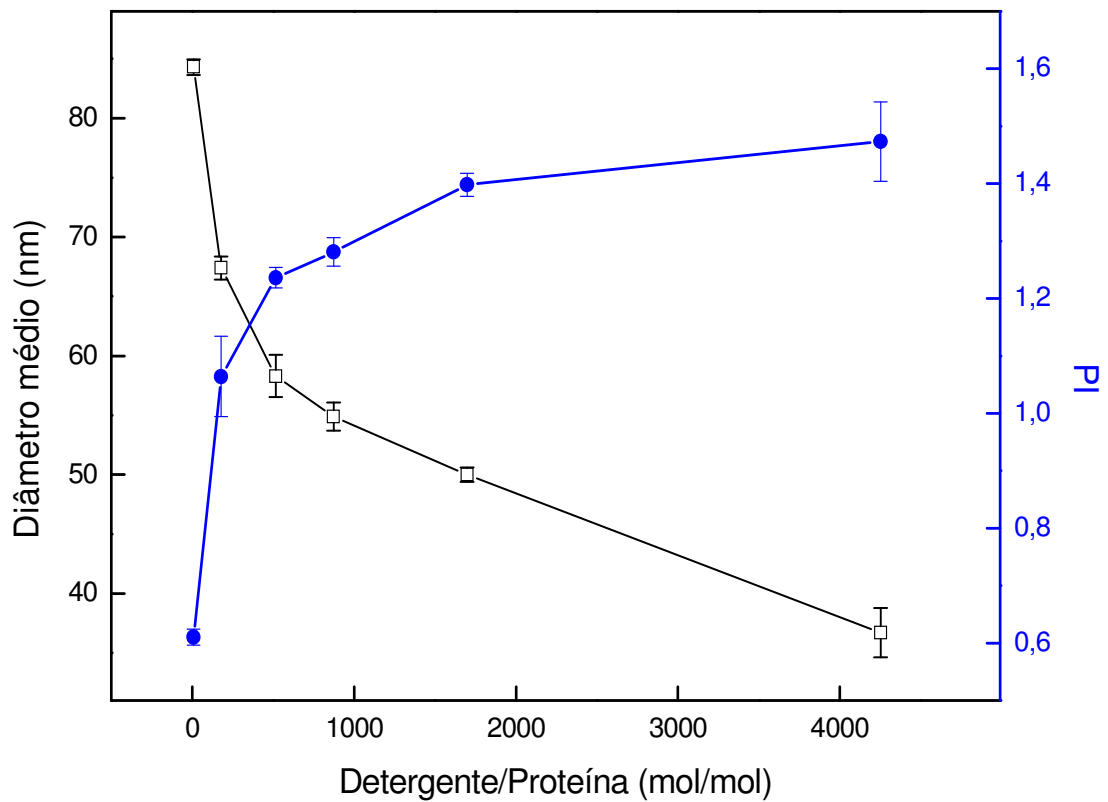
Em estudos com proteínas de membranas, o uso de detergentes é essencial para manter a proteína de interesse em um estado funcional fora da bicamada (Privé, 2007). Os fatores que influenciam a estabilidade e agregação da Na,K-ATPase em solução têm sido o foco de diversos estudos. Sabe-se que proteínas integrais solubilizadas com o uso de detergentes não-iônicos mantêm sua estrutura nativa e atividade por um tempo considerável. A razão detergente/proteína é um parâmetro crucial para o processo de agregação e desnaturação da enzima depois de removê-la da região hidrofóbica da membrana lipídica.

Trabalhos realizados anteriormente no nosso laboratório mostraram a influência dessa razão na atividade catalítica e na estrutura da enzima. Verificou-se que em concentrações de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> abaixo de 0,1 mg/mL a atividade não foi afetada, mas que em altas concentrações, a atividade teve um decaimento sigmoidal com ponto de inversão em 0,4 mg/mL de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> que corresponde a uma razão molar C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>/proteína cerca de 300. Também foram observadas alterações na estrutura secundária, analisando resultados de dicroísmo circular, em diferentes concentrações de detergente (Rigos et al., 2008).

Experimentos de espalhamento dinâmico de luz foram então realizados com a finalidade de compreender o efeito do surfactante nas propriedades estruturais da proteína, acrescentando informações e contribuindo para a interpretação dos resultados.

Observa-se na Figura 5 que conforme se aumenta a proporção de detergente, o diâmetro médio das partículas diminui, enquanto que o PI aumenta exponencialmente. Isto indica que o detergente deve induzir a

segregação das subunidades da enzima e prevenir a agregação entre elas. Estes resultados estão condizentes com Esmann (1984) e Mimura et. al (1993) que também observaram mudanças na estrutura oligomérica da Na,K-ATPase purificada de rim de cachorro. Nos referidos trabalhos, com o aumento da concentração de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, a massa molar da enzima diminuiu, indicando que o estado de oligomerização depende das condições do meio e que o detergente provocou a dissociação da proteína. Por outro lado, vale ressaltar que o detergente deve formar micelas em solução, quando acima da CMC (0,053 mg/mL), que possuem tamanho em torno de 7 nm, o que deve contribuir para o aumento da polidispersão e a diminuição do tamanho médio das partículas.



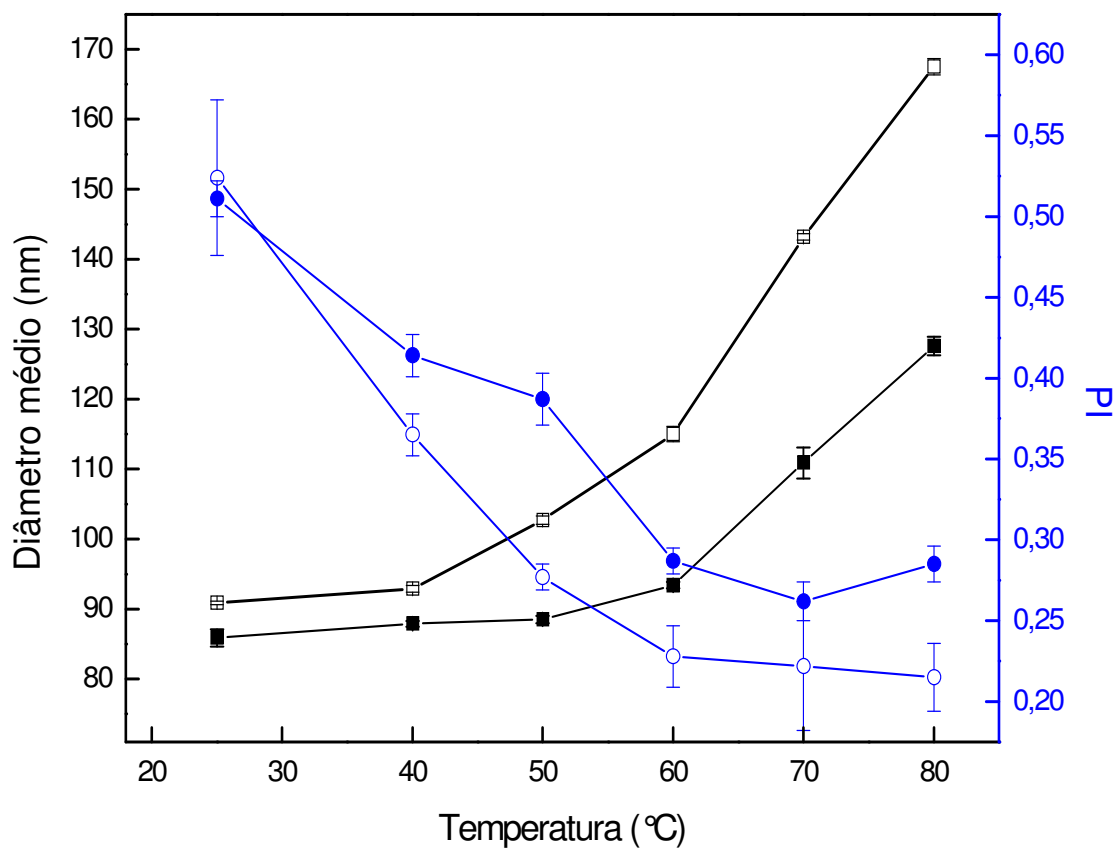
**Figura 5.** Medidas do diâmetro médio (□) e índice de polidispersão (●) realizadas por DLS à 25°C da enzima solubilizada em tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM, incubada com diferentes concentrações de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>.

Em altas concentrações de detergente o processo de agregação é muito mais lento, porém a atividade enzimática é perdida mais rapidamente, que de acordo com Esmann (1984) ocorre devido a delipidação, já que os lipídios associados são essenciais para manter a estrutura nativa da enzima.

Com a finalidade de verificar se a presença do detergente previne, e se sua concentração interfere no processo de agregação térmica da enzima, medidas de diâmetro médio e PI foram feitas, utilizando 0,1 e 1,0 mg/mL de  $C_{12}E_8$ , alterando a temperatura de incubação da amostra de 25 à 80°C.

Observando-se a Figura 6 percebe que em ambas as concentrações de detergente, o diâmetro médio aumenta, provavelmente devido ao processo de agregação, entretanto, na concentração de 1,0 mg/mL o tamanho dos agregados atinge um valor inferior daqueles quando a concentração de  $C_{12}E_8$  é dez vezes menor. Isto pode ser explicado, considerando que uma maior concentração de  $C_{12}E_8$  possui uma capacidade maior de impedir que após a separação das subunidades, estas passem por um processo de agregação, favorecendo as interações proteína-detergente e desfavorecendo as interações proteína-proteína, limitando o tamanho dos agregados a um valor inferior. Porém, ressaltando novamente, o fato de haver mais micelas em solução, com diâmetro médio de 7 nm, contribuindo para um tamanho médio menor.

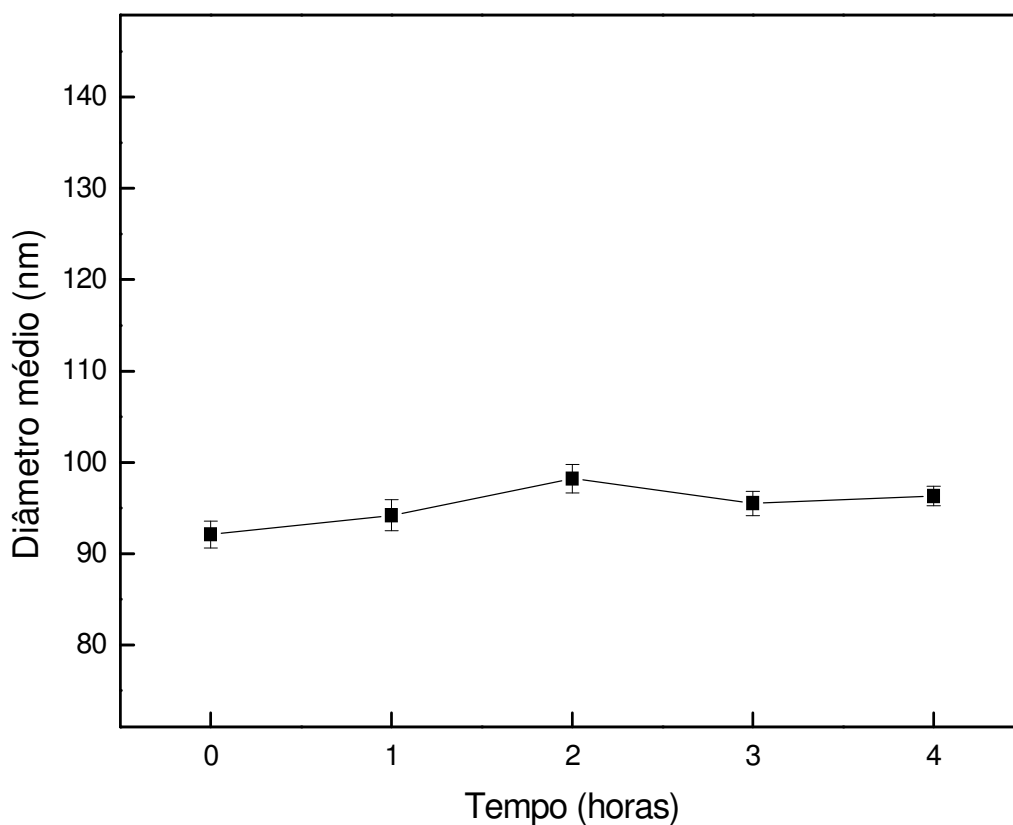




**Figura 6.** Medidas do diâmetro médio ( $\square$ ) e índice de polidispersão ( $\circ$ ) realizadas por DLS à 25°C da enzima solubilizada ( $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ ) em tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM, incubada com  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  (símbolos abertos) e  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  (símbolos fechados) de  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  em diferentes temperaturas.

Com a finalidade de avaliar a estabilidade da amostra e para confirmar que a agregação ocorre devido ao aumento da temperatura, realizou-se um experimento monitorando o diâmetro médio da proteína em temperatura ambiente com o decorrer do tempo.

Conforme mostra a Figura 7, conclui-se que a proteína possui relativa estabilidade com o tempo em temperatura ambiente, já que não foi observada uma alteração significativa do tamanho durante um período de quatro horas.



**Figura 7.** Medidas do diâmetro médio realizadas por DLS à 25°C da enzima solubilizada ( $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ ) em tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, KCl 150 mM, em diferentes tempos.

#### **4.1.2 Calorimetria Diferencial de Varredura - DSC**

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma técnica de grande importância na caracterização termodinâmica de modelos de biomembranas, além disso, representa um dos métodos mais empregados em estudos de desenovelamento de proteínas, fornecendo informações na organização estrutural e interações dos domínios cooperativos. Baseado nos valores fornecidos por essa técnica, a análise termodinâmica de uma proteína permite a elucidação de características da sua estrutura terciária e ainda a determinação das contribuições das interações que mantêm a estabilidade da estrutura nativa (Minetti e Remeta, 2006).

O processo de oligomerização, como toda reação em equilíbrio, pode ser induzido ou afetado pelas condições do meio, como temperatura, pH, força iônica e especificamente, a concentração total de proteína. Os parâmetros termodinâmicos obtidos por DSC a partir da desagregação térmica ajudam a compreender a física da oligomerização da proteína (Burgos et al., 2008).

Com o objetivo de estudar as interações entre as subunidades e a estabilidade térmica e corroborar os dados obtidos por DLS, realizou-se experimentos de calorimetria com a enzima solubilizada em diferentes proporções detergente/proteína.

Nota-se pela Figura 8 que nas condições que a Na,K-ATPase é purificada, há o aparecimento de um pico complexo, entre 50 e 70°C, mostrando que a desnaturação térmica da Na,K-ATPase pode ser a

soma de três transições de diferentes domínios cooperativos. Grinberg et al. (2001) também obteve três picos, porém com temperaturas menores, provavelmente devido à ausência de íons  $K^+$  na amostra, já que é bem estabelecido que esse íon estabiliza a Na,K-ATPase (Donnet et al., 2001).

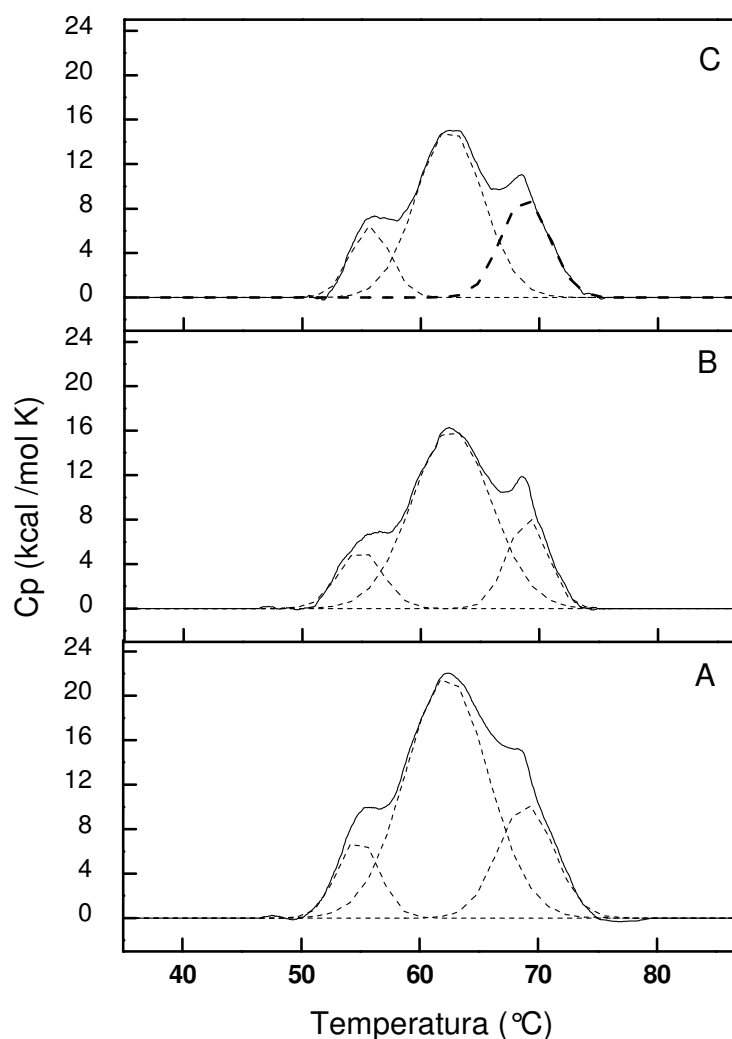
Alterações nas condições de preparo de amostra resultam em termogramas diferentes como mostrado por Fodor et al. (2008), já que fatores que afetam a estabilidade da enzima são refletidos nos resultados calorimétricos. Esses autores também observaram diferenças entre os termogramas da enzima extraída de rim de porco e da extraída das glândulas salivares de tubarão e atribuiu essa alteração de estabilidade térmica às diferentes propriedades da bicamada lipídica, uma vez que mudanças relativamente pequenas entre as subunidades  $\alpha$  não seriam capazes de provocar uma grande alteração na temperatura de transição. A maior mobilidade dos lipídios na membrana de tubarão, em uma dada temperatura, leva a uma maior flexibilidade da estrutura protéica e, portanto, uma maior probabilidade de desenovelamento. Nesse contexto então, vale destacar que a parcial delipidação da enzima na solubilização com o detergente  $C_{12}E_8$  confere uma grande termolabilidade da proteína.

O aparecimento de múltiplas curvas no termograma pode ser atribuído a sucessivas transições ou desenovelamentos independentes de domínios diferentes (ou a combinação de ambos). Entretanto há uma grande dificuldade em identificar essas transições. Grinberg et al.

(2001) atribuiu a segunda transição à subunidade  $\beta$ , enquanto que as outras duas correspondem à subunidade  $\alpha$ .

Pelo ponto de vista estrutural, a Na,K-ATPase é composta de regiões que são expostas no meio aquoso e outras que estavam primariamente em contato com os lipídios da membrana. Portanto, a determinação da origem das transições da subunidade  $\alpha$ , em termos de domínios estruturais é difícil, considerando a complexidade do sistema.

Outros autores encontraram picos variados para a Na,K-ATPase de diferentes fontes (Chetverin et al., 1986; Stolz et al., 2003). Portanto, é difícil fazer comparações entre diferentes preparações, já que diferentes condições e fontes refletem em diferentes estabilidades térmicas e conseqüentemente, em diferentes termogramas.



**Figura 8.** Termograma  $C_p$  (Kcal/mol K) em função da Temperatura (°C), após subtração da linha de base, da enzima solubilizada em diferentes concentrações: 1,9 mg/mL (A); 1,5 mg/mL (B) e 0,9 mg/mL (C) em tampão Tris.HCl 5 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup>, KCl 150 mmol L<sup>-1</sup> e C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 0,005 mg mL<sup>-1</sup>. As medidas foram realizadas conforme descrito no item 3.7 de Material e Métodos, utilizando um equipamento N-DSC II.

A Figura 8 mostra ainda a dependência da concentração total de proteína no processo de desnaturação térmica, visto que a quantidade total de proteína influencia diretamente no estado oligomérico da enzima. Com o auxílio da Tabela I percebe-se que os parâmetros termodinâmicos apenas da segunda transição são proporcionais à concentração total de proteína. Para uma concentração intermediária (1,5 mg/mL) nota-se um valor maior da largura na meia altura do pico ( $\Delta T_{1/2}$ ) para a primeira transição, portanto uma cooperatividade menor. Por outro lado, uma maior cooperatividade é observada para a terceira transição nessa mesma concentração, indicando que a interação rompida resultando nessa transição, deve ser favorecida nessa concentração.

**Tabela I:** Parâmetros termodinâmicos das três transições após a deconvolução dos picos da desnaturação térmica da Na,K-ATPase em diferentes concentrações

[Proteína] (mg/mL)	Transição 1			Transição 2			Transição 3		
	T <sub>c1</sub> (°C)	ΔH <sub>1</sub> (kcal/mol)	ΔT <sub>1/2</sub> (°C)	T <sub>c2</sub> (°C)	ΔH <sub>2</sub> (kcal/mol)	ΔT <sub>1/2</sub> (°C)	T <sub>c3</sub> (°C)	ΔH <sub>3</sub> (kcal/mol)	ΔT <sub>1/2</sub> (°C)
1,9	55	31	3,4	62	189	6,9	69	60	4,7
1,5	55	24	3,7	63	135	6,6	69	35	3,3
0,9	56	27	3,3	62	107	5,6	69	45	4,0

Grinberg et al. (2001) identificou as transições realizando uma proteólise limitada, utilizando condições nas quais somente a parte extra-membrana da  $\alpha$ -subunidade foi digerida, mantendo a subunidade  $\beta$  intacta. Dessa maneira, os autores desse trabalho atribuíram a segunda transição à subunidade  $\beta$  e as outras à subunidade  $\alpha$ .

A desnaturação térmica não significa necessariamente o completo desenovelamento da cadeia polipeptídica. Para muitas proteínas tem sido mostrado que ocorre apenas uma perda conformacional, mantendo a estrutura secundária, mas perdendo a terciária (Donnet et al., 2001). Portanto, algumas dessas transições devem ser resultados desse tipo de alteração, na qual deve ocorrer o rompimento de interações entre as subunidades, que podem ser mais fortes ou fracas dependendo da



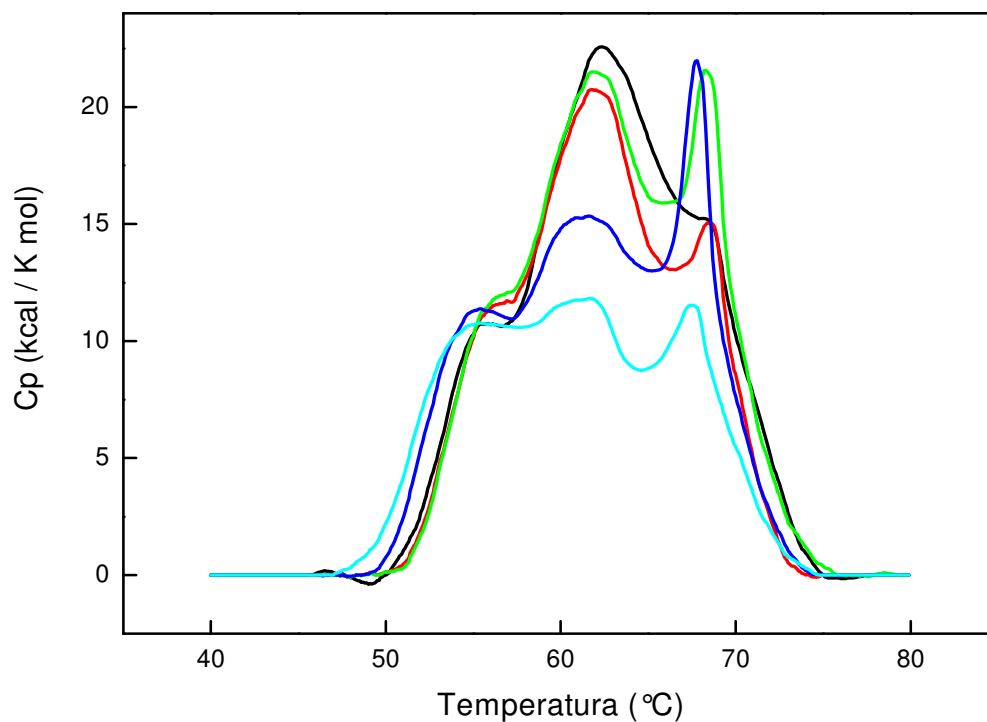
quantidade de proteína presente, entretanto, é difícil prever quais interações são rompidas.

Alterações provocadas pela presença de diferentes concentrações de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> na amostra de Na,K-ATPase também foi avaliada por DSC. Observando-se a Figura 9 fica claro que diferentes quantidades de detergente provocam alterações nas interações da enzima que resultam nos diferentes termogramas das amostras. Visualiza-se a presença das três transições na faixa de concentração de detergente utilizada, porém, a altura e largura dos picos são modificadas.

Observando-se os valores da Tabela II, nota-se que para a primeira transição, os valores de  $\Delta H$  é crescente até a concentração de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> igual a 0,1 mg/mL. Quando a concentração é 0,5 mg/mL (correspondente a uma razão molar detergente/proteína próxima de 170), o valor de  $\Delta H$  é reduzido, ou seja, é necessário uma menor energia para que ocorra o evento. Se considerarmos que a transição seja resultado do rompimento de interação entre as subunidades, conclui-se que nessa proporção, esta interação é desfavorecida, ou seja, a presença de moléculas de detergente atrapalha a interação proteína-proteína. Este desvio também é observado para a segunda e terceira transição e é claramente visto na Figura 9, em azul escuro, na qual o pico relativo à segunda transição possui altura menor e largura maior, enquanto que o terceiro pico é nitidamente mais alto e mais fino. A segunda transição possui um valor maior de  $\Delta H$ , sendo então necessária uma maior energia para que essa transição ocorra, indicando que essa proporção de detergente estabiliza, e a mudança de

conformação que resulta nesse pico é dificultada. Por outro lado, o terceiro pico possui uma área menor, portanto, menos energia é necessária para que ocorra a transição.

Estas observações podem ser subsídios para identificar a primeira e terceira transição como sendo o rompimento de interações do tipo  $\alpha$ - $\alpha$ , que na presença de detergente devem ser mais fracas e a segunda transição pode estar relacionada à perda de conformação de alguma estrutura que é estabilizada pelas moléculas de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>.



**Figura 9.** Termograma Cp (Kcal/mol K) em função da Temperatura (°C), após subtração da linha de base, da enzima solubilizada em diferentes concentrações de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>: 0,005 mg/mL (—); 0,05 mg/mL (—); 0,10 mg/mL (—); 0,50 mg/mL (—) e 1,00 mg/mL (—); em tampão Tris.HCl 5 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup>, KCl 150 mmol L<sup>-1</sup> e. As medidas foram realizadas conforme descrito no item 3.7 de Material e Métodos, utilizando um equipamento N-DSC II.

**Tabela II:** Parâmetros termodinâmicos das três transições obtidos pela deconvolução dos picos (não mostrado) da desnaturação térmica da Na,K-ATPase (1,9 mg/mL) em diferentes concentrações de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>

[C <sub>12</sub> E <sub>8</sub> ] (mg/mL)	Transição 1			Transição 2			Transição 3		
	T <sub>c1</sub>	ΔH <sub>1</sub>	ΔT <sub>1/2</sub>	T <sub>c2</sub>	ΔH <sub>2</sub>	ΔT <sub>1/2</sub>	T <sub>c3</sub>	ΔH <sub>3</sub>	ΔT <sub>1/2</sub>
	(°C)	(kcal/mol)	(°C)	(°C)	(kcal/mol)	(°C)	(°C)	(kcal/mol)	(°C)
0,005	55	31	3,4	62	189	6,9	69	60	4,7
0,05	55	37	3,7	62	167	6,4	69	52	3,5
0,10	55	41	3,7	62	165	6,1	68	82	3,8
0,50	54	23	3,2	62	202	10,6	68	30	1,9
1,00	54	66	5,2	61	81	5,6	68	54	4,4

## 4.2 Estudos com Lipossomos e Proteolipossomos

A membrana celular na qual a Na,K-ATPase está inserida, bem como outras proteínas de membrana, contém uma grande variedade de lipídios. Presumivelmente, os diferentes tipos de lipídios devem ter papel celular importante na função tanto da membrana quanto da proteína. Ainda hoje o papel específico dos lipídios não está esclarecido, no entanto sabe-se que as interações moleculares da interface lipídio/proteína têm um importante papel, não somente na regulação da relação estrutura/função nas membranas celulares, mas também em uma variedade de relevantes aspectos biológicos (Pantusa et al., 2008).

Em nosso laboratório foi padronizada uma metodologia para a obtenção da Na,K-ATPase em uma forma solúvel, purificada, ativa e estável e foi realizada a caracterização da membrana da qual a enzima foi extraída.

Em estudos prévios realizados, foi determinada a quantidade de fosfolipídios presentes na membrana interna de rim de coelho, da qual a enzima é extraída. Dentre os fosfolipídios constituintes, deve ser destacada a fosfatidiletanolamina, representando 13,4%, a fosfatidilcolina, com 29,7%, a esfingomiéline, com 19,2%, a lisofosfatidilcolina, com 19,2% e ainda a fosfatidilserina, com 14,6%. Além disso, foi também quantificado o colesterol total presente na fração de membrana, nas formas esterificado e livre, com 58,1% sendo relacionado ao colesterol livre e 41,9% ao esterificado.

A complexidade da maioria das membranas biológicas dificulta o estudo de seus componentes individuais “in situ”. Estudos de transporte de íons, cinética e mecanismo de hidrólise de substratos, propriedades estruturais de algumas proteínas transportadoras (como a Na,<sup>+</sup>-K-ATPase) são muitas vezes investigados usando-se frações de membrana. No entanto, os resultados obtidos podem ser de difícil interpretação, uma vez que outros sistemas transportadores de íons presentes podem interferir direta ou indiretamente (Gennis, 1989; Yeagle, 1993).

A reconstituição de proteínas de membrana, após sua purificação, em sistemas lipídicos artificiais (lipossomos) é uma das técnicas mais empregadas para estabelecer e investigar muitos de seus aspectos funcionais, sem interferências de outros constituintes presentes nessa membrana (Rigaud, 2002; Rigos et al., 2006; Santos et al., 2006).

Dentre os diversos métodos empregados na preparação de lipossomos, o método de co-solubilização se apresenta como o de maior sucesso na reconstituição de proteínas de membrana. Nesse método de preparação, em uma etapa inicial a proteína é co-solubilizada com fosfolipídios em um detergente apropriado formando uma solução isotrópica de lipídio-proteína-detergente e micelas lipídio-detergente. Em seguida, o detergente é removido resultando em uma progressiva formação da bicamada lipídica com a proteína incorporada (Cornelius, 2001; Rigaud, 2002; Santos et al., 2005; Rigos et al., 2006).

Estudos prévios com a enzima já mostraram que sistemas lipídicos com DPPS, tanto sozinho quanto em sistemas vesiculares

binários em composição com DPPC, DPPE, ou DLOPE ou mesmo em sistemas vesiculares ternários não foram eficientes na incorporação da enzima. Já sistemas lipídicos binários com famílias de PC e PE revelaram ser eficientes na incorporação da Na,K-ATPase (dependendo da relação lipídio:lipídio empregada). Nesse contexto, é importante ressaltar que misturas de fosfolipídios são mais efetivas na reconstituição da Na,K-ATPase, principalmente quanto à estabilidade e integridade do sistema vesicular bem como semelhança ao sistema natural.

Outro fato a ser destacado é a importância da presença do colesterol na formação dos proteolipossomos. A presença do colesterol resulta em uma melhora da incorporação da enzima, aumentando a quantidade de atividade ATPase total. Além disso, a atividade e estrutura da enzima são descritas ser fortemente modulada pela presença de colesterol na membrana, e variações na quantidade dessa molécula pode levar a um aumento ou ainda diminuição da sua atividade (Cuevas et al., 2006; Cornelius, 2008).

Assim, foram realizados estudos com lipossomos constituídos de DPPC e DPPE na presença e na ausência de colesterol, a fim de determinar os parâmetros para posteriormente compará-los com os resultados dos proteolipossomos.

#### 4.2.1 Espalhamento Dinâmico de Luz – DLS

Para uma melhor compreensão dos resultados dos sistemas ternários, foi necessário estudar primeiramente o comportamento de cada um dos lipídios, bem como as possíveis combinações dos sistemas binários: DPPC:DPPE; DPPC:Colesterol e DPPE:Colesterol.

Os sistemas binários de lipossomos de DPPC:DPPE foram preparados em diferentes proporções, todos com concentração de 1 mg total mL<sup>-1</sup>. Os valores de diâmetro dos lipossomos formados foram medidos por DLS e a média de cinco repetições com o respectivo desvio padrão está apresentada na Tabela III.

**Tabela III:** Valores dos diâmetros médio e índice de polidispersão (PI) dos lipossomos constituídos de DPPC:DPPE em diferentes proporções (mol:mol)

DPPC:DPPE	Diâmetro (nm)	PI
9:1	141,3 ± 5,3	0,213 ± 0,018
8:2	166,4 ± 4,4	0,457 ± 0,010
7:3	197,4 ± 6,1	0,882 ± 0,015
6:4	589,5 ± 4,0	1,687 ± 0,012
1:1	NF	NF

\*NF: Não formaram vesículas



Observou-se um aumento do tamanho das vesículas e dos valores de PI com o aumento da quantidade de DPPE. Esse aumento pode ser explicado pela diferença na estrutura dos fosfolipídios empregados. Isso porque o DPPC se apresenta na membrana como uma forma cilíndrica; enquanto o DPPE possui um formato de um cone invertido truncado, o que provavelmente leva ao aumento do diâmetro do lipossomo (Gennis, 1989). Quando a proporção de DPPC e DPPE foi 6:4, o tamanho observado e o PI foram relativamente maiores que nas outras proporções, concluindo-se que essa é a razão limite para a formação dessas vesículas, visto que quando se tentou preparar a proporção 1:1, não se obteve a formação do lipossomo.

O diâmetro dos lipossomos constituídos de DPPC e DPPC:Colesterol estão apresentados na Tabela IV. Nota-se que há formação de vesículas com tamanho de acordo com a membrana utilizada na extrusão (100 nm) para o lipossomo constituído de DPPC. Entretanto, para o sistema binário DPPC:Colesterol, o tamanho observado foi maior, mas não houve grande variação do diâmetro nas diferentes proporções de colesterol. O aumento do diâmetro na presença do colesterol deve ocorrer porque a sua inserção provavelmente dificulta o empacotamento dos lipídios na bicamada.

**Tabela IV:** Valores dos diâmetros médio e índice de polidispersão (PI) dos lipossomos constituídos de DPPC com diferentes porcentagem em mol de colesterol

<b>% Colesterol</b>	<b>Diâmetro (nm)</b>	<b>PI</b>
0	129,5 ± 0,60	0,010 ± 0,004
10	155,4 ± 1,32	0,060 ± 0,012
20	158,5 ± 1,53	0,069 ± 0,044
30	160,1 ± 0,40	0,040 ± 0,015

Quando se tentou preparar os lipossomos constituídos de DPPE e colesterol não houve a formação de vesículas, já que medidas de diâmetro médio foram realizadas e não se obteve resultados coerentes com tamanho de lipossomos.

Os sistemas ternários constituídos de DPPC, DPPE e colesterol também foram preparados e os valores dos diâmetros médios e índice de polidispersão dos lipossomos estão mostrados na Tabela V.

**Tabela V:** Valores dos diâmetros médio e índice de polidispersão (PI) dos lipossomos constituídos de DPPC e DPPE (1:1 mol:mol) com diferentes porcentagem em mol de colesterol. Observação: na ausência de colesterol não ocorre a formação de vesículas.

<b>% Colesterol</b>	<b>Diâmetro (nm)</b>	<b>PI</b>
10	250,5 ± 2,18	0,697 ± 0,185
20	214,5 ± 3,73	0,776 ± 0,194
30	213,7 ± 2,94	0,810 ± 0,215
40	218,2 ± 3,44	0,663 ± 0,398

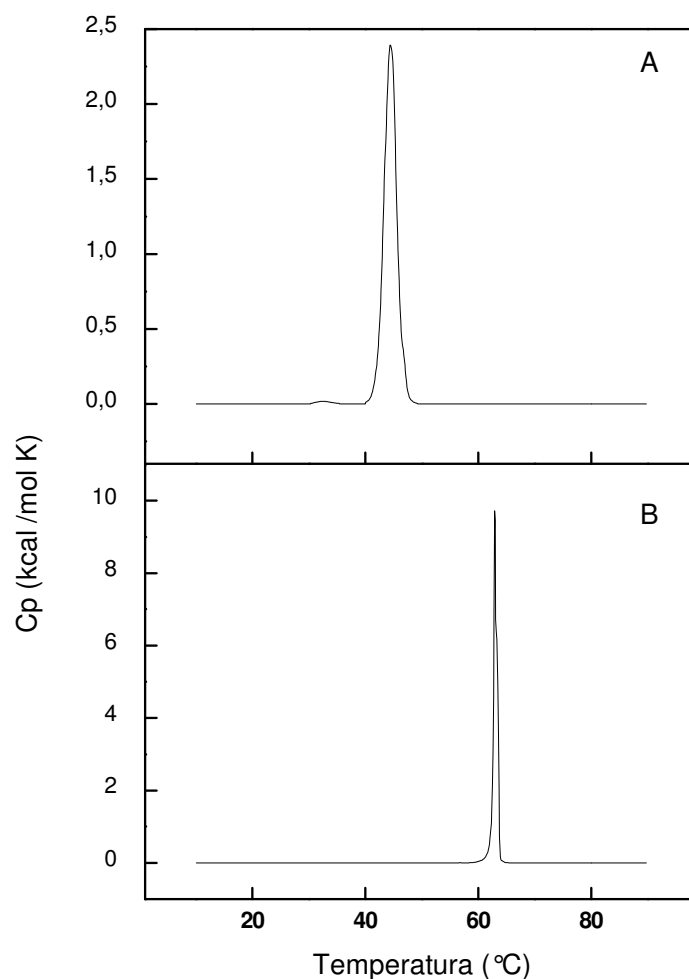
#### **4.2.2 Calorimetria Diferencial de Varredura**

Os fosfolipídios formam bicamadas em meio aquoso e são selecionados como um modelo muito próximo a membranas biológicas e utilizados para a investigação do comportamento termotrópico de tais sistemas. A calorimetria diferencial de varredura tem sido amplamente utilizada para o estudo desse comportamento, analisando a variação nos valores de entalpia, que correspondem a mudanças na capacidade calorífica ( $C_p$ ) dos fosfolipídios durante o processo de transição da fase gel para a líquido-cristalina.

Foram realizados alguns experimentos iniciais, a fim de comparar os resultados obtidos com outros descritos na literatura. Foram determinadas as temperaturas de transição entre a fase gel e a fase líquido-cristalina (fluido) de lipossomo constituído somente por DPPC, somente por DPPE e ainda dos sistemas binários de DPPC:DPPE em diferentes proporções.

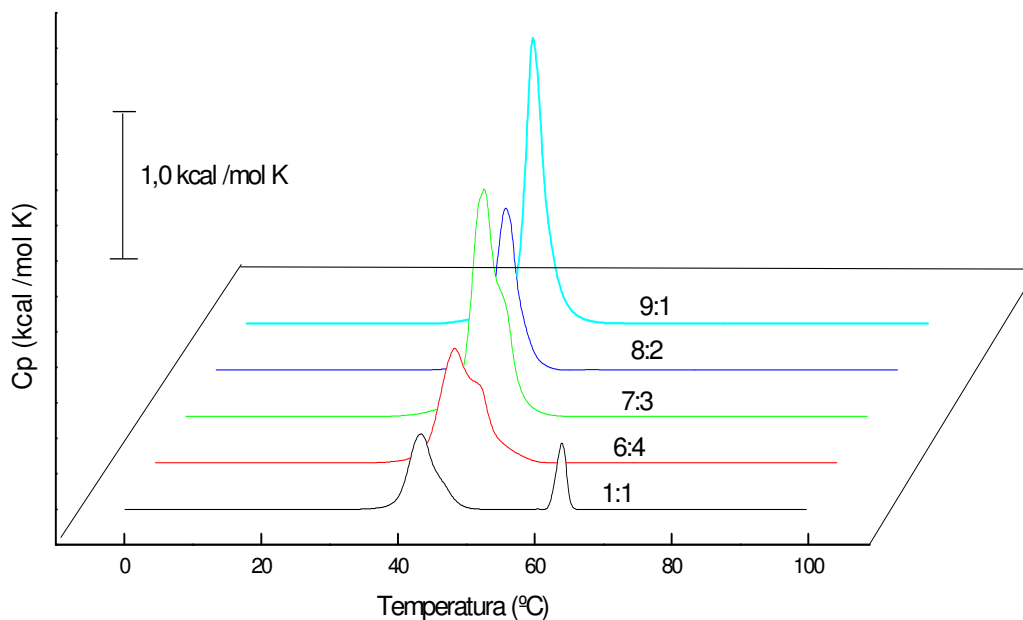
Conforme se pode observar a partir da Figura 10, a temperatura de transição para o lipossomo constituído de DPPC é  $41,1^\circ\text{C}$ , com uma pré-transição em torno de  $33^\circ\text{C}$ . Já para o DPPE, o valor foi  $63,6^\circ\text{C}$ . Ambos os resultados estão em concordância com os valores descritos na literatura (Tristam-Nagle e Nagle, 2004). Além disso, a variação de entalpia para o lipossomo de DPPC foi de  $8,83 \text{ Kcal mol}^{-1}$ , enquanto que para o DPPE foi de  $8,59 \text{ Kcal mol}^{-1}$ . Outro parâmetro que pode ser comparado é a largura na meia altura do pico ( $\Delta T_{1/2}$ ). Para o DPPE a largura é menor que para o DPPC, indicando que as moléculas de DPPE

exibem uma maior cooperatividade, consequência da presença de ligações de hidrogênio intermoleculares.



**Figura 10.** Termograma  $C_p$  (Kcal/mol K) em função da Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), após subtração da linha de base, do lipossomo formado por DPPC (A) e de uma suspensão constituída por DPPE (B), ambos na concentração de 10 mg/mL. As medidas foram realizadas conforme descrito no item 3.7 de Material e Métodos, utilizando um equipamento N-DSC II.

Na sequência, são apresentados os resultados de DSC para o lipossomo obtido por extrusão, constituído de DPPC:DPPE em diversas proporções (Figura 11), para assim verificar o efeito que cada um desses dois importantes fosfolipídios apresentam nos valores termodinâmicos bem como nas medidas de temperatura de transição de fase.



**Figura 11.** Termograma  $C_p$  (Kcal/mol K) em função da Temperatura ( $^{\circ}$ C), após subtração da linha de base, de lipossomos constituídos por DPPC:DPPE em diferentes proporções, obtido pela técnica de extrusão conforme descrito no item 3.6 de Material e Métodos. As medidas foram realizadas conforme descrito no item 3.7 de Material e Métodos, utilizando um equipamento N-DSC II.

Três fatores importantes podem ser notados a partir dos resultados obtidos. O primeiro é que os valores de capacidade calorífica ( $C_p$ ) diminuem conforme se tem um aumento na quantidade de dipalmitoilfosfatidiletanolamina. Além disso, os picos são simétricos somente para as proporções de DPPC:DPPE de 9:1 e 8:2, aparecendo um ombro do lado direito do pico nas demais proporções (7:3 e 6:4), indicando a separação de fase devido ao excesso de DPPE. Essa separação de fase fica clara na proporção 1:1, já que se obtiveram dois picos distintos, o primeiro em torno de 43°C, relativo a uma fase de DPPC com uma quantidade limite de DPPE e o segundo em 64°C correspondente ao excesso deste último lipídio em solução.

A partir dos resultados termodinâmicos apresentados na Tabela VI pôde-se observar que a temperatura de transição é deslocada para valores maiores conforme o aumento da quantidade de DPPE e que os valores de entalpia são maiores para as relações de DPPC:DPPE de 7:3 e 9:1 e portanto, não foi observado um aumento gradual nesse parâmetro. Por outro lado, a largura na meia-altura do pico aumentou gradualmente com o aumento da proporção de DPPE, indicando que ocorre uma diminuição da cooperatividade entre as moléculas com a adição deste fosfolipídio.



**Tabela VI.** Valores termodinâmicos obtidos a partir dos estudos calorimétricos para diferentes proporções dos lipossomos constituídos de DPPC e DPPE

<b>DPPC:DPPE</b>	<b>T<sub>c</sub></b>	<b>ΔH</b>	<b>ΔT<sub>1/2</sub></b>
<b>(mol/mol)</b>	<b>(°C)</b>	<b>(Kcal mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>(°C)</b>
1:1	43,4*	2,55	4,0
	64,0**	0,92	1,4
6:4	43,6*	4,34	3,7
	47,2**	2,50	3,7
7:3	43,4*	7,69	3,0
	48,4**	2,27	2,6
8:2	42,4	4,96	3,3
9:1	41,9	8,23	2,9

\* Valores referentes ao primeiro pico

\*\* Valores referentes ao segundo pico

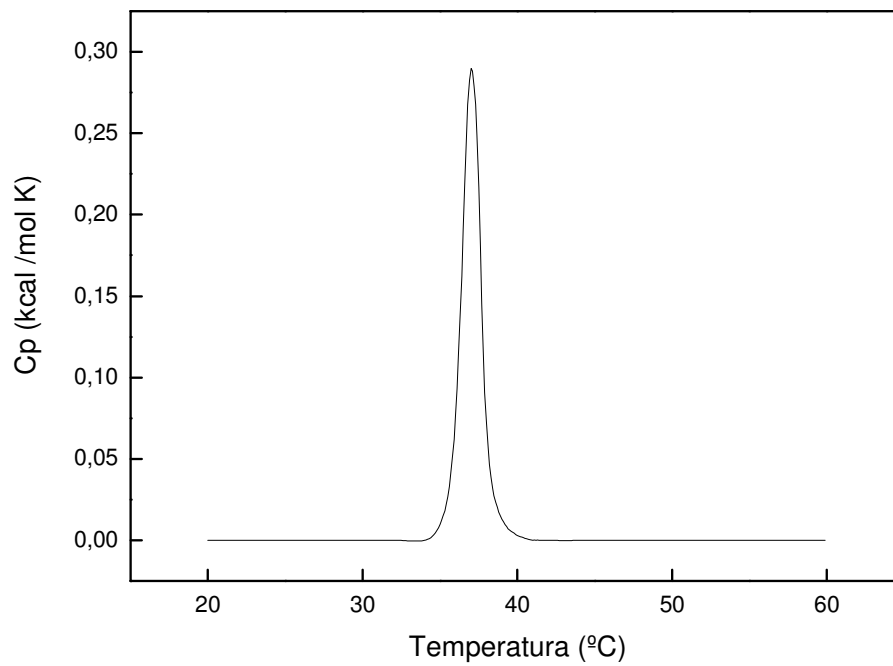
O colesterol é um componente lipídico essencial nas membranas plasmáticas de células de animais e é também encontrado em menores concentrações de certas membranas intracelulares em comunicação com a membrana plasmática. Embora tenha diferentes funções em células animais, um dos papéis primários dessa molécula é a modulação das propriedades físicas e organização lateral da bicamada lipídica da membrana plasmática, além de ser considerado essencial na formação dos “lipids rafts”. A alta solubilidade do colesterol na bicamada de fosfolipídios é atribuída a sua hidrofobicidade intrínseca e a interações específicas entre a parte polar do lipídio e o grupo hidroxila do colesterol (Loomis, C. R; 1979). Uma série de estudos de interação do colesterol com fosfolipídios da membrana têm sido realizados, utilizando uma variedade de técnicas físicas (Heerlotz e Tsamaloukas, 2006; Mannock et al., 2006).

No presente trabalho, o colesterol foi adicionado aos sistemas estudados, com o objetivo de verificar características a ele relacionadas, bem como posteriormente, relacionar as mesmas na presença da Na,K-ATPase em estudos calorimétricos.

Um dos maiores efeitos da incorporação do colesterol em sistemas lipídicos é uma eventual eliminação da transição de fase cooperativa gel a líquido-cristalino e sua substituição por uma fase com um grau de organização intermediário. Então, na fase líquido-cristalina, a qual deve existir a temperaturas fisiológicas na ausência de esterol em membranas biológicas, a presença do colesterol aumenta significativamente a orientação das cadeias hidrocarbônicas e diminui a

área ocupada pelas moléculas de fosfolipídios. Além disso, a presença do colesterol aumenta a espessura e a força mecânica e diminui a permeabilidade da bicamada fosfolipídica na fase líquido-cristalina (Mannock et al., 2006).

Para encontrar as possíveis transições de fase do colesterol, uma suspensão desse lipídio foi aplicada no DSC. Uma vez que se adicionou colesterol nos lipossomos contendo outros lipídios, esta análise é importante para verificar se o colesterol, por si só, é responsável por alguma transição dentro da faixa de temperatura estudada. Como se pode observar na Figura 12, um pico aparece em torno de 37°C apenas no primeiro ciclo de aquecimento. Essa temperatura deve estar relacionada a uma transição polimórfica cristalina do colesterol quando está em sua forma anidra (Loomis et al., 1979).



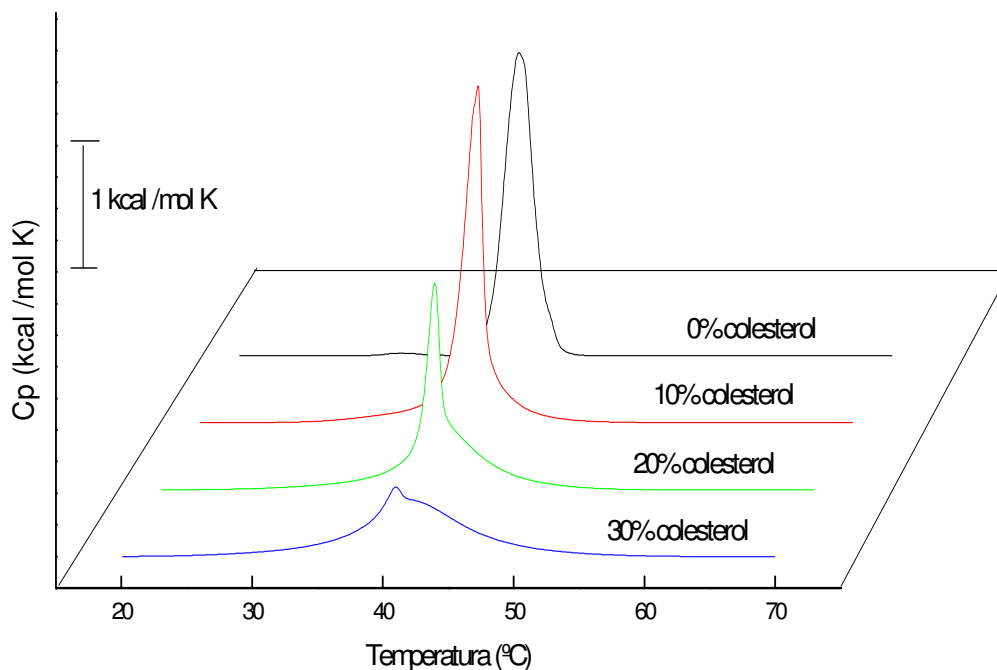
**Figura 12.** Termograma Cp (Kcal/mol K) em função da Temperatura (°C), do primeiro ciclo de aquecimento, após subtração da linha de base, de uma suspensão de colesterol 1,0 mg mL<sup>-1</sup>. As medidas foram realizadas conforme descrito no item 3.7 de Material e Métodos, utilizando um equipamento N-DSC II.

Com a finalidade de verificar o efeito da incorporação de colesterol nas bicamadas de DPPC e DPPE, investigou-se inicialmente como o colesterol afeta a transição de fase de cada um desses fosfolipídios separadamente.

Primeiramente, estudou-se o efeito do colesterol no comportamento termotrópico em bicamadas formadas somente por DPPC. Para isto, amostras contendo quantidades fixas de DPPC, modificando o conteúdo de colesterol de 0 a 30% em mol foram analisadas por DSC.

A existência da pré-transição é consequência da rotação dos grupos cabeça do fosfolipídio ou mudanças conformacionais na estrutura da bicamada lipídica, portanto qualquer composto que interaja com o grupo cabeça afetará a pré – transição (Biruss et al.; 2007). Observa-se na Figura 13 que a adição do colesterol ao sistema eliminou a pré-transição do DPPC em torno de 33°C. Conforme se acrescenta quantidades gradativas de colesterol o pico se torna mais largo, surgindo um ombro do lado direito. O aparecimento desse ombro deve estar provavelmente relacionado a uma separação de fase, quando a porcentagem de colesterol é alta, gerando diferentes domínios lipídicos: um rico e outro pobre em colesterol. A fase pobre em colesterol é atribuída ao pico estreito e a fase rica deve estar relacionada ao pico mais largo do lado direito (McMullen et al.; 1995). O alargamento ocorre devido a uma diminuição da cooperatividade do sistema quando o colesterol é inserido. Além disso, nota-se que a temperatura de transição é deslocada para valores mais baixos, assim como a variação

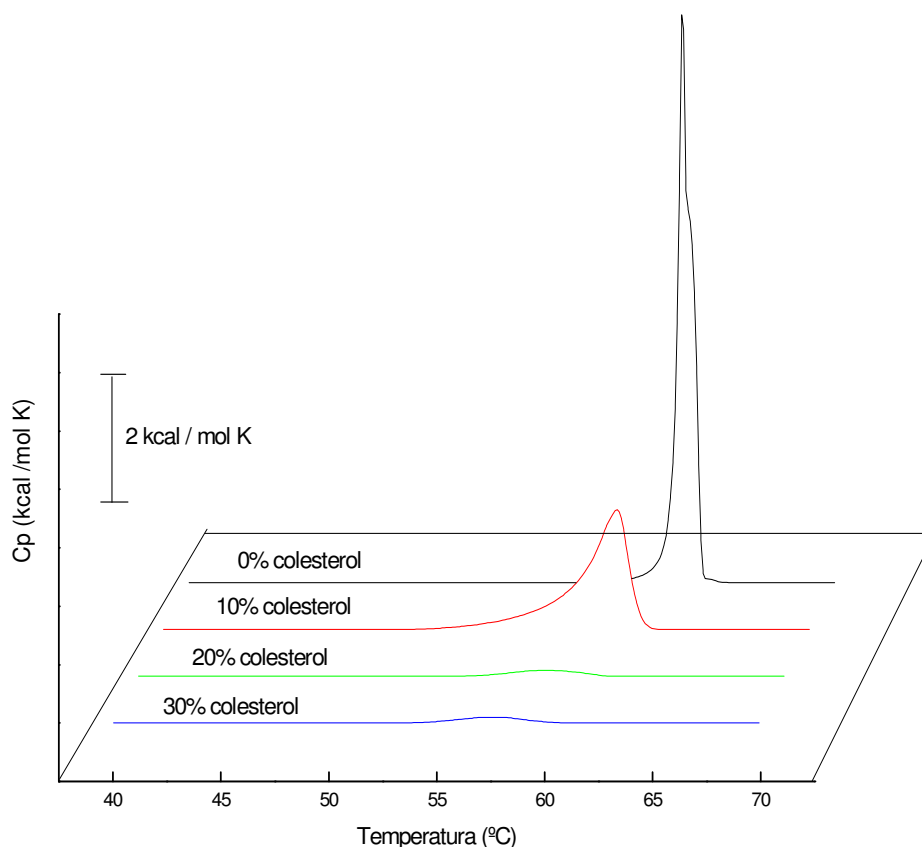
de entalpia é diminuída com o aumento do conteúdo de colesterol, indicando que há mudanças no empacotamento e uma desestabilização da bicamada.



**Figura 13.** Termograma Cp (Kcal/mol K) em função da Temperatura (°C), após subtração da linha de base, dos lipossomos formados por DPPC e colesterol com quantidade fixas de DPPC acrescentando 10, 20 e 30% de colesterol, obtidos pela técnica de extrusão conforme descrito no item 3.6 de Material e Métodos. As medidas foram realizadas conforme descrito no item 3.7 de Material e Métodos, utilizando um equipamento N-DSC II.

O mesmo foi feito utilizando o DPPE. Manteve-se a quantidade do fosfolípido fixa, modificando o conteúdo de colesterol de 0 a 30% em mol. Realizou-se então a análise do efeito da inserção de colesterol à suspensão de DPPE por DSC. Sabe-se que a alta temperatura de transição de fosfatidiletanolaminas, quando comparadas a fosfatidilcolinas é explicada pela formação de ligações de hidrogênio intermoleculares entre os prótons do grupo cabeça ( $\text{NH}_3^+$ ) e o oxigênio do grupo fosfato da vizinhança e essas interações também são responsáveis para os diferentes comportamentos térmicos de misturas PE - colesterol comparados aos de misturas PC - colesterol, já que a formação dessas ligações é certamente perturbada pelas moléculas de colesterol, alterando a transição do lipídio (Blume, 1980).

Analisando os resultados verificou-se que também ocorreu um alargamento dos picos, porém diferentemente do sistema DPPC:Colesterol, observou-se uma assimetria do pico do lado esquerdo. Além disso, quando a porcentagem de colesterol foi acima de 10% os picos foram abruptamente reduzidos (Figura 14). Comparando-se os valores das Tabelas VII e VIII, nota-se, portanto que a adição de colesterol provoca uma redução maior nos valores de  $\Delta H$  para sistemas de DPPE, quando comparados aos de DPPC.



**Figura 14.** Termograma  $C_p$  (Kcal/mol.K) em função da Temperatura ( $^{\circ}$ C), após subtração da linha de base, dos lipossomos formados por DPPE e colesterol com quantidade fixas de DPPE acrescentando 10, 20 e 30% de colesterol, obtidos pela técnica de extrusão conforme descrito no item 3.6 de Material e Métodos. As medidas foram realizadas conforme descrito no item 3.7 de Material e Métodos, utilizando um equipamento N-DSC II.



**Tabela VII.** Valores termodinâmicos obtidos a partir dos estudos calorimétricos para diferentes proporções dos lipossomos constituídos de DPPC e Colesterol

<b>% Colesterol (mol)</b>	<b>T<sub>c</sub> (°C)</b>	<b>ΔH (Kcal mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>ΔT<sub>1/2</sub> (°C)</b>
0	41,1	8,83	2,2
	33,0*	0,0462*	2,4
10	41,3	6,76	1,7
20	40,9	5,43	2,0
30**	41,0	3,10	4,9
	44,5	2,35	7,0

\* *Pré-transição*

\*\* *Deconvolução do pico*

**Tabela VIII.** Valores termodinâmicos obtidos a partir dos estudos calorimétricos para diferentes proporções dos lipossomos constituídos de DPPE e colesterol

<b>% Colesterol (mol)</b>	<b>T<sub>c</sub> (°C)</b>	<b>ΔH (Kcal mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>ΔT<sub>1/2</sub> (°C)</b>
0	62,9	8,58	0,73
10	61,0	5,42	2,0
20	59,0	0,412	3,0
30	57,7	0,369	3,0

Com a finalidade de estudar o efeito do colesterol, relacionando a atividade catalítica com o comportamento termotrópico, quando a Na,K-ATPase é inserida em lipossomos de DPPC:DPPE, foram feitos experimentos iniciais de calorimetria apenas dos lipossomos na ausência da enzima. Preparou-se então lipossomos de DPPC:DPPE, variando o conteúdo de colesterol de 10 a 40%.

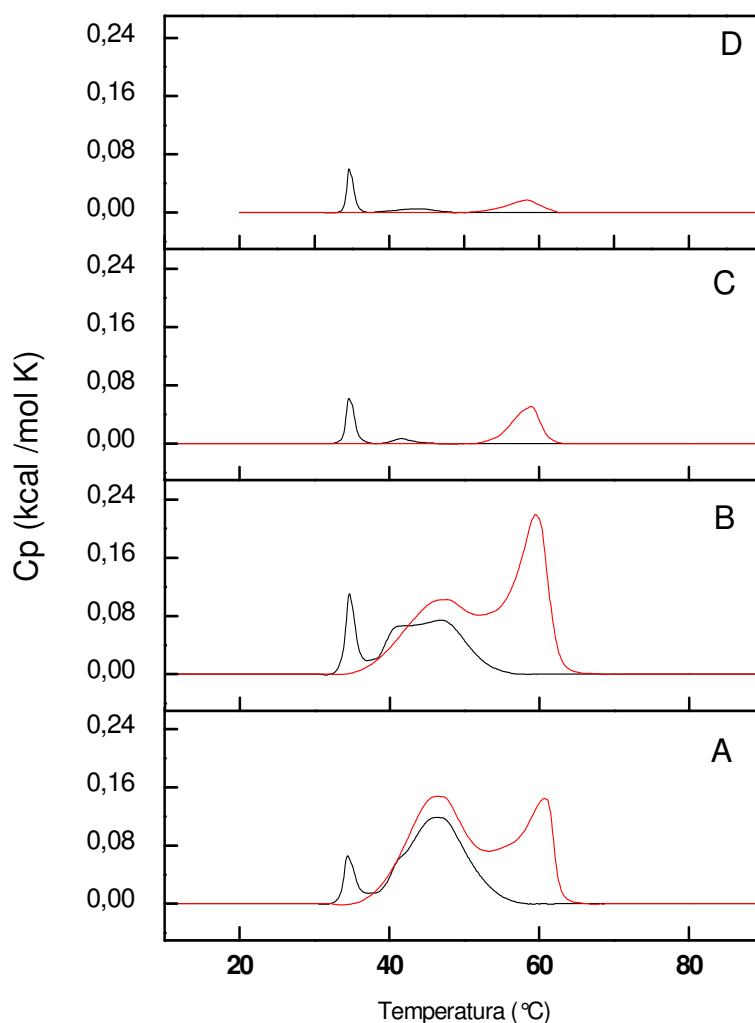
Nota-se pela Figura 15 que quando o colesterol foi adicionado ao sistema DPPC:DPPE, diferentes comportamentos foram observados no primeiro e segundo ciclo de aquecimento.

Quando 10% em mol de colesterol foram inseridos, uma nítida transição em torno de 35°C é observada no primeiro ciclo de aquecimento (Figura 15A). Descartamos a hipótese de esta estar relacionada à pré-transição dos fosfolipídios, já que foi visto que a inserção do colesterol aboliu esta transição, portanto deve estar relacionada à transição polimórfica do colesterol, que foi confirmada quando se realizou uma varredura de temperatura na amostra contendo somente colesterol, além disso, confirmou-se também que este pico de transição surge somente no primeiro ciclo de aquecimento. Ainda nesse ciclo, há um pico relativamente largo entre 40 e 55°C que deve estar relacionado a uma fase única contendo os fosfolipídios e colesterol. Entretanto, no segundo aquecimento, nota-se uma clara segregação de fases, um pico em torno de 40 e outro em 60°C, relacionados ao DPPC e ao DPPE respectivamente.

Quando se adicionou 20% em mol de colesterol, o mesmo perfil foi observado (Figura 15B), porém no segundo ciclo, o pico em 60°C foi

maior que o pico em 40°C, o que pode indicar uma preferência do colesterol pelo DPPC, já que a desestabilização provocada pelo colesterol foi mais pronunciada na sua transição.

Com o aumento do conteúdo de colesterol, agora com 30% (Figura 15C) percebe-se no primeiro ciclo de aquecimento que o pico entre 40 e 50°C foi reduzido, sugerindo que essa proporção de colesterol levou a uma grande desestabilização do sistema e que no segundo ciclo, a transição vista antes em torno de 40°C não é mais observada, mas sim apenas a transição em torno de 60°C aparece, assim como para uma quantidade de 40% em mol de colesterol (Figura 15D).

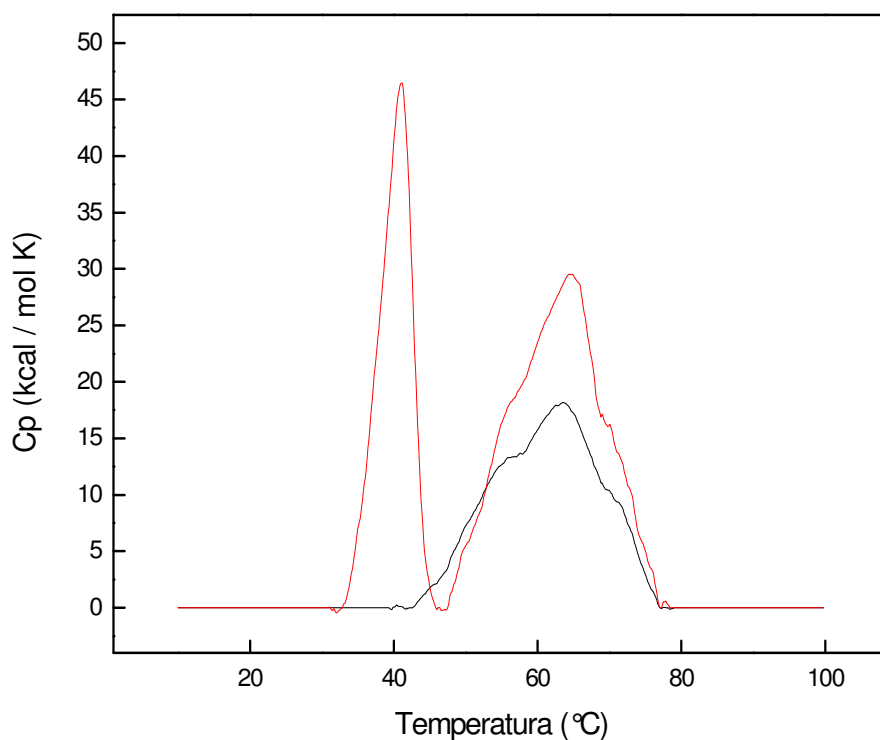


**Figura 15.** Termograma  $C_p$  (Kcal/mol K) em função da Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), após subtração da linha de base, dos lipossomos formados por DPPC, DPPE e colesterol com quantidade fixas de DPPC e DPPE (razão molar = 1) contendo 10% (A), 20% (B), 30% (C) e 40% (D) em mol de colesterol, obtidos pela técnica de extrusão conforme descrito no item 3.6 de Material e Métodos. As medidas foram realizadas conforme descrito no item 3.7 de Material e Métodos, utilizando um equipamento N-DSC II. Primeiro ciclo de aquecimento (—). Segundo ciclo de aquecimento (—).

Finalmente, com as medidas de DSC dos lipossomos realizadas, estudos iniciais com proteolipossomos constituídos de DPPC, DPPE, colesterol e Na,K-ATPase foram realizados, relacionando a atividade catalítica com os parâmetros termodinâmicos da bicamada.

Inicialmente foi preparado o proteolipossomo na ausência de colesterol. O termograma obtido para esse sistema, já bem caracterizado cineticamente e que apresenta a enzima na sua forma  $(\alpha\beta)_2$  inserida de forma “inside out” (Santos et al., 2006), mostra um pico entre 55 e 70°C relacionado à desnaturação térmica da enzima, como foi visto nos estudos de calorimetria da enzima solubilizada. Uma vez adicionado o colesterol em uma proporção de 1:1:0,5 em massa, foram observadas duas transições calorimétricas, com temperatura em torno de 40°C e a outra entre 55 e 70°C (Figura 16).

Estes resultados de calorimetria sugerem que quando o colesterol é adicionado, parte dos lipídios deve ser excluída do sistema contendo a proteína, já que se observa um pico em torno de 40°C que não aparece na ausência do colesterol.



**Figura 16.** Termograma  $C_p$  (Kcal/mol K) em função da Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), após subtração da linha de base, do proteolipossomo formado por DPPC e DPPE (em proporção 1:1 em massa) e Na,K-ATPase (em proporção 1:3 em massa) (—) e do proteolipossomo formado por DPPC, DPPE e colesterol (em proporção 1:1:0,5 em massa) e Na,K-ATPase (em proporção 1:6 em massa) (—) obtidos pela técnica de co-solubilização conforme descrito no item 3.3 de Material e Métodos. As medidas foram realizadas conforme descrito no item 3.7 de Material e Métodos, utilizando um equipamento N-DSC II.

Sabe-se então que o colesterol afeta a atividade de enzimas de membrana, incluindo a Na,K-ATPase. Alterações no conteúdo de colesterol em membranas biológicas alteram as propriedades da bicamada lipídica e influencia a função de uma variedade de enzimas associadas à membrana (Sotomayor et al. 2000).

A complexa composição lipídica da membrana plasmática e a formação de microdomínios lipídicos específicos tais como “rafts” são quase que certamente muito importantes na regulação da Na,K-ATPase, indicando que essa enzima pode estar associada com “caveolae/rafts”, mostrando uma importante função do colesterol na regulação da Na,K-ATPase (Cornelius, 2008).

Em um estudo do efeito do colesterol sobre a atividade da Na,K-ATPase, Yeagle et al.(1988) mostrou que a máxima atividade é observada em quantidade de colesterol presente na membrana nativa. Quando o conteúdo de colesterol está abaixo ou acima que é encontrada na membrana nativa, a atividade enzimática é diminuída.

Com a finalidade de compreender melhor o papel do colesterol, preparou-se amostras de proteolipossomos com quantidades definidas de lipídios (DPPC:DPPE 1:1) (mol:mol), alterando o conteúdo de colesterol de 0 a 40% em mol do total de lipídios.

Observando os resultados, comprova-se que o colesterol atua como um modulador da atividade catalítica da Na,K-ATPase. Pela Figura 17, conclui-se que a incorporação de proteína não alterou significativamente na ausência e na presença de diferentes quantidades de colesterol; no entanto, quando o colesterol foi inserido ao sistema,

houve um aumento na recuperação da atividade enzimática da Na,K-ATPase, ocorrendo um máximo quando a porcentagem de colesterol foi 20%.

Fazendo uma comparação entre os termogramas dos proteolipossomos (Figuras 18 A-D) e o da enzima solubilizada (Figura 18E), observa-se que a desnaturação térmica da enzima é alterada na presença dos lipídios e com a mudança da quantidade de colesterol. Percebe-se que até uma quantidade de colesterol igual a 30% em mol, há um pico entre 30 e 40°C, que pode ser atribuído a uma fase contendo lipídios, ou ainda ser relacionado com a primeira transição da enzima que teria sido deslocada para menores temperaturas na presença dos fosfolipídios e colesterol.

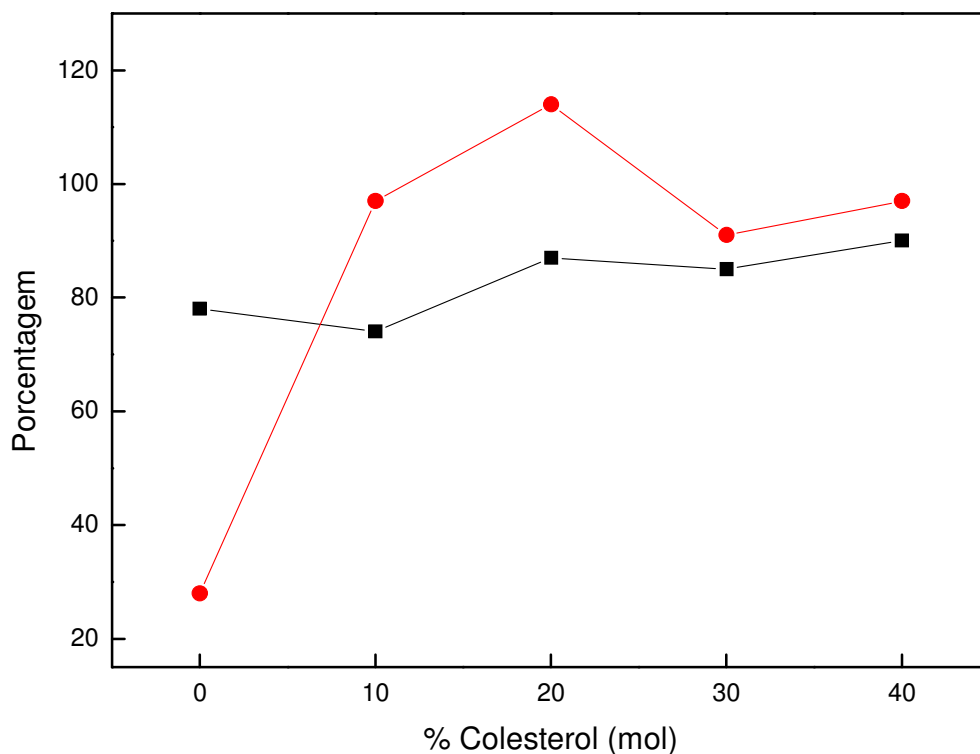
A Figura 18E representa o termograma da enzima solubilizada, que conforme foi discutido anteriormente apresenta uma transição complexa, sendo a soma de três transições entre 50 e 70°C. Para algumas amostras de proteolipossomos, somente observamos a segunda e terceira transições nas mesmas temperaturas que as transições da enzima solubilizada.

O primeiro pico, que para a enzima solubilizada aparece em torno de 55°C, para os proteolipossomos (10, 20 e 30% em mol de colesterol) nota-se uma transição em valores mais baixos de temperatura, entre 30 e 40°C. Conforme foi concluído anteriormente, esse pico poderia estar relacionado a uma fase contendo os lipídios, sugerindo que o colesterol provoca uma segregação de fases. No entanto, a análise dos termogramas dos proteolipossomos sugere que esta seja a primeira

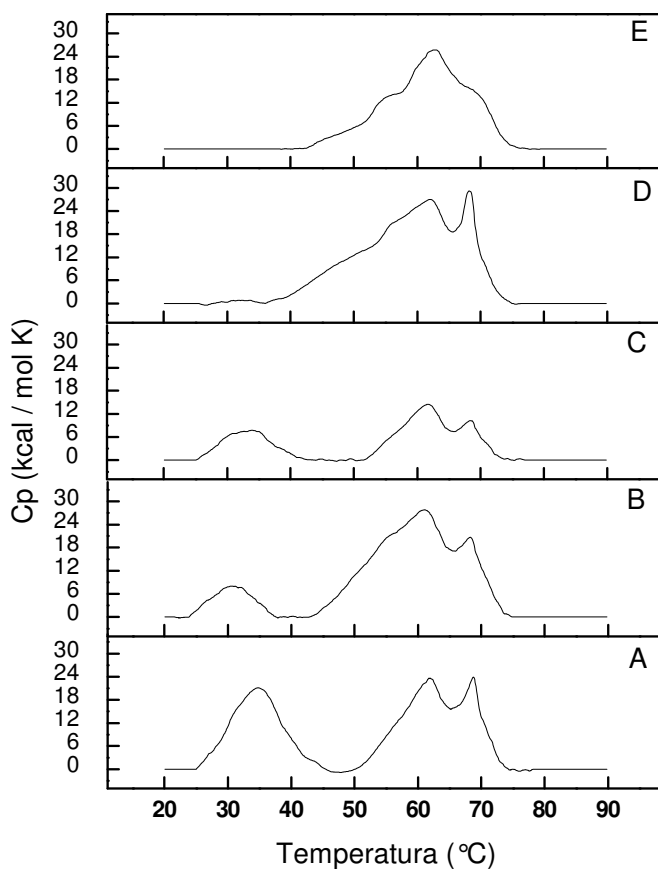


transição da desnaturação térmica que foi deslocada para valores mais baixos. Quando a porcentagem de colesterol é 10% em mol, observa-se a presença desse pico e a segunda e terceira transições da proteína. Aumentando o conteúdo de colesterol para 20%, o primeiro pico se torna menor e surge um pequeno ombro parecendo estar correlacionado à primeira transição. Quando 30% foram adicionados, o primeiro pico se torna ainda menor, assim como os da segunda e terceira transições. Com 40 %, o pico entre 30 e 40°C não é mais observado e o termograma se torna mais parecido com o da enzima solubilizada. Além disso, nota-se uma clara mudança no pico relacionado a terceira transição nas diferentes amostras.

Todas essas observações confirmam que a presença de diferentes quantidades de colesterol na bicamada influencia a estrutura da Na,K-ATPase e conseqüentemente altera a atividade enzimática.



**Figura 17.** Percentual de incorporação de proteína ( ■ ) e recuperação da atividade ( ● ) nos proteolipossomos formados por DPPC e DPPE em proporção 1:1(mol), Na,K-ATPase em proporção 1:6 (lipídio:proteína em massa) variando a percentagem em mol de colesterol de 10 a 40%. Os proteolipossomos foram preparados pela técnica de co-solubilização conforme descrito no item 3.3 de Material e Métodos. As medidas foram realizadas conforme descrito no item 3.7 de Material e Métodos, utilizando um equipamento N-DSC II.



**Figura 18.** Termograma  $C_p$  (Kcal/mol K) em função da Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), após subtração da linha de base, da enzima solubilizada (E) e dos proteolipossomos formados por DPPC e DPPE em proporção 1:1(mol), Na,K-ATPase em proporção 1:6 (lipídio:proteína em massa) variando a porcentagem em mol de colesterol: 10% (A), 20% (B), 30%(C) e 40%(D). Os proteolipossomos foram preparados pela técnica de co-solubilização conforme descrito no item 3.3 de Material e Métodos. As medidas foram realizadas conforme descrito no item 3.7 de Material e Métodos, utilizando um equipamento N-DSC II.

## 5. Conclusões

A técnica de espalhamento dinâmico de luz se mostrou eficiente no estudo de desnaturação térmica de proteínas como a Na,K-ATPase, indicando que a agregação térmica ocorre entre 50 e 70°C, sendo então uma ferramenta adequada para avaliar a estabilidade da proteína.

Confirmou-se por calorimetria diferencial de varredura que a desnaturação térmica da Na,K-ATPase ocorre entre 50 e 70°C e que esse processo é a soma de três transições e irreversível. Além disso, verificou-se que diferentes condições do meio refletem em alterações nos termogramas. Diferentes proporções de detergente e proteína resultam em termogramas variados, mostrando que essa relação influencia diretamente na estrutura da proteína, afetando a sua conformação e função.

Estudando os sistemas de lipossomos conclui-se que DPPC e DPPE não são totalmente miscíveis dependendo das proporções utilizadas na preparação das vesículas. Quando a razão entre eles é igual a um, não há a formação de vesículas, apenas são formadas quando a proporção de DPPE é menor ou com a adição de colesterol ao sistema.

Quando o colesterol foi adicionado ao sistema tanto de DPPC quanto de DPPE ocorreu uma desestabilização da bicamada e uma diminuição da cooperatividade. Verificou-se que a presença de 30 % em mol de colesterol provoca uma separação de fase.

Para o sistema ternário, um comportamento complexo é observado por DSC, já que diferentes perfis ocorrem no primeiro e segundo ciclo de aquecimento. Conclui-se então que para esse sistema de DPPC, DPPE e colesterol, há uma difícil interpretação dos resultados de calorimetria. Pode-se deduzir que inicialmente deve ocorrer a formação de uma fase contendo os três lipídios e que esta é desestabilizada com o aumento de colesterol. Entretanto, o aquecimento deve provocar uma separação de fases, formando domínios ricos em DPPC e colesterol e pobre em DPPE e outro contendo uma maior quantidade de DPPE, porém pobre em DPPC e colesterol.

Analisando os resultados das amostras de proteolipossomos, verificamos que a presença de colesterol pode induzir uma separação de fases, ou deslocar a primeira transição da desnaturação térmica da Na,K-ATPase para valores mais baixos de temperatura. Além disso, conclui-se que o colesterol atua como um modulador da atividade da Na,K-ATPase, alterando não somente as propriedades da membrana, mas também influenciando a conformação da proteína, confirmado pelos diferentes termogramas, nas variadas proporções de colesterol.

## 6. Referências Bibliográficas

- Albers, R.W. (1967) Biochemical aspects of active transport. *Ann. Biochem.* 36: 727-756.
- Antolovic, R.; Hamer, E.; Serpersu, E.H.; Kost, H.; Linnertz, H.; Kovarik, Z. and Schoner, W. (1999) Affinity labelling with MgATP analogues reveals coexisting Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> forms of the alpha-subunits of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Eur. J. Biochem.* 261:181-189.
- Aperia, A. (2007) New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med.* 261: 44-52.
- Askari, A. (1987) Na,K-ATPase: on the number of the ATP sites of the functional unit. *J. Bioenergetics Biomembranes* 19: 359-374.
- Askari, A. (2000) Na,K-ATPase and related ATPases Elsevier Science.
- Bagrov AY, Shapiro JI, Fedorova OV. (2009) Endogenous cardiotoxic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol Rev.* 61(1):9-38.
- Barwe, S.P.; Kim, S.; Rajasekaran, S.A.; Bowie, J.U.; Rajasekaran, A.K. (2007) Janus model of the Na,K-ATPase beta-subunit transmembrane domain: distinct faces mediate alpha/beta assembly and beta-beta homo-oligomerization. *J Mol Biol.* 365(3):706-14.
- Béguin, P.; Wang, X.; Firsov, D.; Puoti, A.; Claeys, D.; Horisberger, J.D. and Geering, K. (1997) The  $\gamma$  subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *EMBO J.* 16: 4250-4260.
- Biruss, B.; Dietl, R.; Valenta, C. (2007) The influence of selected steroid hormones on the physicochemical behaviour of DPPC liposomes. *Chem Phys Lipids.* 148(2):84-90.
- Blanco, G (2005) Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. *Semin. Nephrol.* 25: 292-303.
- Blume, A.(1980) Thermotropic Behavior of Phosphatidylethanolamine-Cholesterol and Phosphatidylethanolamine-Phosphatidylcholine-Cholesterol Mixtures. *Biochemistry* 19, 4908-4913.

- Boldyrev, A.A. (2001) Na/K-ATPase as an oligomeric ensemble. *Biochemistry* 66: 821-831.
- Burgos, I.; Dassie, S.A.; Fidelio, G.D. (2008) Thermodynamic model for the analysis of calorimetric data of oligomeric proteins. *J Phys Chem B*. 112(45):14325-33.
- Canfield, V.A. and Levenson, R. (1993) Transmembrane organization of the Na,K-ATPase determined by epitope addition. *Biochem.* 32: 13782-13786.
- Chen, J.Q., Contreras, R.G., Wang, R., Fernandez, S.V., Shoshani, L., Russo, I.H., Cerejido, M. and Russo J. (2006) Sodium/potassium ATPase (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase) and ouabain/related cardiac glycosides: A new paradigm for development of anti- breast cancer drugs? *Breast Cancer Res Treat.* 96(1):1-15.
- Chetverin, A.B.; Khechinashvili, N.N.; Filimonov, V.V. (1986) Cooperativity of the alpha beta-protomer structure in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase functioning. A scanning microcalorimetry study. *FEBS Lett.* 205(2):185-8.
- Cornelius, F. (2001) Modulation of Na,K-ATPase and Na-ATPase activity by phospholipids and cholesterol. I. Steady-state kinetics. *Biochemistry* 40: 8842-8851
- Cornelius, F. (2008) Cholesterol-dependent interaction of polyunsaturated phospholipids with Na,K-ATPase. *Biochemistry* 47(6):1652-1658.
- Costa, C.J.; Gatto, C. and Kaplan, J.H. (2003) Interactions between Na,K-ATPase alpha-subunit ATP-binding domains. *J Biol Chem.* 278: 9176-84.
- Cuevas, F.J.; Jameson, D.M.; Sotomayor, C.P. (2006) Modulation of reconstituted pig kidney Na/K-ATPase activity by cholesterol in endogenous lipid vesicles:role of lipid domains. *Biochemistry* 45: 13855-13868.
- Donnet, C.; Aristarkhova, E. and Sweadner, K.J. (2001) Thermal denaturation of the Na,K-ATPase provides evidence for alpha-alpha

- oligomeric interaction and gamma subunit association with the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 276: 7357-7365.
- Esmann, M. (1984) The distribution of C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> – Solubilized oligomers of the (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 787: 81-89.
- Fiedler, B. and Scheiner-Bobis, G. (1996) Transmembrane topology of alpha- and beta-subunits of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase derived from beta-galactosidase fusion proteins expressed in yeast. *J. Biol. Chem.* 271: 29312-29320.
- Fodor, E.; Fedosova, N.U.; Ferencz, C.; Marsh, D.; Pali, T.; Esmann, M. (2008) Stabilization of Na,K-ATPase by ionic interactions. *Biochim Biophys Acta.* 1778(4):835-43.
- Fontes, C.F.L.; Lopes, F.E.V; Scofano, H.M.; Barrabin, H. and Norby, J.G. (1999) Stimulation of ouabain binding to Na,K-ATPase in 40% dimethyl sulfoxide by a factor from Na,K-ATPase preparations. *Arch. Biochem. Biophys.* 366: 215-223.
- Forbush, B.; Kaplan, J.H. and Hoffman, J.F. (1978) Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na, K-ATPase. *Biochemistry* 17: 3667-3676.
- Garty, H. and Karlish, S.J. (2005) FXYD proteins: tissue-specific regulators of the Na,K-ATPase. *Semin. Nephrol.* 25: 304-11.
- Geering, K. (2000) Topogenic motifs in P-type ATPases. *J. Membr. Biol.* 174: 191-190.
- Geering, K. (2006) FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Semin. Nephrol.* 25: 304-311.
- Geering, K.; Beggah, A.; Good, P.; Girardet, S.; Roy, S.; Schaer, D. and Jaunin, P. (1996) Oligomerization and maturation of Na,K-ATPase: functional interaction of the cytoplasmic NH<sub>2</sub> terminus of the β subunit with the α subunit. *J. Cell. Biol.*, 133: 1193-1204.
- Geering, K. (2008) Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 17(5):526-32.
- Gennis, R.B. (1989) In “Biomembranes: molecular structure and function”. (Cantor, C.R. Editor) Springer-Yerlag.



- Gloor, S.; Antonicek, H.; Sweadner, K.J.; Pagliusi, S.; Frank, R; Moos, M. and Schachner, M. (1990) The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the  $\beta$  subunit of the Na,K-ATPase. *J. Cell Biol.* 110: 165-174.
- Glynn, I.M. (1985) The Na,K-transporting adenosine triphosphatase. In: A. N. Martonosi (Ed.), *The enzymes of biological membranes*. Vol 3, pp 35-114, Plenum Press, New York.
- Grinberg, A.V.; Gevondyan, N.M.; Grinberg, N.V. and Grinberg, V.Y. (2001) The thermal unfolding and domain structure of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - exchanging ATPase. A scanning calorimetry study. (2001) *Eur. J. Biochem.* 268: 5027-5036.
- Hartree, E.F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analyt. Biochem.* 48: 422-427.
- Hasler, U.; Crambert, G.; Horisberger, J.D. and Geering, K. (2001) Structural and functional features of the transmembrane domain of the Na,K-ATPase beta subunit revealed by tryptophan scanning. *J. Biol. Chem.* 276:16356-13364.
- Hasler, U.; Wang, X.Y.; Crambert, G.; Beguin, P.; Jaisser, F.; Horisberger, J.D. and Geering, K. (1998) Hole of the beta-subunit domains in the assembly, stable expression, intracellular routing, and functional properties of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 273: 30826-30835.
- Heerkoltz, H. and Tsamaloukas (2006) Gradual change or phase transition: characterizing fluid lipid-cholesterol membranes on the basis of thermal volume changes. *Biophys. J.* 91:600-607.
- Heinonen, S.K. and Lathi, R.J (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analyt. Biochem.* 113: 313-317.
- Hu, Y.K. and Kaplan, J.H. (2000) Site-directed chemical labeling of extracellular loops in a membrane protein. The topology of the Na,K-

- ATPase alpha-subunit. *J. Biol. Chem.* 275: 19185-19191.
- Ivanov, A.; Modyanov, N.N. and Askari, A. (2002) Role of the self-association of beta subunits in the oligomeric structure of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem. J.* 364: 293-299.
- Ivanov, A.; Zhao, H. and Modyanov, N.N. (2000) Packing of the transmembrane helices of Na,K-ATPase: direct contact between beta-subunit and H8 segment of alpha-subunit revealed by oxidative cross-linking. *Biochemistry* 39: 9778-9785.
- Jaisser, F.; Horisberger, J.D. and Rossier, B.C. (1992) The beta subunit modulates potassium activation of the Na-K pump. *Ann N Y Acad Sci.* 671:113-9.
- Jorgensen, P.L.; Hakansson, K.O. and Karlsh, S.J.D. (2003) Structure and Mechanism of Na, K-ATPase: Functional Sites and Their Interactions. *Annu. Rev. Physiol.* 65: 817-849.
- Jorgensen, P.L.; Nielsen, J.M.; Rasmussen, J.H. and Pedersen, P.A. (1998a) Structure-function relationships of E1-E2 transitions and cation binding in Na,K-pump protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1365: 65-70.
- Jorgensen, P.L.; Nielsen, J.M.; Rasmussen, J.H. and Pedersen, P. A. (1998b) Structure-function relationships based on ATP binding and cation occlusion at equilibrium in Na,K-ATPase. *Acta Physiol. Scand.* 163: 79-87.
- Kaplan, J.H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 511-535.
- Karlsh, S.J.D.; Goldshleger, R. and Jorgensen, P.L. (1993) Location of Asn 831 of the alpha chain of Na,K-ATPase at the cytoplasmic surface. Implication for topological models. *J. Biol. Chem.* 268: 3471-3478.
- Kühlbrandt, W. (2004) Biology, Structure and Mechanism of P-Type ATPases. *Nature reviews: Mol. Cell Biol.* 5: 282-295.
- Laughery, M.; Todd, M.; Kaplan, J.H. (2004) Oligomerization of the Na,K-ATPase in cell membranes. *J Biol Chem.* 279(35):36339-48.
- Lingrel, J.B. and Kuntzweiler, T. (1994) Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.*

- 269: 19659-19662.
- Loomis, C.R.; Shipley, G.G.; Small, D.M. (1979) The phase behavior of hydrated cholesterol. *J Lipid Res.* 20(4):525-35.
- Lopina, O.D. (2001) Interaction of Na,K-ATPase catalytic subunit with cellular proteins and other endogenous regulators. *Biochemistry (Mosc).* 66: 1122-31.
- Lutsenko, S. and Kaplan, J.H. (1993) An essential role for the extracellular domain of the Na,K-ATPase beta-subunit in cation occlusion. *Biochem.* 32: 6737-6743.
- Madan, P.; Rose, K.; Watson, A.J. (2007) Na/K-ATPase beta1 subunit expression is required for blastocyst formation and normal assembly of trophectoderm tight junction-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 282: 12127-12134
- Mahaney, J.E.; Girard, J.P. and Grisham, C.M. (1990) Saturation transfer EPR measurements of the rotational motion of a strongly immobilized ouabain spin label on renal Na,K-ATPase. *FEBS Lett.* 260: 160-164.
- Malik, N.; Canfield, V.A.; Beckers, M.C.; Gros, P. and Levenson, R. (1996) Identification of the mammalian Na,K-ATPase  $\beta$ 3 subunit. *J. Biol. Chem.* 271: 22754-22758.
- Mannock, D.A.; Lewis, R.A.H.; McElhaney, R.N. (2006) Comparative calorimetric and spectroscopic studies of the effects of lanosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. *Biophys. J.* 91:3327-3340.
- Markossian, K.A.; Yudin, I. K.; Kurganov, B. I. (2009) Mechanism of Suppression of Protein Aggregation by  $\alpha$ -Crystallin. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 1314-1345.
- Martin, D.W. (2005) Structure-function relationships in the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-pump. *Semin. Nephrol.* 25: 282-91.
- Martin, D.W.; Marecek, J.; Scarlata, S. and Sachs, J.R. (2000)  $\alpha\beta$  protomers of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase from microsomes of duck salt gland are mostly monomeric: Formation of higher oligomers does not modify

- molecular activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 97: 3195-3200.
- Martin-Vasallo, P.; Dackowski, W.; Emanuel, J.R. and Levenson, R. (1989) Identification of a putative isoforma of the Na,K-ATPase beta subunit. Primary structure and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* 264: 4613-4618.
- McMullen, T.P.; Vilchère, C.; McElhaney, R.N.; Bittman, R. (1995) Differential scanning calorimetric study of the effect of sterol side chain length and structure on dipalmitoylphosphatidylcholine thermotropic phase behavior. *Biophys J.* 69(1):169-76.
- Mimura, K.; Matsui, H.; Takagi, T. and Hayashi, Y. (1993) Change in oligomeric structure of solubilized Na,K-ATPase induced by octaethylene glycol dodecyl ether, phosphatidylserine and ATP. *Biochim. Biophys. Acta* 1145: 63-74.
- Minetti, C.A., Remeta, D.P. (2006) Energetics of membrane protein folding and stability. *Arch Biochem Biophys.* 453(1):32-53.
- Morth, J. P.; Pedersen, B.P.; Toustrup-Jensen, M.S; Sørensen, T.L.M.; Petersen J.,; Andersen, J.P.; Vilsen B.; Nissen, P.(2007) Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 450: 1043-1050.
- Noguchi, S.; Mishina, M.; Kawamura, M. and Numa, S. (1987) Expression of functional (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase from cloned cDNAs. *FEBS Lett.* 225: 27-32.
- Ogawa, H.; Shinoda, T.; Cornelius, F.; Toyoshima, C. (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc Natl Acad Sci.* 106(33):13742-7.
- Panayiotidis, M.I.; Bortner, C.D. and Cidlowski, J.A. (2006) On the mechanism of ionic regulation of apoptosis: would the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase please stand up? *Acta Physiol (Oxf).* 187(1-2):205-15.
- Pantusa, M.; Sportelli, L.; Bartucci, R. (2008) Spectroscopy and calorimetric studies on the interaction of human serum albumin with DPPC/PEG:2000-DPPE membranes. *Eur Biophys J* 37:961:973.

- Pedersen, P.A.; Rasmussen, J.H. and Jorgensen, P.L. (1996) Consequences of mutations to the phosphorylation site of the alpha-subunit of Na,K-ATPase for ATP binding and E1-E2 conformational equilibrium. *Biochemistry* 35: 16085-16093.
- Pestov, N.B.; Adams, G.; Shakhparonov, M.I. and Modyanov, N.N. (1999) Identification of a novel gene of the X,K-ATPase beta-subunit family that is predominantly expressed in skeletal and heart muscles. *FEBS Lett.* 456: 243-248.
- Pilotelle-Bunner, A.; Matthews, J.M.; Cornelius, F.; Apell, H.J.; Sebban, P. and Clarke, R.J. (2008) ATP binding equilibria of the Na(+),K(+)-ATPase. *Biochemistry.* 47(49):13103-14.
- Post, R.L; Kume, S.; Tobim, T.; Orcutt, B. and Sem, A.K. (1969) Flexibility of an active center in sodium-plus-potassium adenosine triphosphatase. *J. Gen. Physiol.* 54: 306-326.
- Pressley, T.A. (1996) Structure and function of the Na,K pump: ten years of molecular biology. *Miner. Electrolyte Metab.* 22: 264-271.
- Privé, G.G. (2007) Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods.* 41(4):388-97.
- Rajasekaran, S.A.; Barwe, S.P. and Rajasekaran, A.K. (2005) Multiple functions of Na,K-ATPase in epithelial cells. *Semin. Nephrol.* 25: 328-34.
- Rigaud, J.L. (2002) Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals. *Braz J Med Biol Res.*35(7):753-66.
- Rigos, C.F; Santos, H.L.; Ward, R.J. and Ciancaglini, P. (2006) Lipid bilayer stabilization of the Na,K-ATPase reconstituted in DPPC:DPPE-liposomes. *Cell Biochem. and Biophys.* 44: 438-445.
- Rigos, C.F; Nobre, T.M; Zaniquelli, M.E.D; Ward, R.J; Ciancaglini, P. (2008) The association of Na,K-ATPase subunits by circular dichroism, surface tension and dilatational elasticity. *J. Colloid Interface Sci.* 325: 478-484.
- Rigos, C.F.; Santos, H.L.; Yoneda, J.S.; Montich. G.; Maggio. B.;

- Ciancaglioni, P. (2010) Cytoplasmatic domain of Na,K-ATPase alpha-subunit is responsible for the aggregation of the enzyme in proteoliposomes. *Biophys Chem.* 146(1):36-41.
- Santos, H.L. and Ciancaglioni, P. (2003) Kinetic characterization of the Na,K-ATPase from the rabbit outer renal medulla: properties of the  $(\alpha\beta)_2$  dimer. *Comp. Biochem. Physiol. Part b.* 135: 539-549.
- Santos, H.L., Lamas, R.P., Ciancaglioni, P. (2002) Solubilization of Na,K-ATPase from rabbit kidney outer medulla using only C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35: 277-288.
- Santos, H.L., Rigos, C.F. and Ciancaglioni, P. (2006) Kinetics behaviors of Na,K-ATPase: comparison of solubilized and DPPC:DPPE-liposome reconstituted enzyme. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 142(3-4): 309-16.
- Santos, H.L.; Lopes, M.L.; Maggio, B. and Ciancaglioni, P. (2005) Na,K-ATPase reconstituted in liposomes: effects of lipid composition on hydrolytic activity and enzyme orientation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 41: 239-248.
- Shinoda, T.; Ogawa, H.; Cornelius, F.; Toyoshima, C. (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature.* 459(7245):446-50.
- Shull, G.E.; Lane, L.K. and Lingrel, J.B. (1986) Amino-acid sequence of the beta-subunit of the (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>) ATPase deduced from a cDNA. *Nature.* 321:429-431.
- Skou, J.C. and Esmann, M. (1992) The (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. *J. Bioenergetics Biomembranes* 24: 249-261.
- Sotomayor, C. P.; Aguilar, L.F.; Cuevas, F.J.; Helms, M.K.; Jameson, D.M. (2000) Modulation of pig kidney Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity by cholesterol: role of hydration. *Biochemistry* 39(35):10928-35.
- Stolz, M.; Lewitzki, E.; Schick, E.; Mutz, M.; Grell, E. (2003) Calorimetry of Na,K-ATPase. *Ann N Y Acad Sci.* 986:245-6.
- Takeda, K. and Kawamura, M. (2001) The functional unit of Na,K-ATPase is a monomeric alphabeta protomer. *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun. 280: 1364-1366.
- Taniguchi, K.; Kaya, S.; Abe, K. and Mardh, S. (2001) The oligomeric nature of Na/K-transport ATPase. *J. Biochem.* 129(3): 335-342.
- Therien, A.G. and Blostein, R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol.* 279: C541-C566.
- Therien, A.G. and Blostein, R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol.* 279: C541-C566.
- Thoenges, D. and Schonert, W. (1997) 2'-O-Dansyl analogs of ATP bind with high affinity to the low affinity ATP site of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and reveal the interaction of two ATP sites during catalysis. *J. Biol. Chem.* 272: 16315-16321.
- Tristram-Nagle, S.; Nagle, J.F. (2004) Lipid bilayers: thermodynamics, structure, fluctuations and interactions. *Chemistry and Physics of Lipids* 127:3-14.
- Xie, Z. and Cai, T. (2003) Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol Interv.* 3(3):157-68.
- Ward, D. G. and Cavieris, J. D. (1993) Solubilized  $\alpha\beta$  Na,K-ATPase remains protomeric during turnover yet shows apparent negative cooperativity toward ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 5332-5336.
- Ward, D.G. and Cavieris, J.D. (1996) Binding of 2'(3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl)ADP to soluble alpha beta protomers of Na,K-ATPase modified with fluorescein isothiocyanate. Evidence for two distinct sites. *J. Biol. Chem.* 271: 12317-12321.
- Woo, A.L.; James, P.F. and Lingrel, J.B. (2000) Sperm motility is dependent on unique isoform of the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 275: 20693-20699.
- Yeagle, P.L.; Young, J.; Rice, D. (1988) Effects of cholesterol on (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase ATP hydrolyzing activity in bovine kidney. *Biochemistry* 27(17):6449-52.
- Yeagle, P.L. (1993) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance in membrane fusion studies. *Methods Enzymol.* 220: 68-79.

Zhang, L.; Zhang, Z.; Guo, H.; Wang, Y. (2008) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-mediated signal transduction and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase regulation. *Fundam Clin Pharmacol* 22(6):615-21.



# 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](#)