

Vanádio (V) como sonda de estudo na contracção muscular

Teresa Paula Martins Tiago



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia



Faro, 2005



Vanádio (V) como sonda de estudo na contracção muscular

Teresa Paula Martins Tiago

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências e Tecnologia da Universidade do
Algarve para obtenção do grau de Doutor
em Bioquímica, na especialidade de
Bioquímica Inorgânica.*

Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia



Faro, 2005

33957.

19 10 05 63350
TIA * Van

1

Aos meus pais,

**Obrigada por sempre acreditarem
mesmo quando, por momentos, deixei de acreditar.**

*Caminante, no hay camino,
Se hace camino al andar.
Al andar se hace camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se há de volver a pisar.*

António Machado (1857-1939)

Agradecimentos

Esta caminhada não teria sido possível sem a contribuição de muitos, a quem eu devo palavras sinceras de agradecimento.

Ao meu orientador, Professor Doutor Manuel Aureliano Alves, queria deixar o meu profundo agradecimento, pela forma incansável com que sempre me acompanhou e motivou desde que comecei a dar os primeiros passos nesta vida de investigação e pela maneira tão singular como me incutiu o pensamento científico. Desde então, o meu curso científico, profissional e pessoal está intimamente associado a esta colaboração. Obrigada por tudo o que me tem proporcionado e especialmente pela sua amizade!

Ao Professor Doutor José Galhardas de Moura, meu co-orientador, pelos recursos disponibilizados no Departamento de Química da Universidade Nova de Lisboa, pela contribuição para o desenvolvimento deste trabalho e sobretudo pelo apoio e confiança demonstrados ao longo destes anos.

Ao Professor Doutor Carlos Gutiérrez-Merino, com quem tive a felicidade de me cruzar nesta jornada, um agradecimento muito especial por me ter acolhido tão calorosamente no seu laboratório, pela sua paciência e generosidade na transmissão dos seus sábios conhecimentos, e pelos momentos únicos passados em terras de “nuestros hermanos”. O seu talento e postura perante a ciência foram determinantes para o sucesso deste trabalho e um incentivo para o futuro. Obrigada por me ter mostrado este e outros caminhos!

Ao Rui Duarte, pela contribuição na obtenção dos espectros de RPE no Departamento de Química da Universidade Nova de Lisboa, por todo o apoio e disponibilidade dispensados ao longo destes anos e particularmente pela sua amizade.

Ao Professor Doutor Paulo Martel, da FCT da Universidade do Algarve, pela preciosa e indispensável contribuição nos estudos teóricos de modulação molecular que muito enriqueceram este trabalho, pelas discussões proveitosas sobre estes mesmos estudos, pela sua simpatia e disponibilidade.

À Professora Doutora Conceição Mateus, da FCT da Universidade do Algarve, pela disponibilização do foto-reactor imprescindível aos estudos de fotoclivagem.

À Dra. Maria do Rosário Caras Altas, pela excelente assistência técnica na utilização do aparelho de RMN instalado no Departamento de Química da Universidade Nova de Lisboa.

Ao grupo de trabalho da Universidade de Extremadura, Alejandro, Miguel Ángel, Fran, Javier, Ascém, Yolanda, por todo o apoio que me prestaram no sentido da minha integração em Badajoz, pelo companheirismo, pelas “farras” e em especial pela amizade. Sem vocês a minha estadia em Espanha não teria sido certamente tão agradável!

Não podia deixar de agradecer a todos aqueles que partilharam as suas experiências e amizade no dia a dia de trabalho. Ao Professor Jorge Martins, pela contagiante força anímica com que nos presenteia todos os dias no laboratório 3.31, e pelas sugestões proveitosas sobre este e aquele assunto. Aos meus amigos Ana Pereira, Adriana, Guida, Ricardo Gândara, pelos bons momentos passados, pelo companheirismo, ajuda e compreensão, enfim, pela amizade. A todos os meus colegas de laboratório, passados e presentes, e a todos os elementos do Departamento de Química e Bioquímica cujo convívio me enriqueceu todos os dias. Um obrigado muito especial!

Ao meu irmão, Daniel, pelas deliciosas discussões científicas que me aguçam o espírito crítico e estimulam o meu gosto pela ciência.

Ao Pedro, pelo seu Amor incondicional.

A todos, sinceros agradecimentos.

Apresentação

A presente dissertação é resultado do trabalho de investigação realizado entre 2000 e 2004, no Departamento de Química e Bioquímica da Universidade do Algarve e no Departamento de Química da Universidade Nova de Lisboa sob a supervisão dos Professores Manuel Aureliano Alves e José João Galhardas de Moura. Os estudos decorreram ainda no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e Genética da Universidade de Extremadura, sob a supervisão do Professor Carlos Gutiérrez-Merino. Foi obtido financiamento pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, nomeadamente através da bolsa de doutoramento SFRH/BD/2924/2000 e do projecto POCTI/QUI/38191.

O tema central desta dissertação concerne a utilização de vanadato como sonda cinética e espectroscópica no estudo do mecanismo de transdução de energia pelo complexo actina-miosina, no processo da contracção muscular. Nesse sentido, apresentam-se estudos onde, por um lado, se avalia a contribuição das espécies oligoméricas de vanadato, em particular da espécie decamérica (V_{10}), na inibição da actividade ATPásica da miosina, de músculo esquelético de coelho, estimulada por actina e, por outro, se relaciona a interacção de V_{10} com miosina sob a influência de ligandos naturais, com os efeitos inibitórios nos parâmetros cinéticos da enzima.

Esta dissertação encontra-se dividida em oito capítulos. O Capítulo I, consiste de uma secção introdutória onde se procura fornecer os conceitos necessários para que o leitor se localize no contexto dos estudos efectuados na área, nos últimos anos. Seguidamente, afigurou-se importante examinar individualmente as propriedades biofísicas quer da enzima, onde se caracteriza o sistema contráctil miosina-actina (Capítulo II), quer dos oligómeros onde se estabelece claramente a sua verdadeira composição e estabilidade nas soluções de vanadato (Capítulo III). Neste último capítulo, é ainda esclarecido, por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{51}V , quais as espécies que interactivam com a miosina. Os Capítulos IV a VII foram divididos em termos das

diferentes metodologias aplicadas no estudo da interacção de decavanadato com miosina. Assim, no Capítulo IV, é analisada a implicação de V_{10} na função da enzima, determinando-se uma constante de inibição para esta espécie molecular bem como o seu mecanismo de inibição. O Capítulo V, reserva-se a estudos fluorimétricos e de dispersão de luz onde se: (i) estabelece uma estequiometria de ligação e constantes de equilíbrio de dissociação entre a miosina e V_{10} ; (ii) analisa a influência de diferentes moduladores da ATPase de miosina na ligação de V_{10} à enzima; e (iii) avalia a modulação do complexo actina-miosina por V_{10} . No Capítulo VI, recorre-se a estudos de fotoclivagem para demonstrar os resíduos de miosina clivados devido à presença de decavanadato. Adicionalmente, através da espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (RPE), examinam-se as consequências da irradiação na estabilidade e estado de oxidação do V_{10} , sendo proposto a ocorrência de um complexo entre a espécie resultante (vanadilo) e a proteína. No Capítulo VII, algumas respostas para os dados experimentais previamente adquiridos, são obtidas através de um estudo teórico por modelação molecular do “docking” de V_{10} na estrutura tri-dimensional do subfragmento-1 de miosina, para diferentes estados conformacionais do ciclo de hidrólise de ATP. Neste mesmo capítulo, com base nos resultados experimentais e de modelação molecular, propõe-se um modelo de acção do decavanadato no mecanismo de transdução de energia pelo complexo actina-miosina. As conclusões gerais e questões em aberto para serem esclarecidas em estudos futuros, apresentam-se no Capítulo VIII.

Lista de Publicações

Parte dos estudos descritos na presente dissertação foram publicados nas seguintes revistas internacionais:

1. **Tiago, T.**, Aureliano, M., and Gutiérrez-Merino, C. (2002) “Quenching of Myosin Intrinsic Fluorescence Unravels the Existence of a High Affinity Binding site for Decavanadate.” *J. Fluorescence* **12**: 87-90.
2. **Tiago, T.**, Aureliano, M., Duarte, R. O., and Moura, J. J. G. (2002) “Vanadate Oligomers Interaction with Phosphorylated Myosin.” *Inorg. Chim. Acta* **339C**: 317-321.
3. **Tiago, T.**, Aureliano, M. and Gutiérrez-Merino, C. (2004) “Decavanadate Binding to a High Affinity Site near the Myosin Catalytic Centre Inhibits F-Actin-Stimulated Myosin ATPase Activity.” *Biochemistry* **43**: 5551-5561.
4. **Tiago, T.**, Aureliano, M. and Moura, J. J. G. (2004) “Decavanadate as a Biochemical Tool in the Elucidation of Muscle Contraction Regulation.” *J. Inorg. Biochem.* **98**: 1902-1910.

Resumo

O interesse no estudo da interacção de oxoaniões de vanádio com os sistemas biológicos tem aumentado gradualmente desde que foi demonstrado exercer diversos efeitos fisiológicos, actuando como análogo do fosfato na forma monomérica (H_2VO_4^-) ou através de espécies oligoméricas de vanadato. Nos músculos, onde foi redescoberto para a biologia, várias enzimas são inibidas por este oxoanião, nomeadamente a miosina, uma proteína altamente especializada que, juntamente com a actina, tem a capacidade de converter a energia química proveniente da hidrólise de ATP em trabalho mecânico. O efeito inibitório do vanadato sobre a miosina depende da formação, na ausência de actina, de um complexo estável com MgADP. Contudo, foi descrito que na presença de actina, a inibição é completamente revertida uma vez que a velocidade de libertação do vanadato aumenta por um factor de 10^5 quando comparada com a de miosina·ADP·Vi. O Vi é usualmente atribuído à forma monomérica de vanadato, que tem sido largamente usado como sonda em estudos cinéticos e estruturais da miosina.

No presente trabalho demonstra-se que, para além da espécie monomérica, outras espécies oligoméricas de vanadato podem interactuar com a miosina na ausência de nucleótido e afectar fortemente a actividade ATPásica. Experiências de ^{51}V -RMN demonstraram uma ligação preferencial dos oligómeros de vanadato maiores ao subfragmento-1 de miosina (S1) e uma competição entre decavanadato ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$) e tetravanadato ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$) para os mesmos sítios de ligação. Adicionalmente, a interacção destes oligómeros com S1 é modulada pelos ligandos naturais da enzima, i.e., é afectada na presença de ATP e favorecida com F-actina.

A actividade ATPásica do complexo actomiosina é inibida ($K_i = 0,27 \pm 0,05$ μM) por decavanadato (V_{10}) mas não pela forma monomérica de vanadato. A ligação de carácter electrostático desta espécie polianiónica de forma elipsoidal (V_{10}) a um local de alta afinidade no subfragmento-1 de miosina produz uma inibição não-competitiva

relativamente a ATP e a F-actina, sem dissociar o complexo acto-S1, substanciado por pequenas alterações na dispersão de luz do complexo acto-S1 para concentrações de V_{10} que produzem mais de 80% de inibição da actividade ATPásica de S1 estimulada por actina. Por outro lado, uma alteração conformacional local no S1 aquando da ligação de V_{10} é verificada por: (i) supressão da fluorescência intrínseca de miosina por titulação com decavanadato, acompanhada de uma diminuição paralela da acessibilidade de triptofanos ao supressor de fluorescência colisional, KI; (ii) diminuição da eficiência de transferência de fluorescência entre a F-actina e S1 marcados com eosina e fluoresceína, respectivamente; (iii) uma re-associação mais lenta entre o S1 e a F-actina após hidrólise de ATP.

Visando monitorizar os possíveis locais de ligação na miosina para a espécie V_{10} , foram conduzidos estudos fluorimétricos com S1 marcado com duas sondas fluorescentes (IAEDANS e IAF) na Cys-707 (SH1) e na Cys-697 (SH2), dois resíduos localizados numa posição chave de transmissão de sinal entre os sítios de ligação da actina e do nucleótido. Os resultados de titulação com decavanadato demonstraram: (i) a presença de apenas um sítio de ligação de V_{10} por monómero, com uma constante de dissociação, na ausência de nucleótidos, na ordem dos sub-micromolar ($K_d = 0,16 - 0,27 \mu M$); (ii) que o local de interacção do V_{10} é próximo da Cys-697, tal como se mostra pela larga supressão de fluorescência de S1-AEDANS produzida por V_{10} ; (iii) que a afinidade de S1 para V_{10} é modulada pelas alterações conformacionais que ocorrem durante o ciclo catalítico, indicado pelo aumento, de 2 a 3 vezes, da constante de dissociação verificada na presença de ADP·Vi ou de ADP·AlF₄, que induzem a conformação do estado intermediário meta-estável gerado durante o ciclo contráctil; e (iv) que a ligação de V_{10} é competitiva com AP₅A, um análogo do nucleótido modificado no fosfato- γ .

O fosfato- γ do ATP encontra-se adjacente à Ser-180, um resíduo que se demonstrou, no presente estudo, ser foto-modificado por V_{10} após irradiação UV. A Ser-180 situa-se no “P-loop” que forma o “Pi-tube”, um domínio que coordena os fosfatos do ATP e é homólogo ao sítio de ligação de polifosfatos (motivo “Walker A”) de diversas enzimas que ligam nucleótidos (ABC ATPases). Os estudos de fotoclivagem, sugerem ainda um local de ligação adicional, mas de menor afinidade, no “loop-2” (resíduos 627 a 646), que forma parte da interface com a actina.

Com base num estudo teórico por modelação molecular no qual foi simulado o “docking” de V_{10} em estruturas cristalográficas de S1 representando diferentes estados conformacionais do ciclo contráctil, é proposto um modelo estrutural para a interacção de miosina com V_{10} na abertura traseira do “Pi-tube”, a designada “back-door”, localizada no ápice de uma larga fenda que separa o fragmento proteolítico de 50 kDa nos sub-domínios superior e inferior.

Colectivamente, os resultados indicam que a interacção de decavanadato via “back-door” deverá estar a bloquear o estado intermediário que antecede o passo de hidrólise. Sugere-se que a formação de um intermediário miosina-MgATP- V_{10} previne a alteração conformacional inicial que induz o fecho do “Pi-tube” e consequentemente o ataque nucleofílico de uma molécula de água ao fosfato- γ do ATP, essencial ao processo de hidrólise, interrompendo desta forma a continuidade do ciclo contráctil.

Apesar de ser muito improvável a existência de V_{10} em concentrações significativas sob condições fisiológicas, esta espécie revelou-se uma excepcional sonda bioquímica para o conhecimento mais aprofundado da modulação das interacções miosina-actina durante o processo de contracção muscular, bem como para a análise de ligação de polioxianióes a proteínas contendo o motivo “Walker A” ou de outras proteínas contendo sítios de ligação de nucleótidos.

Abstract

Interest in the interaction of vanadium oxoanions with biological systems has increased gradually since it was demonstrated to have a variety of physiological effects, acting either as a phosphate analogue in the monomeric form (H_2VO_4^-) or through oligomeric vanadate species. In muscles, where it was rediscovered for biological studies, several enzymes are inhibited by this oxoanion, namely myosin, a highly specialized protein which along with actin is able to convert the chemical energy of ATP hydrolysis into mechanical work. The inhibitory effect of vanadate towards myosin depends on the formation, in the absence of actin, of a long-lived complex with MgADP. However, in the presence of actin the inhibition has been described to be completely reverted as the rate of vanadate release increases by 10^5 compared to that of myosin.ADP.V_i alone. V_i is usually attributed to monomeric vanadate, which has been widely used as a tool in myosin kinetic and structural studies.

In the present work it is shown that besides monomeric vanadate, other oligomeric vanadate species may interact with myosin in the absence of nucleotide and affect quite potently the ATPase activity. ^{51}V -NMR line broadening experiments demonstrated a preferential binding of higher vanadate oligomers to myosin subfragment-1 (S1) and a competition between decavanadate ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$) and tetravanadate ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$) for the same binding sites. In addition, the interaction of these oligomers with S1 is modulated by the enzyme natural ligands, i.e., is affected in the presence of the nucleotide and favored in the presence of F-actin.

The ATPase activity of the actomyosin complex is inhibited ($K_i = 0.27 \pm 0.05 \mu\text{M}$) by decavanadate but not by the monomeric form of vanadate. The electrostatic binding of this ellipsoidal polyanionic species (V_{10}) to a specific high-affinity site in the myosin head group, produces non-competitive inhibition with respect to ATP and F-actin, without causing dissociation of the acto-S1 complex which is supported by very small changes on

the light scattering of the acto-S1 complex at V_{10} concentrations that produced more than 80% inhibition of the actin-stimulated S1-ATPase activity. On the other hand, a local conformation change in S1 upon binding to V_{10} is shown by: (i) quenching of the intrinsic fluorescence of myosin upon decavanadate titration accompanied by a parallel decrease of the accessibility of myosin tryptophans to the water-soluble collisional quencher KI; (ii) decrease of the efficiency of fluorescence energy transfer between eosin-labeled F-actin and fluorescein-labeled S1; (iii) slower re-association between S1 and F-actin upon ATP hydrolysis.

In order to monitor the putative binding sites in myosin for V_{10} , fluorimetric studies were performed on S1 labelled with two fluorescent dyes (IAEDANS and IAF) at Cys-707 (SH1) and Cys-697 (SH2), two residues located at a key position in the path of intersite signal transmission between actin- and nucleotide- myosin binding sites. The results of fluorescence titration with decavanadate demonstrated the following: (i) the presence of only one V_{10} binding site per monomer, with a dissociation constant in the submicromolar range ($K_d = 0.16 - 0.27 \mu\text{M}$) in the absence of nucleotides; (ii) that V_{10} binding site is close to Cys-697 as indicated by the large quenching of AEDANS-labeled S1 fluorescence produced by V_{10} ; (iii) that the affinity of myosin for V_{10} is modulated by the conformational changes that takes place during the catalytic cycle, as indicated by the 2-3 fold increase of the dissociation constant produced in the presence of ADP·Vi and ADP·AlF₄, which induce the conformation of the intermediate metastable state, generated during the contractile cycle; and (iv) that the binding of V_{10} is competitive with the γ -phosphate modified nucleotide analogue, AP₅A.

The γ -phosphate of ATP lies adjacent to Ser-180, a residue that it is shown in the present study to be photo-modified by V_{10} upon UV-irradiation. Ser-180 is located on the P-loop sequence which forms the Pi-tube, a domain that coordinates the phosphates of ATP and is homologous to the polyphosphate binding sites (Walker A motif) of a number

of nucleotide binding enzymes (ABC ATPases). Photocleavage studies have suggested yet an additional putative binding site, but of lower affinity, from residues 627-646 (loop-2), which is part of the actin binding interface.

By performing a theoretical study in which V_{10} was docked into myosin X-ray crystal structures representing different conformational states of the contractile cycle, it is proposed a structural model for the V_{10} -myosin interaction at the rear opening of the Pi-tube, the proposed “back-door”, located at the apex of a large cleft that splits the 50 kDa tryptic fragment into upper and lower subdomains.

Altogether, the results point out that the interaction of decavanadate via “back-door” is blocking the intermediate state preceding the hydrolysis step. The formation of an intermediate myosin·MgATP· V_{10} is suggested to avoid the initial conformational change that induces the closure of the “Pi-tube” and subsequently the nucleophilic attack of a water molecule to the ATP γ -phosphate, essential for the hydrolysis step, and therefore blocking the continuity of the contractile cycle.

Although V_{10} is not likely to be present at significant concentrations under physiological conditions, it has revealed to be a powerful biochemical tool to gain a deeper knowledge of the modulation of myosin-actin interactions during the process of muscle contraction as well as to probe polyoxoanion binding to proteins containing the Walker A motif or other proteins containing nucleotide binding sites.

Abreviaturas e Símbolos

ADP	adenosina 5'-difosfato
AMPc	adenosina 5'-monofosfato cíclico
AP5A	P ¹ P ⁵ – diadenosina pentafofato
ATP	adenosina 5'-trifosfato
ATPase	adenosina 5'-trifosfatase
Cys	cisteína
3D	tridimensional
Da	dalton
DTT	dítioitreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
Eosina	eosina-5-iodoacetamida
F	intensidade da fluorescência
F-actina	forma polimerizada da actina
FDNB	2,4-dinitro-1-fluorobenzeno
TER	transferência de energia por ressonância
g	aceleração da gravidade
GSH	glutaciona reduzida
Hepes	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano sulfonico
HMM	meromiosina pesada
Hz	ciclos por segundo (hertz)
IAEDANS	N-iodoacetil-N'-(5-sulfo-1-naftil) etilenodiamino
IAF	5-(iodoacetamida) fluoresceína
IC ₅₀	concentração inibitória, 50%
Imax	valor máximo de inibição
IU	quantidade de enzima que liberta 1 µmol de produto por minuto
Kd	constante de dissociação
Ki	constante de inibição
Km	constante de Michaelis Menten
LDH	lactato desidrogenase
LC1	cadeia leve essencial da miosina (22,5 kDa)
LC2	cadeia leve regulatória da miosina (18,5 kDa)
LC3	cadeia leve essencial da miosina (15,5 kDa)
M	miosina

MDR	“Multi Drug Resistant”
Mes	ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
Mant-AMPPNP	2’-(ou-3’)-O-(N-metilantranoil)- β : γ -imidoadenosina 5’ trifosfato
NAD ⁺	nicotinamida adenina nucleótido (forma oxidada)
NADH	nicotinamida adenina nucleótido (forma reduzida)
NADP	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reduzida)
nm	nanometros
<i>P</i>	polarização da fluorescência
PDB	“Protein Data Bank”
PEP	fosfoenol piruvato
Pi	ortofosfato (sem especificar o grau de protonação)
PPi	pirofosfato
PK	piruvato cinase
ppm	partes por milhão
<i>r</i>	anisotropia da fluorescência
RMN	ressonância magnética nuclear
RPE	ressonância paramagnética nuclear
S1	subfragmento-1 de miosina
S1Dc	subfragmento-1 de miosina de <i>Dictyostelium discoideum</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
Ser	serina
SH1	grupo tiol mais reactivo na miosina (Cys-707)
SH2	segundo grupo tiol mais reactivo na miosina (Cys-697)
TER	transferência de energia por ressonância
TNBS	ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
Trp	triptofano
u.a.	unidades arbitrárias
UV	gama ultravioleta do espectro electromagnético
V_0	velocidade inicial
V_i	ortovanadato (sem especificar o grau de protonação)
Vis	gama visível do espectro electromagnético
V_{max}	velocidade máxima

Índice

Capítulo I 1 INTRODUÇÃO GERAL

I – Introdução.....	1
I.1 – Contração muscular: conceitos sobre as proteínas contrácteis.....	3
I.1.1 – Os filamentos finos.....	3
I.1.2 – Os filamentos grossos	4
I.1.3 – A estrutura cristalográfica do subfragmento-1 de miosina.....	5
I.1.4 – Modelo de ligação da miosina à actina	7
I.1.5 – Mecanismo genérico da contração muscular	8
I.2 – Vanádio (V): um elemento com significado biológico	11
I.2.1 – Distribuição e biodisponibilidade do vanádio	12
I.2.2 – Propriedades químicas do vanádio	13
I.2.3 – Acumulação de vanádio e compostos biogénicos contendo vanádio.....	16
I.2.4 – Efeitos fisiológicos e toxicológicos promovidos por vanádio	17
I.2.5 – Aplicações farmacológicas de vanádio	18
I.2.6 – Bioquímica e metabolismo de vanádio	19
I.2.7 – Efeito de vanádio na actividade de enzimas	21
I.3 – Vanádio (V) como sonda cinética e espectroscópica no estudo da ATPase da miosina: perspectiva actual	23
I.4 – Referências Bibliográficas	26

Capítulo II 35 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MIOSINA E ACTINA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE COELHO

II.1 – Introdução	35
II.1.1 – Preparação de miosina e seus fragmentos	35
II.1.2 – Análise enzimática de miosina e seus subfragmentos	37
II.1.3 – Preparação de actina	38
II.2 – Materiais e Métodos	39

II.2.1 – Isolamento e purificação de miosina	39
II.2.2 – Preparação do subfragmento-1 de miosina	40
II.2.3 – Isolamento de actina	40
II.2.3.1 – Obtenção de “pó de acetona”	41
II.2.3.2 – Obtenção de F-actina	41
II.2.4 – Análise qualitativa e estado de pureza do material isolado	42
II.2.5 – Análise da actividade enzimática	43
II.2.5.1 – Ca^{2+} - e K^+ /EDTA – ATPase	44
II.2.5.2 – Mg^{2+} - ATPase	44
II.3 – Resultados e Discussão	46
II.3.1 – Análise qualitativa e estado de pureza do material isolado	46
II.3.2 – Análise da actividade enzimática	48
II.4 – Referências Bibliográficas	52

Capítulo III **55**

INTERACÇÃO DE OLIGÓMEROS DE VANADATO COM MIOSINA: ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE ^{51}V -RMN

III.1 – Introdução	55
III.1.1 – Oxovanadatos em soluções aquosas	56
III.1.2 – Interação de vanadatos com ligandos biogénicos	57
III.1.3 - Utilização de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/visível (UV/VIS) na caracterização de soluções de vanadato	59
III.1.4 - Utilização de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) na caracterização das soluções de vanadato	60
III.1.5 – Estudos por RMN de ^{51}V da interação de vanadatos com miosina	65
III.1.6 – Objectivos	66
III.2 – Materiais e Métodos	67
III.2.1 – Preparação de soluções de vanadato	67
III.2.2 - Caracterização de soluções de vanadato por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/visível (UV-vis)	67
III.2.3 – Obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{51}V	68

III.3 – Resultados e Discussão	69
III.3.1 - Análise da composição das soluções de vanadato por espectroscopia de ^{51}V -RMN: efeito da concentração	69
III.3.2 – Estabilidade das soluções de decavanadato: análise por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/visível	72
III.3.3 – Estudo por ^{51}V -RMN da ligação de decavanadato ao subfragmento-1 de miosina: efeito da força iónica	75
III.3.4 - Estudo por ^{51}V -RMN da ligação de decavanadato ao subfragmento-1 de miosina na presença de ligandos naturais da enzima	77
III.3.5 - Estudo por ^{51}V -RMN da competição entre as diferentes formas de vanadato para a ligação ao subfragmento-1 de miosina	80
III.4 – Conclusões	86
III.5 – Referências Bibliográficas	88

Capítulo IV **93**

INIBIÇÃO DA ACTIVIDADE ATPásica DE MIOSINA POR DECAVANADATO

IV.1 – Introdução	93
IV.1.1 - O inibidor ortovanadato	93
IV.1.2 - Os inibidores di- e tetravanadato	94
IV.1.3 - O inibidor decavanadato	95
IV.1.4 – Oligómeros de vanadato e a ATPase de miosina	98
IV.1.5 – Objectivos	99
IV.2 – Materiais e Métodos	100
IV.2.1 – Estudos Cinéticos	100
IV.2.2 – Tratamento de resultados	100
IV.3 – Resultados e Discussão	102
IV.3.1 – Inibição por decavanadato da actividade ATPásica da miosina estimulada por actina	102
IV.3.2 – Efeito da actina na inibição da actividade ATPásica de S1 por decavanadato	104
IV.3.3 – Dependência do valor de IC ₅₀ com a concentração de S1	106

IV.3.4 - Efeito de ATP na inibição da actividade ATPásica de S1 por decavanadato	106
IV.4 – Conclusões	109
IV.5 – Referências Bibliográficas	110

Capítulo V _____ **115**

INTERACÇÃO DE DECAVANADATO COM MIOSINA: ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E DE DISPERSÃO DE LUZ

V.1 – Introdução	115
V.1.1 – Espectroscopia de fluorescência: considerações gerais	116
V.1.2 – Fluorescência intrínseca	118
V.1.3 – Fluorescência extrínseca	119
V.1.4 – Supressão (“quenching”) da fluorescência	120
V.1.5 – Polarização da fluorescência ou anisotropia de fluorescência	121
V.1.6 – Transferência de energia por ressonância (TER)	123
V.1.7 – Dispersão de luz (Light-Scattering): considerações gerais	125
V.1.8 – Objectivos	127
V.2 – Materiais e Métodos	128
V.2.1 – Reagentes	128
V.2.2 – Modificação covalente do subfragmento-1 de miosina	128
V.2.3 – Tripsinização do subfragmento-1	130
V.2.4 – Modificação covalente de F-actina	130
V.2.4 – Preparação dos complexos estáveis S1·ADP·VO ₄ ³⁻ e S1·ADP·AlF ₄ ⁻	130
V.2.5 – Medições da fluorescência intrínseca	131
V.2.6 – Medições da fluorescência extrínseca	132
V.2.7 – Análise da transferência de energia por ressonância (TER)	134
V.2.8 – Medições de dispersão de luz	134
V.3 – Resultados e Discussão	135
V.3.1 – Supressão da fluorescência intrínseca de miosina por decavanadato	135
V.3.2 – Efeito de decavanadato na acessibilidade dos triptofanos da miosina	136
V.3.3 – Efeito de decavanadato na fluorescência extrínseca de S1 modificado nos resíduos SH1 e SH2	138

V.3.4 – Efeito do V_{10} na ligação de ATP ao subfragmento-1 de miosina	146
V.3.5 – Efeito de diferentes moduladores da ATPase da miosina na interacção de V_{10} com o S1	147
V.3.6 – Modulação do complexo actomiosina por decavanadato	151
V.4 – Conclusões	156
V.5 – Referências Bibliográficas	158

Capítulo VI _____ **163**

INTERACÇÃO DE DECAVANADATO COM MIOSINA: ESTUDOS DE FOTOCLIVAGEM

VI.1 – Introdução	163
VI.1.1 – Fotoclivagem da miosina promovida por vanadato: importância funcional dos locais de clivagem	164
VI.1.2 – Mecanismo de clivagem foto-oxidativa da miosina promovida por vanadato	165
VI.1.3 – Aplicação da espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (RPE) ao estudo do ião vanadilo (VO^{2+}) e seus complexos	167
VI.1.4 – Objectivos	170
VI.2 – Materiais e Métodos	171
VI.2.1 – Estudos de fotoclivagem	171
VI.2.2 – Estudos de ressonância paramagnética nuclear (RPE)	171
VI.3 – Resultados e Discussão	172
VI.3.1 – Padrão electroforético de S1 fotoclivado na presença de decavanadato ..	172
VI.3.2 – Decavanadato versus metavanadato na fotoclivagem de S1	174
VI.3.3 – Decomposição de decavanadato após irradiação: análise por espectroscopia de UV/VIS	176
VI.3.4 – Formação de vanadilo (VO^{2+}) por redução de vanadato após irradiação: análise por espectroscopia de RPE	177
VI.4 – Conclusões	184
VI.5 – Referências Bibliográficas	185

Capítulo VII 189

ESTUDOS DE MODELAÇÃO MOLECULAR DA INTERACÇÃO DE DECAVANADATO COM MIOSINA

VII.1 – Introdução	189
VII.1.1 – Previsão da estrutura da proteína	190
VII.1.2 – Análise da estrutura proteica	191
VII.1.3 – “Docking” de ligandos a proteínas	192
VII.1.4 – Objectivos	194
VII.2 – Materiais e Métodos	195
VII.2.1 – Obtenção das estruturas 3D de miosina e de decavanadato	195
VII.2.2 – Estudos de modelação molecular da interacção de decavanadato com miosina	195
VII.3 – Resultados e Discussão	197
VII.3.1 – Obtenção das estruturas 3D de miosina para o “docking” de decavanadato	197
VII.3.2 – “Docking” molecular de decavanadato no modelo de miosina de músculo esquelético de coelho	201
VII.3.3 – “Docking” molecular de decavanadato no subfragmento-1 de miosina de <i>Dyctiostelium discoideum</i>	205
VII.3.4 – Modelo estrutural para a interacção de decavanadato com miosina na “back door”: estudos experimentais <i>versus</i> estudos teóricos	210
VII.3.5 – Importância da “back door” no mecanismo de transdução de energia pelo complexo actomiosina	211
VII.3.6 – Modo de acção do decavanadato via “back door” no mecanismo de transdução de energia pelo complexo actomiosina	214
VII.4 – Referências Bibliográficas	217

Capítulo VII 221

CONCLUSÃO GERAL

VIII.1 – Passados quase trinta anos após a descoberta de vanadato no músculo.....	221
---	-----

VIII.2 – Ligação de decavanadato na “back door” da miosina inibe a actividade ATPásica do complexo actomiosina	222
VIII.3 – Contribuição do decavanadato para a elucidação da regulação da contracção muscular	223
VIII.4 – Perspectivas futuras	225
VIII.5 – Referências Bibliográficas	227

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

I – Introdução

A capacidade de transformar energia química em movimento é uma propriedade comum à maioria dos sistemas vivos. As células musculares são altamente especializadas neste tipo de transdução de energia, embora também ocorra em muitos outros processos celulares. O movimento dos cílios, o fluxo citoplasmático ou a divisão celular são alguns exemplos da capacidade das células transformarem energia química em trabalho mecânico. Desta forma, conhecer as bases moleculares para este tipo de transdução de energia torna-se crucial para a compreensão dos mecanismos e regulação de muitos processos celulares.

A maioria da informação disponível sobre o mecanismo de processos envolvendo mobilidade baseia-se em estudos estruturais, fisiológicos e bioquímicos do mecanismo de contração muscular, cuja base molecular é a hidrólise de ATP acoplada a interações cíclicas entre a miosina e a actina que foi proposta pela primeira vez em 1971 por Lynn e Taylor. As alterações conformacionais que ocorrem durante as transições entre os estados intermediários do ciclo de hidrólise de ATP são a força motora da contração. Assim, a descrição da conformação da miosina nos diferentes estados intermediários é essencial para a compreensão do mecanismo de transdução de energia. A análise destes estados intermediários tem sido conseguida através da substituição do fosfato (Pi) por análogos estruturais que abrandam a hidrólise de ATP catalisada pela miosina através da formação de um complexo estável com miosina e ADP no local activo [Goodno, 1979; Maruta *et al.*, 1993; Phan e Reisler, 1992; Werber *et al.*, 1992].

CAPÍTULO I

O oxoanião vanadato (VO_4^{3-}) demonstra não só semelhanças físicas e químicas com o fosfato (PO_4^{3-}) como, adicionalmente, pode ser facilmente derivatizado em solução aquosa com uma variedade de ligandos e tende a adoptar uma geometria pentacoordenada bipiramidal trigonal em redor do átomo central de vanádio. Estas características permitem ao vanadato actuar como análogo da conformação do grupo fosfato no estado de transição, como acontece na miosina. Esta analogia estrutural com o fosfato para além de dar ao metal de transição uma aplicabilidade como sonda cinética e espectroscópica no estudo de enzimas que catalizam a transferência de grupos fosforilo, confere-lhe grande parte da actividade biológica que actualmente se lhe atribui.

Foi a descoberta de que o músculo continha vanádio, na forma de vanadato, que despontou o interesse sobre a função deste elemento na biologia [Josephson e Cantley, 1977]. Desde então, começaram a delinear-se aplicações biológicas e farmacológicas consistentes, entre as quais a produção de novos compostos antidiabéticos e de agentes anticancerígenos baseados neste elemento. A acção fisiológica do vanadato não se restringe, contudo, à espécie monomérica de vanadato, podendo dever-se também a espécies condensadas presentes na gama de pH fisiológico para concentrações de vanadato mais elevadas (μM - mM). Existem mesmo evidências de que espécies oligoméricas diferentes possam ter alvos e tipos de modulação enzimática diferentes [Crans, 1994b; Stankiewicz *et al.*, 1995], nomeadamente na ATPase da miosina [Aureliano, 2000]. Nesse sentido, esclarecer os vários mecanismos pelos quais as diferentes espécies oligoméricas de vanadato podem actuar torna-se importante não só para a elucidação de alguns aspectos moleculares dos processos enzimáticos, particularmente no mecanismo de transdução de energia promovido pela miosina, mas também para o aumento do conhecimento da bioquímica celular deste elemento e dos seus potenciais efeitos biológicos.

I.1 – Contração muscular: conceitos sobre as proteínas contrácteis

Nos músculos, em geral, a actividade contráctil depende da interacção de dois tipos de filamentos citoplasmáticos que se interpenetram: os filamentos finos (constituídos por actina) e os filamentos grossos (constituídos por miosina). Este processo é mediado pelas “cabeças” de miosina, que têm a capacidade de ligar actina e induzir movimento utilizando a energia proveniente da hidrólise de ATP.

I.1.1 – Os filamentos finos

Os filamentos finos, ou de actina (também designada, neste caso, de F-actina ou actina filamentosa) com cerca de 1 μm de comprimento e 80 Å de diâmetro consistem em duas cadeias de F-actina organizadas em forma de hélice [Holmes *et al.*, 1990] (Figura I.1-A).

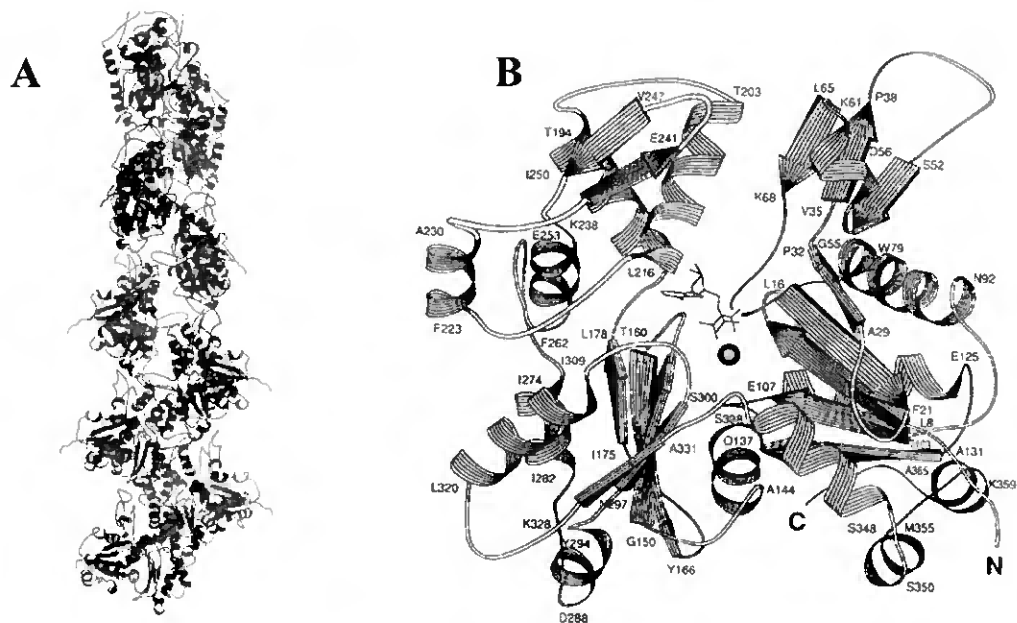


Figura I.1 – (A) Estrutura da F-actina contendo 13 moléculas de G-actina arranjadas em seis voltas “left-handed”. (B) Estrutura da G-actina com dois domínios similares, cada um dos quais contendo 5 folhas- β e hélices- α associadas [Geeves e Holmes, 1999].

A F-actina é formada pela polimerização de subunidades globulares de actina também designadas de G-actina, ou actina globular, uma proteína relativamente pequena com um peso molecular de aproximadamente 42 kDa. A molécula de G-actina é dividida

em dois domínios equivalentes por uma fenda contendo o nucleótido (ATP ou ADP) e o catião (Mg^{2+} ou Ca^{2+}) ligados. Estes dois domínios estão covalentemente ligados por apenas duas fitas da cadeia polipeptídica que se encontram na base da molécula permitindo o movimento dos domínios. Cada um dos domínios constituídos por 5 folhas- β e hélices- α associadas contem dois subdomínios; um envolvido em interacções actina-actina, e o outro formando o topo do local de ligação do nucleótido [Kabsch *et al.*, 1990] (Figura I.1-B).

I.1.2 – Os filamentos grossos

No músculo esquelético, os filamentos grossos com cerca de 1-1,5 μm de comprimento e 120 Å de diâmetro são formados por moléculas de miosina de tipo II. O termo miosina designa uma superfamília de motores moleculares capazes de translocar filamentos de actina, vesículas ou outras partículas fixas nos filamentos de actina. Esta superfamília é constituída por, pelo menos, 15 classes distintas, sendo a miosina de tipo II (existente tanto em células musculares como em células não musculares) uma das classes mais bem estudadas [Sellers *et al.*, 1996]. A molécula de miosina de tipo II é uma proteína relativamente grande (480 kDa) e é composta de dois pares de cadeias leves não idênticas, e um par de cadeias pesadas (Figura I.2). Os domínios C-terminais das duas cadeias pesadas enrolam-se numa estrutura em “coiled-coil” para formar uma “cauda”, enquanto que o N-terminal da cadeia pesada, forma uma zona globular semelhante a uma cabeça. Grande parte do que se sabe sobre a relação estrutura/função da molécula de miosina foi conseguido por proteólise controlada desta proteína. Assim, pela acção de proteases é possível obter vários fragmentos a partir da molécula de miosina de entre os quais se destacam o fragmento HMM (meromiosina pesada) e o subfragmento-1 (S1) com cerca de 230 kDa e 130 kDa, respectivamente. Estes fragmentos mantêm as propriedades essenciais no que se refere à actividade ATPásica e interacção com a actina [Bagshaw, 1982] (Figura I.2).

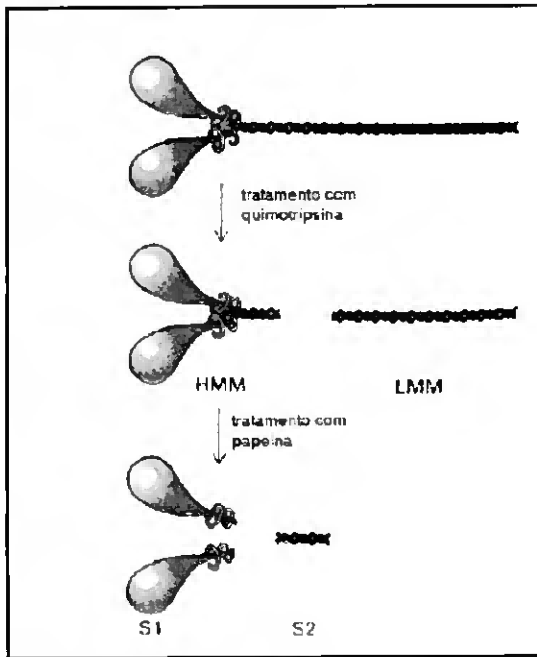


Figura I.2 – Accção de proteases para obtenção de fragmentos da molécula de miosina. A quimotripsina quebra a molécula na zona flexível da “cauda” em dois fragmentos designados por meromiosina pesada (HMM) e meromiosina leve (LMM). A papaína quebra a molécula entre a zona das “cabeças” e da “cauda” formando dois fragmentos: S1 e S2 [adaptado de Lodish *et al.*, 1998].

O subfragmento-1 tem adicionalmente dois locais sensíveis a proteólise. O primeiro situa-se a cerca de 25 kDa e o segundo a cerca de 75 kDa do N-terminal sendo que a clivagem em ambos os sítios produz três fragmentos: 25 kDa N-terminal, 50 kDa central e 20 kDa C-terminal [Yamamoto e Sekine, 1980; Mornet *et al.*, 1984].

I.1.3 – A estrutura cristalográfica do subfragmento-1 de miosina

A estrutura tri-dimensional da miosina só se tornou disponível em 1993 quando Ivan Rayment e seus colaboradores cristalizaram pela primeira vez o subfragmento-1 da miosina de músculo esquelético de galinha [Rayment *et al.*, 1993a]. Esta é uma molécula assimétrica com 165 Å de comprimento, 65 Å de largura e 40 Å de espessura. No geral, a estrutura secundária da cabeça de miosina é dominada por helices- α , com 48 % dos resíduos formando este tipo de motivo. Existem domínios funcionais que podem ser discernidos da estrutura que incluem: o local de ligação do nucleótido e a superfície de ligação à actina localizados em sítios opostos na cabeça de miosina; e a zona de ligação das cadeias leves localizada na região do pescoço (Figura I.3).

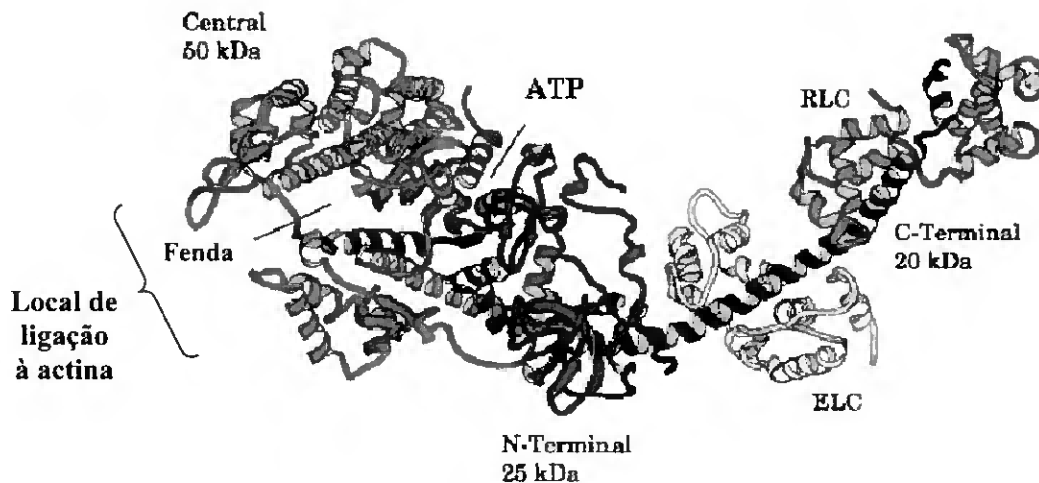


Figura I.3 – Representação em “cartoon” do subfragmento-1 de miosina de músculo esquelético de galinha mostrando a estrutura secundária dos domínios principais. Os fragmentos proteolíticos estão coloridos da seguinte forma: verde para o de 25 kDa N-terminal; vermelho para o de 50 kDa central; e azul para o de 20 kDa C-terminal. As cadeias leves essenciais (ELC) e regulatórias (RLC) estão coloridas de amarelo e rosa, respectivamente [adaptado de Rayment, 1996].

A estrutura em redor do local activo (sítio de ligação de ATP) engloba 7 folhas- β , na sua maioria paralelas, com contribuição dos três fragmentos proteolíticos. Algumas das regiões mais conservadas no que diz respeito à sequência primária estão presentes nos “loops” que interligam estas folhas- β , incluindo a sequência GESGAGKT (P-loop ou motivo Walker A) e que é comum a muitas proteínas que ligam nucleótidos, nomeadamente algumas cinases, ATP sintetase e as proteínas-G [Walker *et al.*, 1982]. Dois outros motivos estruturais igualmente comuns são o “Switch-I” e “Switch-II”. Estes três motivos formam o designado “Pi-tube” envolvido na coordenação dos fosfatos da molécula de ATP [Rayment *et al.*, 1993a]. Acima do local activo estende-se uma sequência flexível, designada de “loop-1”, que contem seis resíduos carregados e que une os fragmentos proteolíticos de 25 e 50 kDa. O fragmento de 50 kDa tem uma topologia complexa que pode ser descrita como dois domínios maioritários (superior e inferior) separados por uma fenda. Os resíduos que ligam os segmentos de 50 e 20 kDa formam o

“loop-2” que contém nove glicinas e cinco lisinas. Este local é resistente a proteólise no complexo actomiosina e como tal contribui, provavelmente, para a interface actina/miosina. O segmento de 20 kDa que começa próximo da ponta da “cabeça” e que se estende ao longo da molécula é dominado por hélices- α . Contem dois grupos sulfidrilo, Cys-707 e Cys-697, que são mais reactivos que os outros 11 na molécula e são usualmente designados de SH1 e SH2, respectivamente, pela ordem da sua reactividade química. Na presença, mas não na ausência de nucleótidos, estes dois grupos podem sofrer “cross-link” por uma variedade de reagentes, incluindo a oxidação a uma ponte disulfureto. Na estrutura cristalina do subfragmento-1 de galinha, que não contem ATP, estes dois grupos sulfidrilo encontram-se numa hélice- α separados por 18 Å, sugerindo que devem ocorrer alterações conformacionais nesta região após ligação do nucleótido que permitam o “cross-linking”. Na ponta desta hélice- α segue-se a zona do pescoço estabilizada pela ligação das cadeias leves essenciais e regulatórias [Rayment *et al.*, 1993a; Geeves e Holmes, 1999].

1.1.4 – Modelo de ligação da miosina à actina

A interface actina/miosina é larga envolvendo interações electrostáticas e hidrofóbicas. Os aminoácidos da molécula de miosina de ambos os domínios superior e inferior do segmento de 50 kDa, bem como os resíduos no “loop-2” que ligam os segmentos de 50 e 20 kDa, participam nesta interface. Prevê-se que cada “cabeça” de miosina interactue com dois monómeros de actina adjacentes ao longo da hélice de F-actina [Bonafé e Chaussepied, 1995] como se ilustra na Figura I.4. Os possíveis contactos ocorrem essencialmente em quatro áreas: (i) contacto entre o “loop-2” rico em glicinas e lisinas com aminoácidos carregados negativamente no primeiro monómero de actina; (ii) contacto estereoespecífico e hidrofóbico entre o domínio inferior do segmento de 50 kDa e os dois monómeros de actina; (iii) contacto entre o “loop” exposto na ponta do domínio superior do segmento de 50 kDa e o primeiro monómero de actina; (iv) interacção electrostática

entre o domínio inferior do segmento de 50 kDa e o segundo monómero de actina [Rayment *et al.*, 1993b; Holmes, 1997].

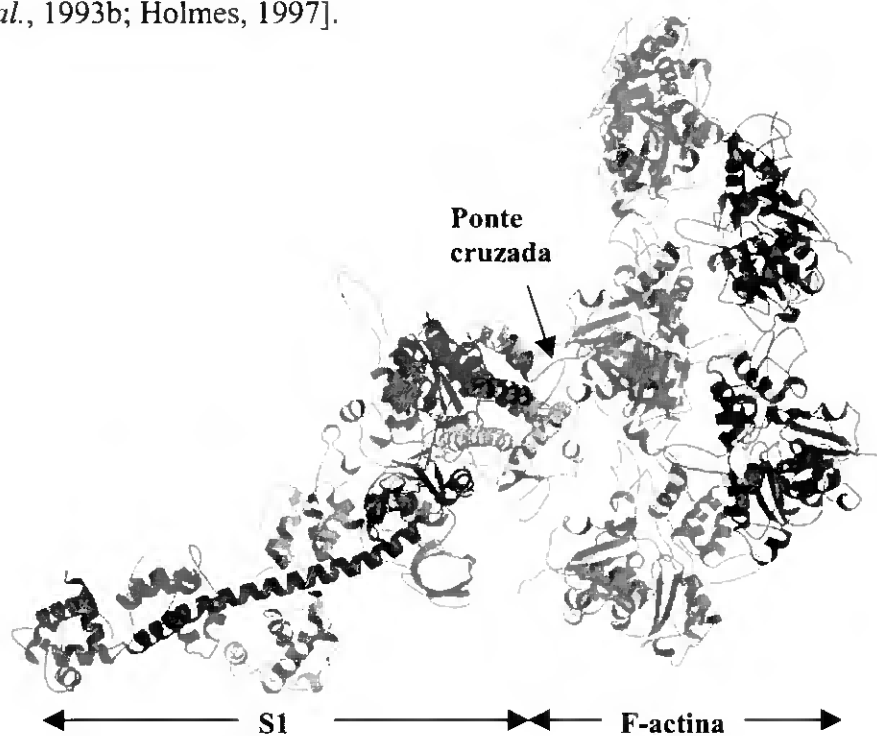


Figura I.4 – Estrutura do complexo acto-miosina mostrando 5 moléculas de G-actina numa hélice de F-actina (direita) e o subfragmento-1 de miosina (esquerda). Note-se que a ponte cruzada estabelece contacto com dois monómeros de actina adjacentes [Geeves e Holmes, 1999].

I.1.5 – Mecanismo genérico da contracção muscular

Além de proteína estrutural, a miosina é também uma enzima especializada, uma ATPase, que tem a capacidade de acoplar a energia resultante da hidrólise de MgATP a alterações conformacionais, com a concomitante produção de movimento. Os processos elementares de hidrólise de ATP pela miosina, foram primeiramente caracterizados por Lynn e Taylor, em 1971, e actualmente constituem uma referência comum na discussão de estudos sobre o mecanismo de hidrólise de ATP pela miosina ou sobre o processo de contracção muscular. Na literatura o mecanismo de hidrólise de ATP catalisado pela miosina encontra-se bem descrito [Bagshaw, 1982; Sellers, 1999] tendo sido objecto de diversos artigos de revisão [Eisenberg e Hill, 1985; Bagshaw, 1987; Warrick e Spudich, 1987; Geeves e Holmes, 1999; Highsmith, 1999].

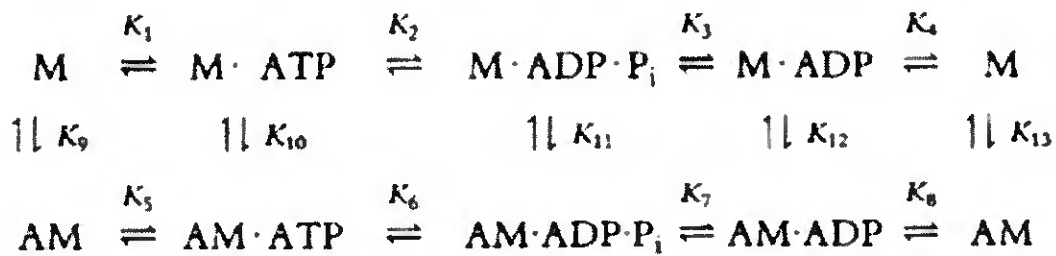


Figura I.5 – Esquema cinético da hidrólise de ATP pela miosina [adaptado de Sellers, 1999].

Na Figura I.5, apresenta-se um esquema cinético simplificado da hidrólise de ATP pela miosina. Começemos por examinar o processo na ausência de actina mostrado na parte superior do esquema. A ligação do ATP à miosina é rápida ($K_1=10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) com uma constante de ligação elevada ($10^{10}\text{-}10^{11} \text{ M}^{-1}$). O substrato ATP liga-se de uma forma quase irreversível ($K_1 \ll K_3$) o que significa que para ser libertado deverá ser hidrolisado e libertado sob a forma de produtos. A hidrólise de ATP para formar o complexo $M \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}_i$ é rápida ($K_2=100 \text{ s}^{-1}$) sendo que este passo hidrolítico é reversível com uma constante de equilíbrio de cerca de 1 a 10. A libertação dos produtos provenientes da hidrólise de ATP é sequencial em que a libertação do fosfato inorgânico (P_i) precede a libertação de ADP.

O esquema cinética para a hidrólise de MgATP na presença de actina é necessariamente mais complexo do que na sua ausência. Assim, a miosina e a actina, na ausência de ATP, encontram-se fortemente ligadas ($K_9=10^7\text{-}10^8 \text{ M}^{-1}$). O ATP liga-se rapidamente, tal como com a miosina sozinha, e tem o efeito de baixar significativamente a afinidade da actina para a miosina para cerca de $10^4\text{-}10^5 \text{ M}^{-1}$. A hidrólise de ATP pela miosina pode ocorrer quando esta se encontra ligada à actina ou desligada, sendo que o complexo $M \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}_i$ está em rápido equilíbrio com o complexo $\text{AM} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}_i$. Apesar da questão do passo limitante da reacção na presença de actina não estar ainda bem resolvida, não permanecem dúvidas quanto ao facto da actina acelerar a hidrólise de ATP (por um factor de 50-100 vezes) ao permitir uma via alternativa à libertação do P_i através do complexo $\text{AM} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}_i$.

No novo modelo proposto em 1995 por Fisher e colaboradores correlaciona-se o esquema cinético com o modelo estrutural de interação miosina/actina baseando-se na observação de que o local de ligação do ATP não fecha significativamente após ligação do nucleótido. Neste novo modelo a ligação do nucleótido é vista como um processo bifásico. Numa primeira fase, apenas os fosfatos γ , β e α se ligam ao “P-loop” situado na base do local activo. Como consequência a fenda que divide os domínios superior e inferior do segmento de 50 kDa inicialmente fechada, abre-se, e ao fazê-lo, as interações estereoespecíficas entre a miosina e a actina são rompidas, permitindo ainda assim, o estado de ligação fraco. Este primeiro passo é consistente com a redução da afinidade quando o ATP se liga à miosina. Numa segunda fase da ligação do ATP, o fecho do local activo em redor da base causa uma flexão da molécula que é ainda mais pronunciada com a hidrólise do nucleótido a ADP·P_i. O restabelecimento da ligação à actina causa o movimento do domínio inferior de encontro ao domínio superior do segmento de 50 kDa, permitindo a libertação do fosfato- γ e por sua vez, o fecho da fenda do segmento de 50 kDa. Existem indicações de que o fosfato- γ não pode sair pela mesma via que usou para o local activo, e como tal deverá sair por outra via. Foi sugerido que o fosfato se liberta pela parte inferior do local activo, através de um mecanismo de “porta traseira” [Yount *et al.*, 1995]. Este último passo está associado à rotação do domínio onde se ligam as cadeias leves regulatórias, que funciona como uma alavanca amplificando pequenas alterações conformacionais que ocorrem em redor da hélice SH1-SH2 e que geram um movimento (“power stroke”) de cerca de 10 nm de comprimento. A perda do fosfato- γ pode ser assim vista como o dispositivo que inicia o “power stroke” e permite a molécula de miosina reverter a alteração conformacional induzida pela ligação do nucleótido. Não é pois de estranhar que a substituição do fosfato- γ por análogos, tais como o vanadato, originem complexos estáveis que inibem a hidrólise de ATP pela miosina.

I.2 – Vanádio (V): um elemento com significado biológico

O vanádio foi descoberto em 1802, pelo mineralogista espanhol Andrés Manuel del Rio, que o designou de pancrómio, devido à extraordinária gama de cores dos seus sais. Mais tarde, denominou-o de eritrónio, devido à cor vermelha desses sais quando tratados com ácidos. Infelizmente, del Rio perdeu confiança na sua descoberta, pensando tratar-se afinal de apenas um composto de crómio. Trinta anos depois, o vanádio foi redescoberto por Nils Gabriel Sefstrom, que o purificou na sua forma de óxido e o denominou de vanádio em honra da deusa nórdica da beleza e do amor, Vanadis, novamente em alusão à gama de cores dos derivados do elemento [Nriagu, 1998; Barceloux, 1999].

A química excepcionalmente complexa que o vanádio apresenta tem originado sucessivas interpretações incorrectas desde o momento em que este metal foi descoberto, constituindo um problema adicional que certamente os cientistas não esperavam quando descobriram importantes acções biológicas deste elemento vestigial. Revisões de como o vanádio pode actuar e funcionar na biosfera incluem investigações que vão desde a química de coordenação e redox deste elemento [Crans, 1994a; Crans *et al.*, 1998; Rehder, 1999], passando pelos aspectos funcionais e estruturais [Rehder e Jantzen, 1998; Crans, 2004] até aos efeitos bioquímicos e fisiológicos do vanádio ou compostos de vanádio [Chasteen, 1983; Rehder, 2003; Mukherjee, 2004].

Talvez devido à diversidade de efeitos biológicos promovidos por vanádio, não foi ainda encontrada uma prova definitiva ou identificativa da sua função nos seres vivos. O facto porém é que inibe muitas enzimas *in vitro*, particularmente a actividade ATPásica da miosina [Goodno, 1979]. Além disso, os iões de vanádio fornecem a possibilidade de serem usados como sondas cinéticas e espectroscópicas no estudo de mecanismos enzimáticos complexos.

1.2.1 – Distribuição e biodisponibilidade do vanádio

Membro do grupo VB da tabela periódica, o vanádio é um sólido metálico à temperatura ambiente que ocorre nas formas isotópicas (naturais) ^{50}V e ^{51}V e que está amplamente distribuído por todos os ecossistemas. Se bem que o vanádio metálico, em si, não ocorra na natureza, conhecem-se cerca de 70 minerais diferentes onde o metal está associado (em especial na forma de pentóxidos de vanádio ou vanadatos) a urânio, cobre, chumbo, zinco, fosfatos ou titânio ferroso. Muitos compostos de vanádio são, por outro lado, constituintes principais da matéria orgânica fóssil, principalmente óleos de crude, carvão e fósseis carbonáceos [Greenwood e Earnshaw, 1997; Nriagu, 1998].

Na crosta terrestre, o vanádio é o décimo nono elemento mais abundante, com uma concentração de cerca de 136 ppm. Está difusamente distribuído em rochas, solos, plantas, animais e, numa menor extensão, na água, onde os níveis raramente excedem 0,1 ppb. A sua abundância na biosfera é cerca de duas vezes a do cobre, dez vezes a do chumbo e a do molibdênio, constituindo o quinto metal de transição mais abundante a seguir ao Fe, Ti, Mn e Zr [Greenwood e Earnshaw, 1997]. O vanádio também se encontra nos alimentos consumidos pelo homem e outros animais. Os alimentos considerados “ricos” neste elemento incluem a salsa, cogumelos, pimenta preta e mariscos, seguidos das frutas, vegetais, cereais, gorduras e óleos, com menor quantidade [Chasteen, 1983].

A vasta utilização dos compostos de vanádio na indústria química, as elevadas concentrações existentes nos óleos de crude e a sua combustão contribuíram para o aumento significativo deste elemento no meio ambiente e, conseqüentemente, para um renovado interesse pelo elemento e pelos problemas ambientais por ele induzidos [Nriagu, 1998].

I.2.2 – Propriedades químicas do vanádio

As propriedades dos elementos químicos dependem, em última análise, da configuração electrónica do átomo. A variabilidade encontrada no comportamento químico do vanádio, um membro da 1ª série de transição, poderá residir, então, na sua configuração ($[Ar] 3d^2 4s^2$), que lhe permite formar múltiplos estados de oxidação que vão de -2 a $+5$. Em solução aquosa, os estados de oxidação mais comuns e estáveis vão de $+5$ a $+2$ e, desses, apenas o $V(III)$, $V(IV)$ e $V(V)$ são biologicamente importantes, uma vez que o $V(II)$ é demasiado redutor para existir em qualquer organismo vivo conhecido. Em condições fisiológicas, portanto, o vanádio encontra-se maioritariamente nos estados de oxidação $V(IV)$ e $V(V)$; o ião vanádico, $V(VIII)$, parece ocorrer apenas nos vanadócitos de tunicados [Baes e Mesmer, 1976; Chasteen, 1983; Crans *et al*, 1998].

A química do vanádio (IV) em solução aquosa, encontra-se em torno do ião oxovanádio ou vanadilo, VO^{2+} , que forma complexos penta- e hexa-coordenados, e apresenta uma cor azulada. Permanece estável apenas em meios acídicos, sendo rapidamente oxidado a valores de pH superiores a 3. O vanadilo é rapidamente formado a partir de vanádio (V) na presença de qualquer agente redutor em solução aquosa, nomeadamente aqueles muito comuns em células, tais como o ácido ascórbico, a glutathione reduzida (GSH) ou o NADH. Por este motivo, é muito provavelmente o principal estado de oxidação existente nos sistemas biológicos. Por formar fortes complexos com diversos ligandos, tais como proteínas, citrato, ATP, PPI e aminoácidos livres, é muito improvável que o VO^{2+} exista livre nos fluidos intracelulares, excepto talvez, em vacúolos ácidos como os lisossomas [Chasteen, 1983].

O vanádio pentavalente, $V(V)$, é a forma redox mais estável numa larga gama de pH. A pH ácido forma um catião, $cis-VO_2^+$, que complexa com agentes quelantes como por exemplo EDTA. Para valores de pH fisiológicos, ou mais elevados, surgem os vanadatos, que são aniónicos e que tendem a formar complexos polinucleares [Chasteen,

1983]. Nesse sentido, as soluções aquosas de vanadato são extremamente complexas onde vários equilíbrios de protonação e de oligomerização ocorrem em simultâneo, e onde as espécies presentes dependem do pH, da concentração total do elemento, da força iónica e da temperatura [Heath e Howarth, 1981; Pettersson *et al.*, 1983; Pettersson *et al.*, 1985; Pope, 1983; Rehder, 1991; Crans, 1994a].

Grande parte da importância biológica que se atribui ao vanádio está associada ao monómero VO_4^{3-} (ortovanadato), por ser um análogo estrutural e electrónico do ortofosfato (PO_4^{3-}) (Plass, 1999). Inclusivamente, presume-se que o HVO_4^{2-} , H_2VO_4^- , H_3VO_4 , formados pela protonação de VO_4^{3-} sejam análogos dos derivados de fosfato correspondentes. O ortovanadato pode mesmo estar coordenado tetraedicamente de um modo análogo ao estado fundamental do fosfato ou apresentar uma geometria bipiramidal trigonal penta-coordenada, tal como o estado de transição do PO_4^{3-} . Não é de admirar, portanto, que os vanadatos sejam capazes de actuar como os fosfatos nas reacções bioquímicas [Chasteen, 1983; Greenwood e Earnshaw, 1997; Barceloux, 1999]. Para além disso, o ácido vanádico H_3VO_4 ($\text{pK}_a = 3,5; 7,8; 12,5$) é mais fraco do que o ácido fosfórico, H_3PO_4 ($\text{pK}_a = 1,7; 6,5; 12,1$), o que justificaria parcialmente uma ligação preferencial do vanadato às enzimas [Chasteen, 1983].

O vanadato monomérico, oligomeriza para originar o dímero ($\text{V}_2\text{O}_7^{4-}$), que dependendo do valor de pH também pode existir em várias formas protonadas ($\text{HV}_2\text{O}_7^{3-}$, $\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$ e $\text{H}_3\text{V}_2\text{O}_7$) [Pettersson *et al.*, 1985]. No caso do vanadato dimérico, a analogia com o pirofosfato, PPi , é usualmente presumida, apesar da falta de evidência da estrutura em solução aquosa. Após formação de V_2 , é formado o vanadato tetramérico ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$). O V_4 é a espécie maioritária em soluções mais concentradas sendo muitas vezes referida como “metavanadato”. As estruturas de raios-X para o $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$ e $\text{HV}_4\text{O}_{12}^{3-}$ foram resolvidas e reportadas como sendo cíclicas [Day *et al.*, 1990]. Em solução aquosa, a espécie tetramérica tem a formula molecular $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$ e presume-se que seja cíclica com uma

estrutura do tipo adamantano [Tracey *et al.*, 1988]. O vanadato pentamérico ($V_5O_{15}^{3-}$) é a última espécie a ser formada e também se presume possuir uma estrutura cíclica, embora ainda não tenha sido resolvida a sua estrutura [Crans, 1994a].

As espécies V_1 , V_2 , V_4 e V_5 são os principais vanadatos presentes numa solução aquosa, embora possam ser formados ainda outros oligómeros, provavelmente o mais importante em termos bioquímicos seja o vanadato decamérico ou decavanadato ($V_{10}O_{28}^{6-}$) (Figura I.6). Este último composto, é a espécie predominante em soluções moderadamente acídicas (pH 2-6) quando o vanadato está presente em concentrações superiores a 100 μ M. O oxoanião encontra-se bem caracterizado em termos estruturais apresentando em solução a mesma estrutura que se observa no estado sólido [Howarth e Jarold, 1978; Day *et al.*, 1987].

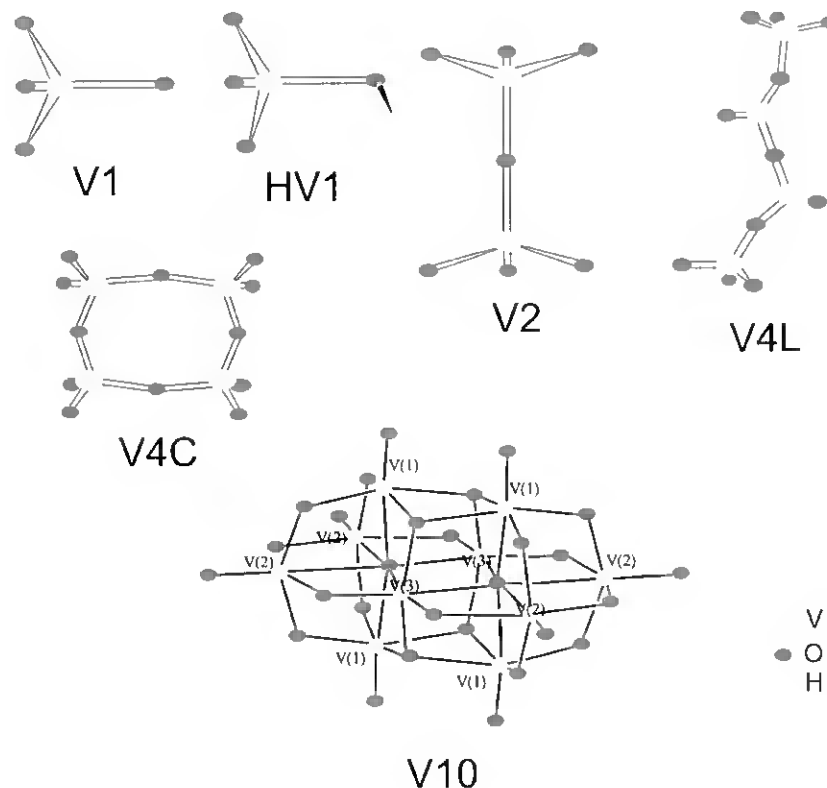


Figura I.6 – Estruturas de algumas espécies de vanadato. V_1 (VO_4^{3-}), HV_1 (HVO_4^{2-}), V_2 ($V_2O_7^{4-}$), V_{4L} ($V_4O_{13}^{6-}$), V_{4C} ($V_4O_{12}^{4-}$), V_{10} ($V_{10}O_{28}^{6-}$). Os átomos são representados por círculos amarelos (vanádio), círculos vermelhos (oxigênio) e cinzentos (hidrogênio). As estruturas V_1 , HV_1 , V_2 , V_{4L} e V_{4C} foram adaptadas de Amado *et al.* [1993] e a V_{10} de Howarth e Jarold [1978].

I.2.3 - Acumulação de vanádio e compostos biogénicos contendo vanádio

Apesar de este elemento ser vestigial na maioria dos seres vivos, conhecem-se organismos que acumulam compostos de vanádio em quantidades consideráveis. Alguns cogumelos da espécie *Amanita muscaria* apresentam a particularidade de concentrar vanádio no estado de oxidação (IV) sob a forma de um composto designado por amavadina [Bayer, 1995]. Apesar de este complexo evidenciar características únicas, a sua função permanece por esclarecer.

As primeiras funções atribuídas ao vanádio foram reveladas em estudos sobre um tipo de organismo, os tunicados, que vivem nos oceanos e que acumulam vanádio em organelos existentes nas células sanguíneas designadas por vanadócitos [Kustin *et al.*, 1983]. Os tunicados são capazes de acumular o vanádio numa forma reduzida, V(III), e em concentrações que chegam a atingir 1 M, capturando-o nas formas HVO_4^{2-} ou $H_2VO_4^-$ presentes na água do mar.

Também na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, empregue no fabrico de cerveja, se apurou a capacidade de acumular concentrações de vanádio (IV) na ordem dos milimolar e em compartimentos específicos [Bode *et al.*, 1990]. Nas plantas superiores, observou-se que o vanádio é absorvido do solo após redução de V(V) a V(IV) por complexação com um componente existente na parede celular [Deiana *et al.*, 1983]. Mais recentemente, identificou-se um outro bioacumulador de vanádio, na minhoca *Pseudopotamilla ocellata* [Ishii e Nakai, 1995].

Para além destes bioacumuladores naturais, conhecem-se organismos onde o vanádio existe como cofactor de haloperoxidases e nitrogenases. As haloperoxidases constituem uma vasta gama de enzimas que catalizam a oxidação de haletos (como I e Br, por exemplo) na presença de peróxido de hidrogénio; algumas destas enzimas contêm um grupo prostético, ao passo que outras possuem um complexo de V(V) ligado a N e O [Vilter, 1995]. As algas vermelhas e castanhas possuem este tipo de haloperoxidases

associadas biologicamente a vanádio [Crans *et al.*, 1998; Silva e Williams, 1997]. As nitrogenases, por seu turno, que são enzimas importantes do ponto de vista ecológico, catalisam a conversão de N_2 a NH_3 e são, deste modo, responsáveis pelo ciclo que o N_2 experimenta desde a atmosfera até ao solo [Eady, 1995]. Este processo está dependente da fixação do N_2 , para o qual se conhece hoje não só um mecanismo baseado numa nitrogenase contendo ferro como num outro que assenta numa nitrogenase que contem agrupamentos polinucleares e centrais de Fe, V e S, como acontece nas azoto-bactérias [Robson *et al.*, 1986; Hales *et al.*, 1986a; Hales *et al.*, 1986b].

I.2.4 - Efeitos fisiológicos e toxicológicos promovidos por vanádio

O vanádio é um elemento vestigial, considerado essencial para alguns animais, devido às suas actividades fisiológicas e bioquímicas, embora o seu possível papel de essencialidade em humanos necessite ainda de ser esclarecido. Em condições normais, a absorção do vanádio pode tomar lugar por inalação, pelo tracto gastrointestinal e ainda pela pele (em menores quantidades) e é especificamente armazenado em determinados órgãos e tecidos que incluem o fígado, rim, cérebro, coração, músculo e ossos. No caso do homem, muito pouco vanádio é retido no organismo. Sob condições fisiológicas normais, a quantidade total de vanádio é de cerca de 100 μM , com muitos tecidos contendo menos de 10 ng/g de tecido [Etcheverry e Cortizo, 1998]. De facto, não se conhecem ainda evidências de deficiência nutricional causada por vanádio em humanos, nem de proteínas ou enzimas que contenham vanádio, em animais superiores e humanos. Mesmo assim, vários estudos relacionam o aparecimento de deficiências em galinhas e ratos, derivadas de uma alimentação com quantidades reduzidas de vanádio, relatando-se sintomas como crescimento retardado, malformações ósseas, estagnação da reprodução, distúrbios no metabolismo lipídico (aumento dos níveis de colesterol no plasma), entre outros [Erdmann *et al.*, 1984; Sitprija e Eiam-Ong, 1998].

Os efeitos fisiológicos do vanádio parecem ser muito diversificados. Como cada composto de vanádio tem um determinado número de coordenação, estabilidade e labilidade específicas, pode responder e actuar de variadas formas ao nível dos organismos vivos. Sabe-se que possui um papel no metabolismo do cálcio, ajudando à formação dos dentes e ossos, induzindo a sua mineralização; na reprodução e desenvolvimento, mimetizando e potenciando factores de crescimento; na biossíntese de lípidos (colesterol e triglicéridos), inibindo posteriormente a sua acumulação nos vasos sanguíneos e no Sistema Nervoso Central (SNC); no metabolismo da glicose, estimulando o consumo desta bem como a síntese de glicogénio, possuindo assim capacidade para mimetizar e potenciar os efeitos celulares da insulina; na transdução de sinais celulares, regulando a actividade de segundos mensageiros, entre outros [Chasteen, 1983; Etcheverry e Cortizo, 1998].

A toxicidade associada ao vanádio está muito bem documentada, descrevendo-se sintomas em vários mamíferos (Homem, inclusive), como: diarreia, caimbras, irritação da pele e mucosas, anemia, palpitações cardíacas, bronquite, pneumonia, distúrbios no SNC, entre outros. No geral, a toxicidade varia com a natureza do composto, aumentando proporcionalmente à sua valência, verificando-se, por outro lado, que é elevada quando o composto de vanádio é injectado, moderada quando este é inalado e baixa quando ingerido [Sitprija e Eiam-Ong, 1998; Barceloux, 1999]. Assim, embora em concentrações vestigiais (1-10 nM) o vanádio possa exercer uma vasta gama de efeitos benéficos nos organismos vivos, para concentrações superiores torna-se tóxico [Nechay, 1984].

I.2.5 – Aplicações farmacológicas do vanádio

No início do século XX, quando pouco ou nada se sabia sobre o vanádio, médicos franceses usaram este metal no tratamento de diabetes, anemia, reumatismo crónico e outras doenças. A sua utilização tem sido questionada desde então provavelmente porque as suas aplicações são tão surpreendentes quanto variadas. Na literatura podemos encontrar

diversos artigos de revisão recentemente publicados sobre as varias aplicações medicinais do vanádio [Evangelou, 2002; Rehder, 2003; Shechter *et al.*, 2003; Mukherjee *et al.*, 2004].

Actualmente, está bem estabelecido o potencial uso de compostos de vanádio como substitutos orais da insulina no tratamento de pacientes diabéticos do tipo I (deficientes em insulina) e particularmente diabéticos do tipo II (tolerantes a insulina). Os efeitos de compostos de vanádio como insulino-miméticos compreendem a inibição de vários sistemas enzimáticos chave no fígado, músculo e tecidos adiposos, que actuam colectivamente na utilização ou armazenamento celular da glicose bem como no bloqueio das acções hormonais que se opõem à acção da insulina [Shechter, 1990; Matsumoto, 1994; Elberg *et al.*, 1998; Sakurai e Tsuji, 1998].

O vanádio tem-se revelado igualmente promissor no tratamento de tumores [Desoize *et al.*, 1994; Evangelou, 2002; Mukherjee *et al.*, 2004]. Para além de possuir, por si só, uma actividade antitumoral, verificou-se, *in vivo*, que o vanadato reverte a resistência às drogas anticarcinogénicas. Este efeito do vanadato é deveras importante, uma vez que a resistência das células malignas às drogas anticarcinogénicas constitui um dos maiores obstáculos da quimioterapia actual [Colin *et al.*, 1994; Desoize *et al.*, 1994; Evangelou, 2002; Mukherjee *et al.*, 2004]. Mais recentemente, a aplicação de polioxometalatos como agentes anti-virais tem sido discutida baseada na interacção eficaz de decavanadatos com enzimas metabolizadores de fosfato [Pope, 1994; Stankiewicz *et al.*, 1995; Rehder, 2003].

I.2.6 - Bioquímica e metabolismo celular de vanádio

Nos fluidos corporais e extracelulares os compostos de vanádio existem predominantemente como vanadatos que entrarão nas células, depois, através de canais iónicos não-específicos e, intracelularmente, vão sofrer uma bio-redução mediante a acção da glutathiona celular, assim como de vários outros compostos com grupos -OH, como

pentoses, hexoses ou etanolaminas [Nriagu *et al*, 1998]. A figura I.7 ilustra o transporte de vanádio para a célula.

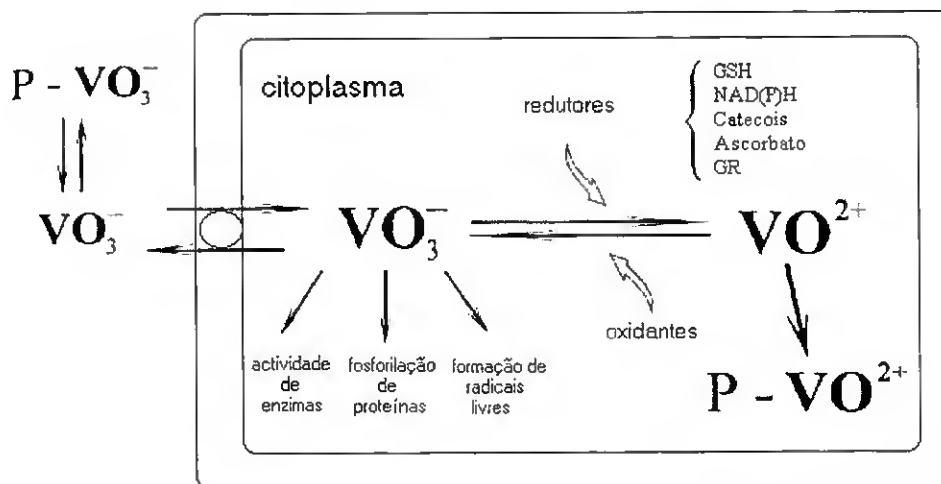


Figura I.7 – Transporte de vanádio para a célula e seus efeitos nos processos intracelulares. P, proteína; GSH, glutathiona reduzida; GR, glutathiona redutase [adaptado de Zaporowska e Scibor, 1998].

Assim, o vanádio tende a estar presente intracelularmente na forma de vanadilo (VO^{2+}), ligado à glutathiona, à transferrina (proteína transportadora de ferro), a catecolaminas, e a outros pequenos péptidos. No plasma, existe como monovanadato (H_2VO_4^-) e está ligado, normalmente, à transferrina do soro e à hemoglobina. Apesar de uma pequena parte do V(IV) ser reoxidado a V(V), a complexação da espécie reduzida impede uma acumulação de vanadatos, impedindo acções inibitórias que poderiam causar severos danos celulares [Chasteen, 1983; Zaporowska e Scibior, 1998].

O vanádio é susceptível de provocar, portanto, inúmeras mudanças bioquímicas nas células, afectando os processos de desfosforilação e fosforilação de proteínas, regulando muitas actividades enzimáticas e participando na formação de radicais livres. Assim, por exemplo, é um forte inibidor de muitas ATPases e fosfatases e um regulador de inúmeras actividades enzimáticas. Deste modo, pode participar em infindos eventos celulares, incluindo o transporte e metabolismo da glicose, o transporte de iões e aminoácidos, a síntese de glicogénio, a transcrição genética, a síntese de proteínas, a síntese de DNA, a ex-

pressão de oncogenes, a diferenciação celular entre outros. Conhecido pro-oxidante, é capaz de oxidar o NADPH e outros agentes redutores intracelulares, gerando radicais livres de oxigénio; a peroxidação lipídica aumenta, mas a actividade de enzimas antioxidantes como a glutathiona peroxidase e a catalase diminui. Postulou-se, daí, que a toxicidade do vanádio derivaria, em parte, destas propriedades, quando associadas a uma absorção de quantidade elevadas de compostos vanádicos no organismo [Byczkowski e Kulkarni, 1998; Etcheverry e Cortizo, 1998; Zaporowska e Scibior, 1998].

I.2.7 - Efeito de vanádio na actividade de enzimas

O vanádio pode inibir uma grande variedade de enzimas, por um lado, e estimular a actividade de outras, por outro. No primeiro grupo estão incluídas enzimas como as ATPases (de canais iónicos, fosfoenzimas transportadoras, da dineína, da miosina) e as fosfatases (fosfatase da tirosina, fosfatase ácida e alcalina), bem como a fosfofrutocinase, adenilato ciclase, colina esterase e catalase, entre outras [Sitprija e Eiam-Ong, 1998]. De entre as enzimas que são estimuladas por este elemento, têm-se a maioria das cinases (por exemplo, a cinase da tirosina), a adenilato ciclase (que cataliza a formação de AMPc) que é estimulada cerca de seis vezes mais na presença de 3 mM de vanadato [Nechay, 1984], ou a glucose-6-fosfato desidrogenase, que reduz a glicose muito mais eficientemente na presença de vanadato, uma vez que forma facilmente ésteres de vanadato análogos aos ésteres de fosfato envolvidos naquela reacção catalítica. Outros exemplos de activação são o da fosfoglicerato mutase e o da fosfoglicerato fosfatase, cujas actividades são estimuladas na presença da espécie dimérica de vanadato [Crans, 1994b].

O efeito do vanádio na actividade das enzimas está relacionado com o seu número de coordenação, pondo-se a hipótese de actuar como um estado de transição nas enzimas ou mimetizar cofactores ou substratos; pode ainda estar envolvido em ligações de hidrogénio, interacções electrostáticas e interacções estéricas. A interacção com as

enzimas tem sido associada à sua capacidade de mimetizar o fosfato, devido às suas analogias estruturais, por um lado, e à sua actividade redox, por outro [Rehder e Jantzen, 1998; Crans, 1994b; Crans, 2004]. Com efeito, para além de afectar processos de fosforilação, a facilidade com que alterna entre os estados de oxidação +4, +5 (e +3) implementa um possível papel na interacção redox com enzimas contendo resíduos de cisteína, por exemplo, ou com qualquer outro composto orgânico que tenha actividade redox [Rehder, 1999]. Um outro tipo de interacção com enzimas envolve a mimetização de interacções proteína-proteína (como acontece com as polimerases e transcriptases). Assim, dependendo da enzima ou do tipo de reacção que essa enzima catalisa, uma determinada espécie de vanádio vai ter uma determinada interacção [Crans, 1994b].

A inibição da ribonuclease pelo vanádio foi a primeira referência da acção deste metal na actividade de uma enzima [Lindquist *et al.*, 1973]. Este efeito supressor da actividade da ribonuclease pelo complexo vanadilo-(IV)-uridina revelou-se útil no isolamento de RNA mensageiro de linfócitos, enquanto que os tradicionais inibidores de RNAases se mostraram inoperantes. Posteriormente, verificou-se que as fosfatases ácida e alcalina, que se supõem passarem por um intermediário fosforilado, são fortemente inibidas por vanádio [Van Etten *et al.*, 1974]. Esta descoberta sugeriu o uso deste metal como sonda cinética de mecanismos enzimáticos envolvendo a hidrólise de ligações fosfoéster. Todavia foram estudos que receberam pouca importância até que, em 1977, Cantley e seus colaboradores identificaram uma impureza no ATP comercial (da Sigma) preparado a partir de músculo esquelético de cavalo. Tratava-se de vanádio (V), que entretanto se descobriu ser também responsável pela inibição da Na^+, K^+ -ATPase [Josephson e Cantley, 1977]. Desde então, este potente inibidor foi extensivamente utilizado como ferramenta no estudo do mecanismo da bomba de sódio, impulsionando e valorizando a investigação da acção do vanádio em diversas enzimas, entre as quais a ATPase da miosina do músculo esquelético.

I.3 – Vanádio (V) como sonda cinética e espectroscópica no estudo da ATPase da miosina: perspectiva actual

No local activo da miosina, a hidrólise de ATP dá-se pelo ataque de uma molécula de água no fosfato- γ por um mecanismo do tipo SN_2 , com formação de um intermediário pentacoordenado de fósforo, que adopta uma geometria bipiramidal trigonal [Goody *et al.*, 1981]. Como já foi anteriormente referido, a espécie monomérica de vanádio (V), VO_4^{3-} (V_i) pode formar facilmente este tipo de estrutura, tornando-se assim um análogo do estado de transição do $Mg \cdot ADP \cdot Pi$ durante a hidrólise de ATP.

Contrariamente à sua interacção reversível com outras enzimas, o V_i forma um complexo com a miosina que parece ser inigualavelmente estável. O V_i sozinho forma um complexo com a miosina reversível e fraco, tal como o fosfato, mas, quando é adicionado ADP é formado um complexo enzimático inactivo e estável. Este complexo tem uma estequiometria de 1 ADP e 1 V_i por sítio activo, e a incorporação do V_i é altamente específica pois quaisquer dos compostos AMP, ATP, AMPPNP ou PPi não substituem o ADP. Na Figura I.8, apresenta-se o mecanismo de formação do complexo estável miosina-vanadato, proposto por Goodno [1982]. Um rápido pré-equilíbrio induz a formação de um complexo ternário reversível ($M \cdot ADP \cdot V_i$) que isomeriza lentamente para o complexo estável $M^\ddagger \cdot ADP \cdot V_i$. Uma notável diferença entre os complexos $M \cdot ADP \cdot V_i$ e $M \cdot ADP \cdot Pi$ é que neste último, o Pi dissocia-se com um tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de cerca de 12 segundos, enquanto que no primeiro o V_i dissocia-se com um $t_{1/2}$ maior do que 24 horas, a 25°C. Esta diferença pode ser explicada pela possível complexação do vanádio com grupos nucleofílicos no local activo, estabilizando a miosina na conformação $M^\ddagger \cdot ADP \cdot V_i$.

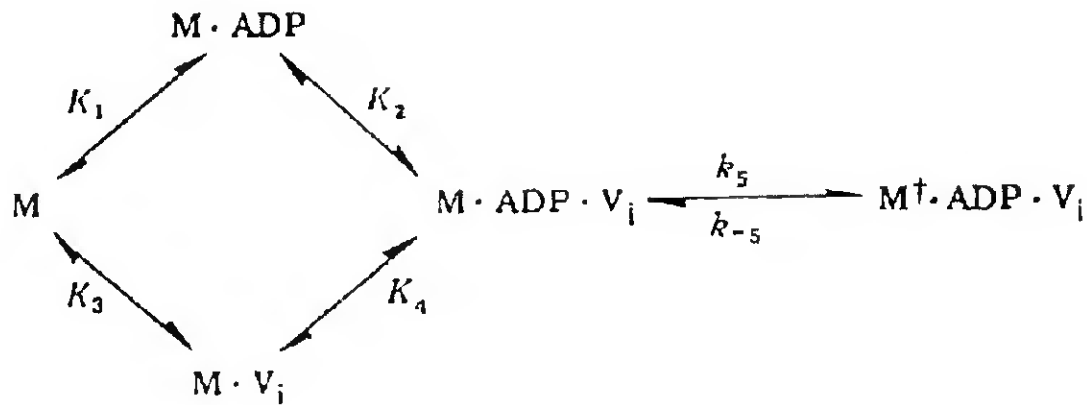


Figura I.8 – Mecanismo de formação do complexo estável de vanadato. A formação de $M \cdot ADP \cdot V_i$ é rápida e reversível mas a isomerização é essencialmente irreversível, formando um complexo estável $M^\dagger \cdot ADP \cdot V_i$ [Goodno, 1982].

O comportamento do complexo $M \cdot ADP \cdot V_i$ também foi estudado na presença de actina. Estudos *in vitro* realizados por Goodno e Taylor [1982] demonstraram que da mesma forma que a actina aumenta consideravelmente a velocidade de dissociação do P_i do complexo $M \cdot ADP \cdot P_i$ também o faz para o complexo $M \cdot ADP \cdot V_i$ apesar da dissociação do V_i ser mais lenta que a de P_i . Para além disso, verificaram que a actina se liga fracamente ao complexo ternário $M \cdot ADP \cdot V_i$ tal como acontece com o complexo $M \cdot ADP \cdot P_i$. Nesse sentido, foi sugerido que o $ADP \cdot V_i$ poderia ter um efeito de relaxamento semelhante ao ATP uma vez que dissociava o complexo actomiosina sob condições em que nenhuma das espécies separadamente tinha qualquer efeito. Contudo existe uma notável diferença na capacidade do V_i inibir a actividade ATPásica da miosina e da actomiosina. Na ausência de actina, o V_i inibe completamente a actividade ATPásica para concentrações na gama dos micromolar, um efeito que também fora observado noutros sistemas enzimáticos. Na presença de actina, o V_i inibe a actividade da miosina estimulada por actina apenas para concentrações na gama dos milimolar. Neste último caso, ao serem empregues concentrações de vanadato tão elevadas não podemos descurar: i) a presença de espécies oligoméricas de vanadato; ii) as diferentes espécies oligoméricas podem ligar com

alta afinidade e ter efeitos diferentes nas propriedades da enzima. Podemos pois antever que o efeito de inibição que se verifica na actividade da miosina estimulada por actina na presença de concentrações na gama dos milimolar de vanadato se deva em parte à presença de espécies oligoméricas de vanadato. De facto, num estudo publicado por Aureliano [2000], foi sugerido que para além da espécie monomérica também as espécies tetramérica e decamérica de vanadato interactivam com a miosina afectando a sua interacção com a actina. Contudo, para além da espécie monomérica pouco se sabe acerca da contribuição das outras espécies oligoméricas de vanadato na inibição da ATPase da miosina estimulada por actina. Com base no descrito seria de interesse aprofundar os mecanismos pela qual estas espécies oligoméricas de vanadato inibem a actividade ATPásica da miosina, particularmente a estimulada por actina. Espera-se pois que o presente estudo resulte por um lado em novos dados que aumentem o conhecimento da bioquímica destas espécies no que diz respeito aos requisitos estruturais básicos para a sua alta afinidade com determinadas proteínas, e por outro que contribua para elucidar o mecanismo de modulação da actividade ATPásica da miosina estimulada pela actina.

I.4 – Referências Bibliográficas

- Amado, A. M., M. Aureliano et al. (1993) “Combined Raman and ^{51}V NMR spectroscopy study of vanadium (V) oligomerization in aqueous alkaline solutions.” J Raman Spec **24**: 699-703.
- Aureliano, M. and V. M. C. Madeira (1998). “Energy transduction mechanisms as affected by vanadium (V) species: Ca^{2+} -pumping in sarcoplasmic reticulum.” In: *Vanadium in the Environment* (Nriagu, J. O. Ed.) pp. 333-357.
- Aureliano, M. (2000) “Vanadate oligomers interactions with myosin.” J Inorg Biochem **80**(1-2): 141-3.
- Baes, C. F. and R. E. Mesmer (1976). “The hydrolysis of cations.” Wiley, New York.
- Bayer, E. (1995). “Amavadin, the vanadium compound in amanitae.” In: *Metals Ions in Biological Systems* (Siegel, H. and A. Siegel eds.), Vol. 31. Marcel Dekker, New York, pp. 407-422.
- Bagshaw, C. R. (1982) “Muscle contraction.” In: *Outline studies in biology* (Chapman and Hall Ed.), London.
- Bagshaw, C. R. (1987). "Muscle contraction. Are two heads better than one?" Nature **326**(6115): 746-7.
- Barceloux, D. G. (1999). "Vanadium." J Toxicol Clin Toxicol **37**(2): 265-78.
- Bode, H. P., C. Friebel, et al. (1990). "Vanadium uptake by yeast cells." Biochim Biophys Acta **1022**(2): 163-70.
- Bonafe, N. and P. Chaussepied (1995). "A single myosin head can be cross-linked to the N termini of two adjacent actin monomers." Biophys J **68**(4 Suppl): 35S-43S.

- Byczkowski, J. Z. and A. P. Kulkarni (1998). "Oxidative stress and pro-oxidant biological effects of vanadium." In: Vanadium in the Environment. Part 2: Health Effects. (Nriagu, J. O. Ed), pp.235-263.
- Chasteen, N. D. (1983). "The biochemistry of vanadium." Struct. Bonding **53**: 105-138.
- Colin, M., C. Madoulet et al. (1994). "Study of sodium orthovanadate as a reverser of multidrug resistance on lymphoblastic leukemic CEM/VLB₁₀₀ cells." Anticancer Res **14**: 2383-2388.
- Crans, D. C. (1994a). "Aqueous Chemistry of labile oxovanadates: relevance to biological studies." Comments Inorg Chem **16**: 1-33.
- Crans, D. C. (1994b) "Enzyme interactions with labile oxovanadatos and other polyoxometalates." Comments Inorg Chem **16**: 35-76.
- Crans, D. C., S. S. Amin et al. (1998). "Chemistry of relevance to vanadium in the environment." In: Vanadium in the Environment (Nriagu, J. O. Ed), pp 73-95.
- Crans, D. C., J. Jason et al. (2004). "The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds." Chem Rev **104**: 849-902.
- Day, V. W., W. G. Klemperer et al. (1987). "Where are the protons in $H_3V_{10}O_{28}^{3-}$ questionable." J Am Chem Soc **109**: 2991-3002.
- Day, V. W., W. G. Klemperer et al. (1990). "Synthesis and structure of the new organometalic polyoxometalates, $([ETA-C_8H_{12}]IR)_2(V_4O_{12})^{2-}$ and $([ETA-C_8H_{12}])^3$." Chem Lett 1267-1270.
- Desoize, B., F. Briois et al. (1994). "Reversion of resistance to adriamycin by vanadate on four friend cell sublins." Int J Oncol **5**: 87-91.

- Eady, R. R. (1995). "Vanadium nitrogenases of *Azotobacter*." In: *Metals Ions in Biological Systems* (Siegel, H. and A. Siegel eds.), Vol. 31. Marcel Dekker, New York, pp. 363-406.
- Eisenberg, E. and T. L. Hill (1985). "Muscle contraction and free energy transduction in biological systems." Science **227**(4690): 999-1006.
- Elberg, G., J. Li et al. (1998). "Mechanisms of actions of vanadium in mediating the biological effects of insulin." In: *Vanadium in the Environment. Part 2: Health Effects*. (Nriagu, J. O. Ed), pp.277-295.
- Erdmann, E., K. Werdan, et al. (1984). "Vanadate and its significance in biochemistry and pharmacology." Biochem Pharmacol **33**(7): 945-50.
- Etcheverry, S. B. and A. M. Cortizo (1998). "Bioactivity of vanadium compounds on cells in culture." In: *Vanadium in the environment. Part 1: Chemistry and Biochemistry*. (Nriagu, J. O. Ed), pp.359-395.
- Evangelou, A. M. (2002). "Vanadium in cancer treatment." Crit Rev Oncol Hematol **42**(3): 249-65.
- Fisher, A. J., C. A. Smith, et al. (1995). "Structural studies of myosin:nucleotide complexes: a revised model for the molecular basis of muscle contraction." Biophys J **68**(4 Suppl): 19S-26S; discussion 27S-28S.
- Geeves, M. A. and K. C. Holmes (1999). "Structural mechanism of muscle contraction." Annu Rev Biochem **68**: 687-728.
- Goodno, C. C. (1982). "Myosin active-site trapping with vanadate ion." Methods Enzymol **85 Pt B**: 116-23.
- Goodno, C. C. and E. W. Taylor (1982). "Inhibition of actomyosin ATPase by vanadate." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(1): 21-5.
- Goody, R. S., W. Hofman, et al. (1981). "On the structure of the myosin-ADP-mg complex." FEBS Lett **129**(1): 169-72.

- Greenwood, N. N. and A. Earnshaw (1997). "Chemistry of the elements." Second Ed., Butterworth-Heinemann, pp.976-1001.
- Hales, B. J., E. E. Case, et al. (1986a). "Isolation of a new vanadium-containing nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*." Biochemistry **25**(23): 7251-5.
- Hales, B. J., D. J. Langosch, et al. (1986b). "Isolation and characterization of a second nitrogenase Fe-protein from *Azotobacter vinelandii*." J Biol Chem **261**(32): 15301-6.
- Heath, E. and O. W. Howarth (1981). "Vanadium-51 and oxygen-17 nuclear magnetic resonance study of vanadate(V) equilibria and kinetics." J Chem Soc Dalton Trans, pp. 1105-1110.
- Highsmith, S. (1999). "Lever arm model of force generation by actin-myosin-ATP." Biochemistry **38**(31): 9791-7.
- Holmes, K. C., D. Popp, et al. (1990). "Atomic model of the actin filament." Nature **347**(6288): 44-9.
- Holmes, K. C. (1997). "The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction." Curr Biol **7**(2): R112-8.
- Howarth, O. W. and M. Jarold (1978). "Protonation of the decavanadate(6-) ion: a vanadium-51 nuclear magnetic resonance study." J Chem Soc Dalton 503-506.
- Huxley, H. E. (1969). "The mechanism of muscular contraction." Science **164**(886): 1356-65.
- Ishii, T. and I. Nakai (1995). "Biochemical significance of vanadium in a polychaete worm." In: *Metal Ions in Biological Systems* (Sigel and A. Sigel eds.), Vol. 31. Marcel Dekker, New York, pp. 491-510.
- Josephson, L. and L. C. Cantley, Jr. (1977). "Isolation of a potent (Na-K)ATPase inhibitor from striated muscle." Biochemistry **16**(21): 4572-8.

- Kabsch, W., H. G. Mannherz, et al. (1990). "Atomic structure of the actin:DNase I complex." Nature **347**(6288): 37-44.
- Kustin, K., G. C. MeLeod et al. (1983). "Vanadium and other metal ions in the physiological ecology of marine organisms." Struct Bonding **53**: 139-160.
- Lindquist, R. N., J. L. Lynn, Jr., et al. (1973). "Possible transition-state analogs for ribonuclease. The complexes of uridine with oxovanadium(IV) ion and vanadium(V) ion." J Am Chem Soc **95**(26): 8762-8.
- Lodish, H., D. Baltimore, et al. (1998) "Molecular Cell Biology." Scientific American Books, Inc.
- Lynn, R. W. and E. W. Taylor (1971). "Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin." Biochemistry **10**(25): 4617-24.
- Matsumoto, J. (1994). "Vanadate, molybdate and tungstate for orthomolecular medicine." Medical Hypothesis **43**: 177-182.
- Mornet, D., K. Ue, et al. (1984). "Proteolysis and the domain organization of myosin subfragment 1." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(3): 736-9.
- Mukherjee, B., B. Patra, et al. (2004). "Vanadium-an element of atypical biological significance." Toxicol Lett **150**(2): 135-43.
- Nechay, B. R. (1984). "Mechanisms of action of vanadium." Annu Rev Pharmacol Toxicol **24**: 501-24.
- Nriagu, J. O. (1998) "History occurrence, and uses of vanadium." In: Vanadium in the environment. Part 1: Chemistry and Biochemistry. (Nriagu, J. O. Ed), pp.1-24.
- Pettersson, L., B. Hedman et al. (1983). "Multicomponent polyanions.34.A potentiometric and ⁵¹V-NMR study of equilibria in the H⁺-HVO₄²⁻ system in 0,6 M-Na(Cl) medium covering the range 1 ≤ -lg[H⁺] ≤ 10." Chem Scripta **22**: 254-264.

- Pettersson, L., I. Andersson et al. (1985). "Multicomponent polyanions.37.A potentiometric and ^{51}V -NMR study of equilibria in the H^+ - HVO_4^{2-} system in 3.0 M- $\text{Na}(\text{ClO}_4)$ medium covering the range $1 \leq -\lg[\text{H}^+] \leq 10$." Chem Scripta **25**: 309-317.
- Plass, W. (1999). "Phosphate and vanadate in biological systems: chemical relatives or more?" Angew. Chem. **38**: 909-912.
- Pope, M. T. (1983). "Heteropoly and Isopoly Oxometalates." Springer-Verlag, New York, p.180.
- Pope, M. T. and A. Müller (Eds.), (1994). Polyoxometalates: From Platonic Solids to Anti-Retroviral Activity." kluwer Academic publishers, Dordrecht.
- Rayment, I., W. R. Rypniewski, et al. (1993a). "Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor." Science **261**(5117): 50-8.
- Rayment, I., H. M. Holden, et al. (1993b). "Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction." Science **261**(5117): 58-65.
- Rayment, I. (1996). "The structural basis of the myosin ATPase activity." J Biol Chem **271**(27): 15850-3.
- Rehder, D. (1991). "The bioinorganic chemistry of vanadium." Angew Chem Int Ed Eng **30**: 148-167.
- Rehder, D. and S. Jantzen (1998). "Structure, Function, and Models of Biogenic Vanadium Compounds." In: Vanadium in the environment. Part 1: Chemistry and Biochemistry. (Nriagu, J. O. Ed), pp.251-284.
- Rehder, D. (1999). "The coordination chemistry of vanadium as related to its biological functions." Coordination Chem Rev **182**: 297-322.
- Rehder, D. (2003). "Biological and medicinal aspects of vanadium." Inorg. Chem. Commun. **6**: 604-617.
- Robson, R. L., R. R. Eady et al. (1986). "The alternative nitrogenases of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme." Nature **322**: 388-390.

- Sakurai, H. and A. Tsuji (1998). "Antidiabetic action of vanadium complexes in animals: blood glucose normalizing effect, organ distribution of vanadium, and mechanisms for insulin-mimetic action." In: *Vanadium in the Environment. Part 2: Health Effects.* (Nriagu, J. O. Ed), pp.297-315.
- Sellers, J. R., H. V. Goodson, et al. (1996). "A myosin family reunion." *J Muscle Res Cell Motil* **17**(1): 7-22.
- Shechter, Y. (1990). "Perspective in diabetes: insulin-mimetic effects of vanadate. Possible implications for future treatments of diabetes." *Diabetes* **39**: 1-5.
- Shechter, Y, I. Goldwasser et al. (2003). "Historic perspective and recent developments on the insulin-like actions of vanadium; toward developing vanadium-based drugs for diabetes." *Coordination Chem Rev* **23**: 3-11.
- Sitprijja, V. and S. Eiam-Ong (1998). "Vanadium and Metabolic Problems" In: *Vanadium in the Environment. Part 2: Health Effects.* (Nriagu, J. O. Ed), pp.
- Stankiewicz, P. J., A. S. Tracey, et al. (1995). "Inhibition of phosphate-metabolizing enzymes by oxovanadium(V) complexes." *Met Ions Biol Syst* **31**: 287-324.
- Tracey, A. S., M. J. Gresser et al. (1988). "Vanadium (V) oxoanions – interactions of vanadate with methanol and methanol phosphate." *Inorg Chem* **27**: 157-161.
- Van Etten, R. L., P. P. Waymack et al. (1974). "Transition metal ion inhibition of enzyme-catalyzed phosphate ester displacement reaction." *J Am Chem Soc* **96**: 6782-6785.
- Vilter, H. (1995) "Vanadium-dependent haloperoxidases." In: *Metals Ions in Biological Systems* (Siegel, H. and A. Siegel eds.), Vol. 31. Marcel Dekker, New York, pp. 325-362.
- Walker, J. E., M. Saraste, et al. (1982). "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold." *Embo J* **1**(8): 945-51.

- Warrick, H. M. and J. A. Spudich (1987). "Myosin structure and function in cell motility." Annu Rev Cell Biol **3**: 379-421.
- Yamamoto, K. and T. Sekine (1980). "Substructure of myosin subfragment-1 as revealed by digestion with proteolytic enzymes." J Biochem (Tokyo) **87**(1): 219-26.
- Yount, R. G., D. Lawson, et al. (1995). "Is myosin a "back door" enzyme?" Biophys J **68**(4 Suppl): 44S-47S; discussion 47S-49S.
- Zaporowska, H. and A. Scibior (1998). "vanadium and its significance in animal cell metabolism." In: Vanadium in the Environment. Part 2: Health Effects. (Nriagu, J. O. Ed), pp.121-133.

CAPÍTULO II

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MIOSINA E ACTINA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE COELHO

II.1 – Introdução

A oportunidade de estudar os eventos moleculares responsáveis pela contração muscular surgiu no início dos anos 40 quando Banga e Szent-Györgyi [1941] e Straub [1942], isolaram a miosina e a actina a partir de extractos de músculo esquelético de coelho. Historicamente, os fisiologistas começaram por trabalhar com o músculo por inteiro progredindo depois para medições mecânicas e bioquímicas de fibras musculares e miofibrilas, até que o desenvolvimento de ensaios de contração muscular *in vitro* levou à utilização das proteínas filamentosas individualmente. A miosina (55%) e a actina (25%) constituem cerca de 80% das proteínas estruturais das miofibrilas musculares [Bagshaw, 1982], pelo que se encontram disponíveis em largas quantidades para uma adequada caracterização biofísica e bioquímica.

II.1.1 – Preparação de miosina e seus fragmentos

A maioria dos procedimentos de purificação de miosina retira vantagem da capacidade desta proteína formar filamentos a baixa força iónica e, no entanto, ser solúvel a elevada força iónica. O método consiste essencialmente na separação da miosina através de processos de “salting in” e “salting out” por elevação e diminuição da força iónica, respectivamente. Uma vez que a solubilidade da proteína a uma força iónica elevada, e a

pH fisiológico, resulta de interacções polares com o solvente aquoso, de interacções iónicas com os sais presentes em solução e, em última análise, de forças electrostáticas repulsivas entre moléculas igualmente carregadas [Scopes, 1982], quando a força iónica é diminuída, por adição de água, as forças repulsivas tornam-se insuficientes provocando a precipitação da proteína. A insolubilidade da miosina é conferida pela região da “cauda” (Figura I.2), que é insolúvel a concentrações salinas próximas das fisiológicas, contrariamente à cabeça da miosina ou subfragmento-1 (S1) (Figura I.3) que é solúvel em água. O tamanho (470 kDa) bem como a relativa insolubilidade da molécula de miosina levam os investigadores, na maioria dos casos, a optar por fragmentos proteolíticos que retenham as propriedades da molécula parental e que sejam de mais fácil análise enzimática e físico-química. Um local típico de clivagem na miosina ocorre a cerca de 130 kDa do N-terminal e produz dois fragmentos, a meromiosina pesada (HMM) e a meromiosina leve (LMM) que podem ser separadas por diálise a baixas forças iónicas. O fragmento HMM pode, por sua vez, ser dividido por proteólise da cadeia pesada dando origem ao subfragmento-1 (S1) e ao subfragmento-2 (S2). O S1 é enzimaticamente activo e pode estar associado quer com as duas cadeias leves, ou unicamente com as cadeias leves essenciais dependendo da escolha da protease e das condições de digestão [Weeds e Taylor, 1975; Weeds e Pope, 1977]. Os fragmentos HMM e o S1 são usados extensivamente em estudos cinéticos e de ligação à actina onde a sua solubilidade a baixa força iónica simplifica tanto o desenho experimental bem como a subsequente interpretação dos dados. No presente trabalho, a necessidade de se realizarem estudos a baixa força iónica, nomeadamente, estudos com o complexo actomiosina, conduziram-nos a optar preferencialmente pelo subfragmento-1 da miosina. Estes métodos de preparação são úteis e relevantes apenas se as características estruturais e enzimáticas da miosina nativa forem preservadas nos subfragmentos. Uma forma de avaliação da integridade dos

subfragmentos é a medição da actividade ATPásica da miosina em condições definidas, tal como se descreve seguidamente.

II.1.2 – Análise enzimática da miosina e dos seus subfragmentos

A actividade ATPásica da miosina e dos seus fragmentos, na presença de Ca^{2+} , K^+ /EDTA, ou actina, fornece um bom critério para avaliar a qualidade da preparação desta proteína. Nestas experiências, deve-se ter o cuidado de especificar as condições sob os quais estes ensaios são realizados, uma vez que, a concentração salina, o valor de pH, e a temperatura influenciam a velocidade de hidrólise de ATP. Adicionalmente, a demonstração de que dois grupos sulfidrilo (SH1 e SH2) se encontram estreitamente envolvidos na actividade ATPásica da miosina [Sekine *et al.*, 1962; Yamaguchi e Sekine, 1966], torna importante a sua preservação no estado reduzido. Assim, a actividade ATPásica dependente de Ca^{2+} é aumentada e a dependente de K^+ é diminuída quando o SH1 é oxidado, enquanto que a oxidação do segundo grupo sulfidrilo, SH2, resulta numa perda completa de ambas as actividades [Margossian e Lowey, 1982; Reisler, 1982]. Desta forma, as actividades da Ca^{2+} e da K^+ /EDTA – ATPase dão uma boa indicação do estado de oxidação destes grupos sulfidrilo. Durante os procedimentos de preparação, deve-se ter o cuidado de manter estes grupos sulfidrilo num estado reduzido, pela inclusão de agentes redutores.

Apesar das actividades da Ca^{2+} e da K^+ /EDTA- ATPase serem bons indicadores *in vitro* da actividade da miosina, apenas a actividade da Mg^{2+} -ATPase estimulada por actina tem significado fisiológico. Um problema encontrado na análise cinética da Mg^{2+} -ATPase estimulada por actina concerne a elevada concentração proteica do músculo (cerca de 100 mg/ml de actomiosina) a qual não pode ser atingida em solução [Bagshaw, 1982]. Uma forma de superar esta questão é medir a actividade a baixas forças iónicas (0.05 M) de forma a fortalecer a interacção da actina com a miosina [Margossian e Lowey, 1982].

II.1.3 – Preparação de actina

A maioria dos procedimentos de purificação de actina baseia-se no método de Feuer *et al.* [1948] desenvolvido nos finais dos anos 40. Neste método, uma grande parte das proteínas solúveis é removida por homogeneização do músculo e extraída extensivamente em tampões de elevada, seguida de baixa força iónica. As proteínas restantes são então desidratadas com acetona para formar o que é conhecido por “pó de acetona”. Este passo de desidratação serve tanto para desnaturar outras proteínas que não a actina, bem como permitir o armazenamento do “pó de acetona” quase indefinidamente. Este é posteriormente extraído com tampões de baixa força iónica contendo ATP, de forma a dissociar alguma miosina restante e a conservar a ligação de nucleótido à actina (que desnatura na sua ausência), e também iões de Ca^{2+} de forma a remover qualquer ião de Mg^{2+} ligado. O monómero de actina (G-actina) contendo Ca^{2+} -ATP tem uma concentração crítica (C_c , concentração acima da qual a actina se associa em filamentos) elevada (cerca de 6 mg/ml) e por isso pode ser extraído a elevadas concentrações sem polimerizar. O monómero extraído é então polimerizado pela adição de KCl e Mg^{2+} removendo-se o Ca^{2+} . O polímero (F-actina) fica livre de tropomiosina, uma proteína associada ao filamento de actina, pelo aumento da concentração de KCl e recolhido por centrifugação.

A G-actina é composta por uma única cadeia polipeptídica (42 kDa) de sequência conhecida, que liga Mg^{2+} e ATP reversivelmente. Durante a polimerização, é hidrolizado ATP para originar uma molécula de ADP fortemente ligada por subunidade, apesar desta reacção não ser obrigatória para a formação de F-actina. A forma funcional de actina nas células musculares parece ser a de filamento. A F-actina é um polímero não-covalente que se associa espontaneamente *in vitro* sob as condições iónicas que se crê existirem nas células, isto é, cerca de 50-100 mM KCl, pH 7.0-7.1 e 1 mM Mg. A concentração crítica nas condições de purificação (na presença de cálcio e a baixa força iónica) é de cerca de 1 mM, enquanto que sob condições fisiológicas diminui para cerca de 0,1 μM .

II.2 – Materiais e Métodos

II.2.1 – Isolamento e purificação de miosina

A miosina foi isolada a partir de músculo esquelético de coelho, de acordo com o método descrito por Perrie e Perry [1970]. Todo o isolamento foi realizado a 4°C, tendo-se o cuidado de refrigerar previamente todas as soluções e materiais utilizados, procedendo-se do modo que se passa a descrever seguidamente. O animal é primeiramente sacrificado através do corte da artéria jugular, esfolado e colocado num recipiente com gelo. Depois de ser removido o tecido conjuntivo que envolve o tecido muscular, retiram-se cerca de 200 g dos músculos dorsais e músculos brancos das pernas. Os músculos são triturados e extraídos durante 15 minutos em três volumes de uma solução de elevada força iónica constituída por 0,6 M KCl, 10 mM β -mercaptoetanol, pH 6,5 (tampão A). Esta suspensão de músculo é centrifugada a 2000 x g durante 15 minutos e o sobrenadante filtrado em lã de vidro. Dilui-se esta solução em 14 volumes de água destilada contendo 10 mM β -mercaptoetanol e após uma espera entre 3 a 4 horas para que se conclua a precipitação, remove-se o sobrenadante. O precipitado que se forma é concentrado por centrifugação a 2000 x g durante 15 minutos, ressuspenso no tampão A, e adiciona-se solução tampão B (2 M KCl, 100 mM HEPES, pH 7,0) de forma a trazer a força iónica a 0,6 M. Esta solução é então bem homogeneizado num “potter”. Este passo de precipitação é repetido após adição de água destilada até baixar a concentração de KCl para 0,04 M, tal como anteriormente. No total, procede-se a três passos de precipitação sucessivos, após os quais o sedimento contendo miosina fica ressuspenso numa solução de 0,5 M KCl, 25 mM HEPES, pH 7,0. Esta suspensão é ultracentrifugada a 110.000 x g durante 1 hora para remover agregados de actomiosina e proteína desnaturada, e o sobrenadante filtrado em lã de vidro para remoção de agregados lipídicos que estejam em suspensão. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford [1976] usando-se albumina de soro bovino como padrão e uma massa molecular de 500 kDa. A solução de miosina assim preparada pode

ser armazenada a -20 °C contendo 50% glicerol e 2,5 µM PMSF por um período superior a 1 ano.

II.2.2 – Preparação do subfragmento-1 de miosina

O subfragmento-1 (S1) foi obtido por digestão quimotriptica da miosina pelo procedimento originalmente descrito por Weeds e Taylor [1975] e posteriormente adoptado por Margossian e Lowey [1982]. Desta forma, a miosina de preferência acabada de preparar e sem conter glicerol é dializada “overnight” contra uma solução tampão contendo 0,12 M KCl, 1 mM EDTA e 25 mM Hepes, pH 7,0. A inclusão de EDTA é essencial, uma vez que a substituição de EDTA por MgCl₂ resulta na produção de HMM em vez de S1. A suspensão de miosina é então equilibrada à temperatura ambiente e digerida por adição de α-quimotripsina para uma concentração final de 0,05 mg/ml. A reacção procede por 30 minutos após o qual é parada por adição de 0,2 mM PMSF. Seguidamente, os produtos de digestão insolúveis são separados do S1 por ultracentrifugação a 110.000 x g durante 1,5 h. A concentração de proteína no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford [1976] usando-se albumina de soro bovino como padrão ou por espectrofotometria, usando-se um coeficiente de extinção de $1\%E_{280} = 7,5 \text{ cm}^{-1}$ e uma massa molecular de 115 kDa. O S1 é então armazenado em 10% de sacarose e 2 mM β-mercaptoetanol a -80 °C.

II.2.3 – Isolamento de actina

O isolamento de actina a partir de músculo esquelético foi realizado em dois passos, tal como descrito por Pardee e Spudich [1982]. Inicialmente, a partir do músculo, obteve-se um resíduo seco designado por “pó de acetona” e em seguida a actina foi extraída a partir deste resíduo, na forma de monómeros de G-actina, para depois se promover a polimerização da mesma, obtendo-se a actina na forma de F-actina.

II.2.3.1 – Obtenção de “pó de acetona”

Após obtenção do músculo tal como se descreve anteriormente para o isolamento de miosina, este é pesado, triturado e extraído (sempre a 4 °C, salvo indicação em contrário) em 3 volumes de uma solução tampão contendo 0,1 M KCl, 0,15 M KH₂PO₄ e 0,5 M K₂HPO₄, pH 6,5. Esta suspensão mantida em agitação lenta durante 10 minutos, é em seguida centrifugada (10 minutos, 4000 x g), o sobrenadante decantado e o músculo novamente ressuspensão em 6 volumes (sempre em relação ao peso inicial do músculo) de uma solução de 0,05 M NaHCO₃ pH 8,2 durante 10 minutos, repetindo-se o procedimento anterior. Uma nova ressuspensão é efectuada, mas agora com 3 volumes de uma solução de 1 mM EDTA, pH 7,0, seguindo-se o mesmo processo 2 vezes com 6 volumes de H₂O destilada (de cada vez), mas agora apenas durante 5 minutos. Após estas lavagens, seguem-se 5 ressuspensões sucessivas com 3 volumes de uma solução de acetona, à temperatura ambiente, após as quais o resíduo de músculo é deixado a evaporar durante a noite. O resíduo seco é pesado e armazenado a -20 °C.

II.2.3.2 – Obtenção de F-actina

Por cada grama de “pó de acetona” são adicionados 20 ml de uma solução G, constituída por: 0,2 mM CaCl₂, 0,2 mM Na₂ATP, 0,5 mM β-mercaptoetanol, 0,005% NaN₃ e 2 mM Tris/HCl, pH 8,0. Esta suspensão é mexida lentamente durante 30 minutos (sempre a 4 °C) e filtrada com gaze esterilizada. Esta solução depois de filtrada, é centrifugada durante 30 minutos a 16.000 x g a 4 °C e em seguida decantada para uma proveta. Em seguida adiciona-se KCl sólido até uma concentração final de 50 mM, MgCl₂ até 2 mM e ATP até 1 mM de forma a promover a polimerização dos monómeros de actina. Esta adição é realizada com agitação contínua da solução e em seguida deixa-se polimerizar durante 2 h, à temperatura ambiente, sem agitação. Nesta fase do isolamento observa-se um aumento de viscosidade da solução, evidenciado pela presença de bolhas de ar. Seguidamente, a esta

solução previamente arrefecida a 4 °C é adicionado KCl sólido até uma concentração final de 0,6 M com agitação contínua durante 30 minutos, a 4 °C. A solução é então centrifugada a 80.000 x g durante 3 h, a 4 °C, após o qual se obtém um sedimento transparente e gelatinoso. O sedimento de F-actina é lavado com 1 ml de tampão G para remoção de qualquer proteína contaminante e ressuspenso em 3 ml de tampão G por cada grama de “pó de acetona” inicialmente extraído. Após homogeneização num “potter”, esta suspensão é dializada a 4 °C, contra 1 L de solução tampão G, durante aproximadamente 12 h com rotação contínua e mudança de tampão de 2 a 3 vezes. A actina dializada é centrifugada a 80.000 x g durante 3 h, a 4 °C e a concentração de proteína na forma de G-actina é obtida por medição do valor de absorvância a 290 nm ($^{1\%}E_{290} = 11,5 \text{ cm}^{-1}$) do sobrenadante, considerando-se uma massa molecular de 42 kDa. A G-actina é então polimerizada por adição de KCl até uma concentração final de 50 mM, MgCl_2 até 1 mM e ATP até 1 mM. A F-actina assim obtida é armazenada com 0,02 % NaN_3 , a 4 °C podendo ser utilizada durante cerca de 1 mês desde a sua preparação.

II.2.4 – Análise qualitativa e estado de pureza do material isolado

O estado de pureza das preparações de miosina e de actina foi analisado por electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Neste método, as proteínas são separadas de acordo com o seu peso molecular. O detergente aniónico dodecil sulfato de sódio (SDS), liga-se ao longo da cadeia polipeptídica numa estequiometria de 1 mol SDS para 2 de resíduos de aminoácidos. Desta forma, na presença de SDS, as proteínas desnaturadas adquirem uma densidade de carga negativa, q , independente do peso molecular. Quando sujeitas a um campo eléctrico, E , estas partículas carregadas negativamente movem-se para o ânodo a uma velocidade, v (determinada pela expressão II.1), que depende do coeficiente de fricção, f , à passagem por entre as malhas do gel:

$$E \cdot q = v \cdot f \quad \text{[II.1]}$$

A mobilidade, U , é definida como a velocidade por unidade de campo. Logo, U , é inversamente proporcional ao coeficiente de fricção e relaciona-se essencialmente com o tamanho da molécula uma vez que E e q são constantes. Assim, quanto maior for o peso molecular da proteína, maior a porção polipeptídica em deslocamento sob a acção do campo eléctrico, maior o coeficiente de fricção a que está sujeito e menor a mobilidade. Obtêm-se boas relações lineares entre o logaritmo do peso molecular das proteínas e as respectivas mobilidades, podendo-se estimar o peso molecular de uma determinada proteína por interpolação da sua mobilidade comparativamente a uma curva padrão.

A electroforese foi realizado de acordo com o método de Laemmli [1970] num gel de poliacrilamida de 12% em 25 mM Tris, 192 mM glicina, pH 8,3 contendo 0,1% SDS. A solução de desnaturação das proteínas contem 0,32 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4 M β -mercaptoetanol, 8% SDS (m/v), 15% (v/v) glicerol e 0,1% azul bromofenol. Em todas as electroforeses foram usados padrões de alto e baixo peso molecular adquiridos à empresa Sigma. Decorrida a electroforese, o gel é corado com uma solução corante contendo 0,1% coomassie, 45% metanol e 10% ácido acético durante aproximadamente 1h e descorado "overnight" numa solução de metanol/ácido acético/H₂O numa proporção de 1:1:8.

II.2.5 – Análise da actividade enzimática

A actividade ATPásica da miosina e do S1 foi medida na presença de Ca²⁺ e K⁺/EDTA usando-se um método descontínuo (tempo fixo) e na presença de Mg²⁺ usando-se um método contínuo (cinética). No primeiro método, são retiradas amostras do meio de reacção ao longo do tempo e analisadas pela técnica adequada, enquanto que no segundo método uma mudança de propriedade, como por exemplo, a absorvância, é monitorizada continuamente no meio de reacção.

II.2.5.1 – Ca^{2+} - e K^+ /EDTA - ATPase

As actividades da Ca^{2+} - e da K^+ /EDTA-ATPase foram medidas pela determinação do fosfato inorgânico libertado aquando da hidrólise de ATP, segundo o método colorimétrico descrito por Taussky e Shorr [1953]. Este método consiste na reacção do fosfato inorgânico com o molibdato de amónio numa solução ácida para formar o ácido fosfomolibdico. A adição de um agente redutor reduz o molibdénio a fosfomolibdato que forma um complexo de cor azulada que absorve a 660 nm.

Os ensaios foram realizados a 25 °C em 50 mM Tris/HCl (pH 7,9), 2,5 mM ATP e em 0,23 M KCl e 2,5 mM CaCl_2 para a Ca^{2+} -ATPase ou 0,6 M KCl e 1 mM EDTA no caso da K^+ /EDTA-ATPase. A reacção de hidrólise foi iniciada pela adição da enzima numa concentração final de 0,1 mg/ml e foram retiradas alíquotas de 0,15 ml do meio de reacção, nos tempos desejados, para eppendorfs contendo 0,15 ml 10% TCA (massa/volume). A proteína assim desnaturada, foi sedimentada por centrifugação a 1500 x g durante 10 minutos e em seguida retirou-se ao sobrenadante 0,2 ml para análise posterior do conteúdo em fosfato inorgânico, ao qual foi adicionado 1,58 ml H_2O , 0,2 ml de uma solução contendo 5 N H_2SO_4 e 2,5 % molibdato de amónio e 20 μl do reagente redutor (5 mg ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, 30 mg bisulfito de sódio, 30 mg sulfito sódio e 2,6 ml H_2O). Os valores de absorvância foram obtidos a 660 nm, 10 minutos após adição do reagente redutor, e as concentrações calculadas por interpolação de uma curva padrão usando-se fosfato di-potássio (K_2HPO_4) como padrão.

II.2.5.2 – Mg^{2+} - ATPase

As actividades fisiológicas Mg^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase estimulada por actina foram medidas espectrofotometricamente, usando um sistema de enzimas acopladas baseado na interconversão de NAD^+ / NADH . Ambas as formas reduzida e oxidada destes dois nucleótidos absorvem a 260 nm, mas apenas a forma reduzida absorve a 340 nm. Neste

tipo de ensaios, a enzima a monitorizar está acoplada a uma outra que utilize o sistema NAD^+/NADH , através dos intermediários formados. No presente estudo, usou-se o ensaio de enzimas acopladas piruvato cinase/lactato desidrogenase [Bagshaw, 1982; Cuenda *et al.*, 1990] tal como se ilustra no seguinte esquema (Figura II.1).

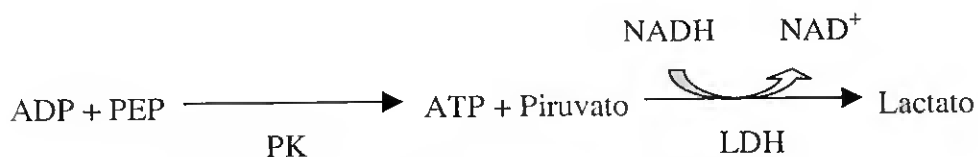


Figura II.1 – Esquema da reacção do método de enzimas acopladas piruvato cinase (PK)/lactato desidrogenase (LDH).

Uma vez que estas enzimas estão em excesso, a velocidade de conversão do NADH , monitorizada pela variação da absorvância a 340 nm, será limitada pela produção de ADP e P_i pela miosina ou pelo subfragmento-1. O ATP é regenerado e por isso a sua concentração inicial é sempre mantida. Este método é muito sensível, uma vez que o coeficiente de extinção molar do NADH a 340 nm é de $6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} = 6,2 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Isto significa que a conversão de 1 μmol de substrato/ml é indicado por uma variação em absorvância de 6,2 DO.

Os ensaios foram realizados a 25 °C, com a seguinte mistura de reacção: 20 mM HEPES (pH 7.0), 2,5 mM MgCl_2 , 0,42 mM fosfoenol piruvato (PEP), 0,375 mM NADH , 18 IU lactato desidrogenase, 18 IU piruvato cinase e 50 $\mu\text{g/ml}$ de miosina ou S1. A reacção é iniciada pela adição de 2 mM ATP à mistura de reacção e a actividade da Mg^{2+} -ATPase é obtida através do declive após subtração da linha de base correspondente à auto-oxidação do NADH . Para a medição da Mg^{2+} -ATPase da miosina estimulada por actina, adiciona-se posteriormente a F-actina e a actividade é obtida novamente por subtração da linha de base.

II.3 – Resultados e Discussão

II.3.1 – Análise qualitativa e estado de pureza do material isolado

A constituição e o grau de pureza do material isolado foram analisados por SDS-PAGE de amostras de preparações de miosina, S1 e actina. Adicionalmente, todo o processo de isolamento foi caracterizado pela análise do material que foi sendo desprezado ao longo das diversas etapas de isolamento. Foi escolhida uma concentração de acrilamida a 12% (tal como se descreve na secção II.2.4 dos Materiais e Métodos) por forma a permitir detectar, em simultâneo, componentes com pesos moleculares inferiores a 25 kDa e outros de alto peso molecular, nomeadamente a miosina de 205 kDa. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados nas Figuras II.2 e II.3 para as preparações de miosina / S1 e de “pó de acetona” / F-actina, respectivamente.

Começando por analisar a Figura II.2, nos poços d) e g) é bem patente a existência de duas bandas intensas que correspondem a uma massa molecular aparente de cerca de 205 e 95 kDa (valores obtidos por comparação com o padrão e calculados por interpolação de uma recta padrão, como descrito na secção II.2.4 dos Materiais e Métodos), identificadas como sendo as cadeias pesadas do monómero de miosina e do subfragmento-1, respectivamente [Margossian e Lowey, 1982]. Podemos ainda observar no poço d) as bandas relativas às três cadeias leves de miosina, nomeadamente a LC1 (22,5 kDa), LC2 (18,5 kDa) e LC3 (15,5 kDa). No caso do poço g), a cadeia leve LC2 não se encontra presente devido ao procedimento adoptado para a preparação do S1. A falta desta cadeia leve deve-se à inclusão de EDTA durante a digestão quimotríptica da miosina, e por isso o produto resultante desta preparação é muitas vezes designado de EDTA-S1 [Margossian e Lowey, 1982]. Outras bandas de menor intensidade poderão dever-se a fragmentos proteolíticos da miosina e S1 ou a contaminações menores tais como a proteína-C (135 kDa) na preparação de miosina, que para ser completamente removida necessita de um passo extra de purificação por cromatografia de troca iónica [Margossian e Lowy, 1982]. A

miosina e o S1 constituem, pois, a maioria (> 95 % medido por densitometria) do conteúdo proteico do material isolado. Nos poços b), c), e) e f) encontram-se algumas fracções extraídas durante o processo de isolamento de miosina e preparação do S1, mostrando componentes que não foram isolados, como por exemplo, fosforilases (~ 97 kDa), cinases (~ 80 kDa), actina (~ 40 kDa) e proteínas associadas ao filamento de actina tais como troponinas C (18 kDa); I (21 kDa); ou T (31 kDa) e tropomiosina (33 kDa) [Bagshaw, 1982; Ohtsuki *et al.*, 1986].

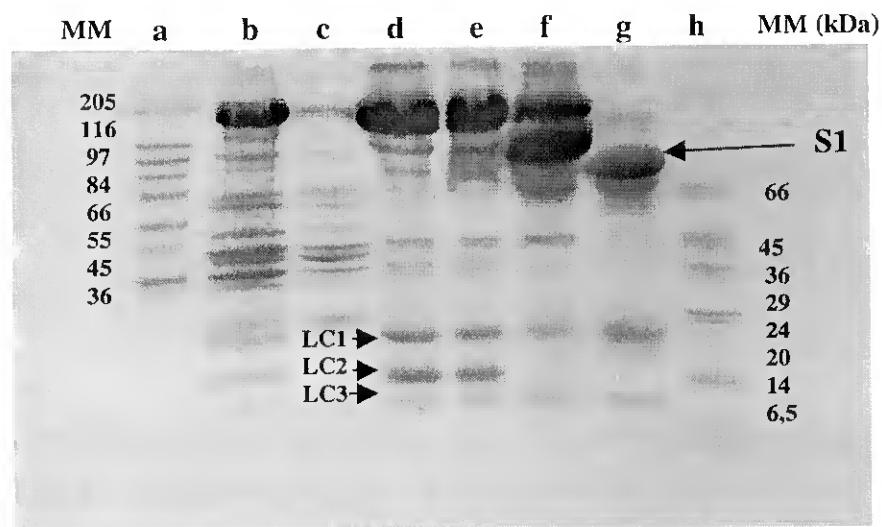


Figura II.2 – Electroforese em gel de poliacrilamida (12%) na presença de SDS (condições desnaturantes) mostrando a separação dos componentes de uma preparação de miosina (poço d) e subfragmento-1 (S1) de miosina (poço g). Os poços a) e h) correspondem aos marcadores de alto e baixo peso molecular, respectivamente; os poços b) e c) contêm duas fracções relativas a diferentes estágios do isolamento de miosina; e os poços e) e f) contêm fracções extraídas durante a preparação de S1. LC1 e LC3 referem-se às cadeias leves essenciais também designadas de A1 e A2, respectivamente; LC2 refere-se à cadeia leve regulatória usualmente designada por DTNB.

Na Figura II.3, relativa à preparação de actina, temos no gel A as fracções que foram sendo extraídas ao longo da preparação do “pó de acetona”. A avaliar pelas numerosas bandas, pode-se inferir que foi eliminada, neste passo de preparação da actina, uma boa parte das proteínas solúveis onde se inclui a miosina. No gel B da mesma figura, podemos observar nos poços b) e c) duas fracções relativas a diferentes estágios da preparação de

F-actina e nos poços d) e e), actina proveniente de duas preparações diferentes. Pela análise do gel verifica-se que as preparações de actina foram obtidas com um considerável grau de pureza e que proteínas normalmente associadas à actina como a tropomiosina (33 kDa) e α -actinina (95 kDa) [Ohtsuki *et al.*, 1986] foram eficazmente removidas durante o processo de isolamento da F-actina a partir do “pó de acetona”.

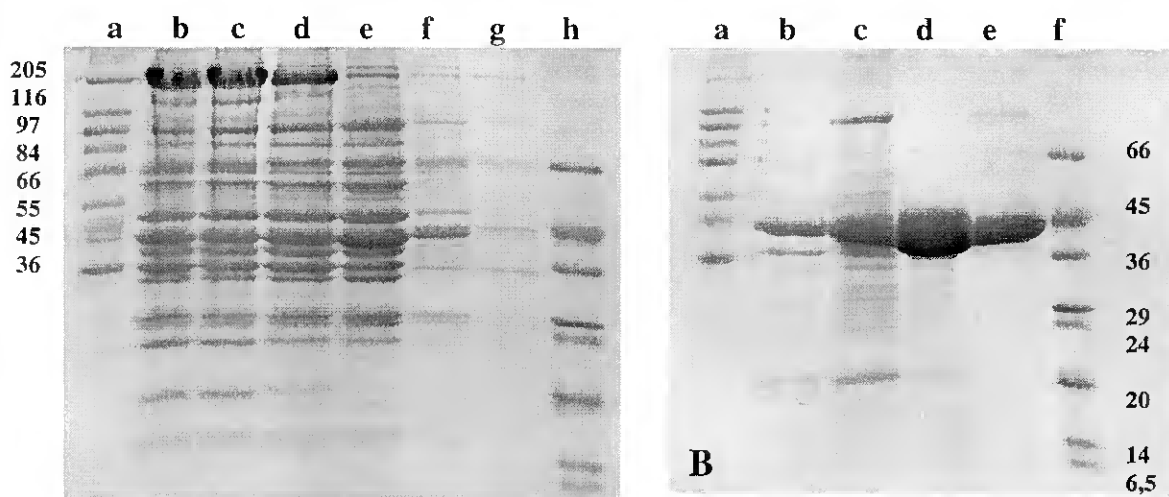


Figura II.3 – Electroforese em gel de poliacrilamida (12%) na presença de SDS. A) separação dos componentes de uma preparação de “pó de acetona”: os poços a) e h) contêm proteínas padrão de alto e baixo peso molecular, respectivamente; os poços b) a g) contêm fracções que foram sendo extraídas ao longo da preparação do “pó de acetona. B) separação dos componentes de uma preparação de F-actina: os poços a) e f) correspondem aos marcadores de alto e baixo peso molecular, respectivamente; os poços b) e c) contêm duas fracções relativas a diferentes estágios da preparação de F-actina; os poços d) e e) contêm actina proveniente de duas preparações diferentes.

II.3.2 – Análise da actividade enzimática

As actividades da Ca^{2+} - e da K^+ /EDTA-ATPase foram analisadas pela medição de fosfato inorgânico (Pi) produzido pela hidrólise de ATP, tal como se descreve na secção II.2.5.1.

As respectivas curvas de progressão do produto (Pi) em função do tempo encontram-se representadas na Figura II.4, de onde se podem obter as velocidades iniciais (v_0) pela tangente à curva que passe na origem.

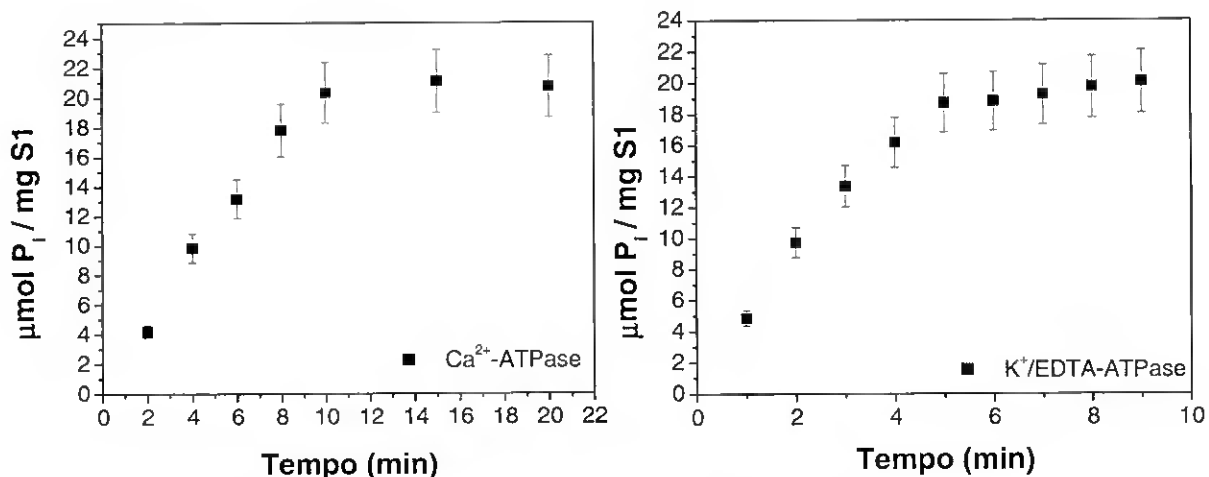


Figura II.4 – Curvas de progressão do produto em função do tempo para as actividades da Ca^{2+} - e K^+ /EDTA ATPase de miosina. Os ensaios foram realizados a 25 °C com 0,1 mg/ml de proteína e num meio de reacção contendo: 50 mM Tris/HCl (pH 7,9), 2,5 mM ATP e 0,23 M KCl e 2,5 mM CaCl_2 para a Ca^{2+} -ATPase ou 0,6 M KCl e 1 mM EDTA no caso da K^+ /EDTA-ATPase. As actividades foram medidas por determinação do fosfato inorgânico (PO_4^{3-}) libertado aquando da hidrólise do ATP pelo método de Fiske-Subarow como se descreve na secção II.2.5.1 dos Materiais e Métodos. Os dados representam a média de pelo menos três experiências diferentes.

Para simplificação, e uma vez que as condições de medição destas duas actividades se mantiveram sempre constantes, as velocidades iniciais foram determinadas por uma única medição do produto a um tempo fixo em que há a garantia de que se encontra ATP disponível para a reacção de hidrólise. Foram definidos os tempos de 5 e 3 minutos para a medição da Ca^{2+} - e da K^+ /EDTA-ATPase de miosina, respectivamente. As actividades médias para os diversos isolamentos de miosina e subfragmento-1 realizados ao longo deste trabalho encontram-se na Tabela II.1. Os valores obtidos são consistentes com valores reportados na literatura [Bagshaw, 1982; Margossian e Lowey, 1982; Polosukhina *et al.*, 2000] e a razão entre as actividades da K^+ /EDTA- e Ca^{2+} -ATPase (3,6 e 2,6 para a miosina e subfragmento-1, respectivamente) indica-nos que as proteínas se encontram com os grupo sulfidrilo mais reactivos (SH1 e SH2) preservados no estado reduzido, reflectindo assim a boa qualidade das preparações de proteína.

Tabela II.1 – Valores médios das actividades ATPásicas dependentes de Ca^{2+} e de K^+ /EDTA de miosina e de subfragmento-1 (S1).

	Ca^{2+} -ATPase		K^+ /EDTA-ATPase	
	$\mu\text{mol Pi}/\text{min.mg}$	s^{-1}	$\mu\text{mol Pi}/\text{min.mg}$	s^{-1}
Miosina	$0,6 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,6$	$2,1 \pm 0,5$	$14,1 \pm 3,4$
S1	$1,5 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,8$	$6,6 \pm 1,5$

No que diz respeito às actividade da Mg^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase estimulada por actina, estas foram determinadas pelo declive da variação de absorvância a 340 nm (relativo à oxidação de NADH) em função do tempo através do sistema de enzimas acopladas como se descreve na secção II.2.5.2 dos Materiais e Métodos. Para caracterizar a actividade ATPásica do sistema actomiosina nas condições de reacção utilizadas no presente trabalho foi realizado um estudo prévio da dependência da actividade da Mg^{2+} -ATPase do subfragmento-1 de miosina com a concentração de actina para uma concentração fixa de ATP (2mM) (Figura II.5). Em concordância com o descrito na literatura [Bagshaw, 1982; Eisenberg e Hill, 1985], a actina tem um efeito acentuado na actividade basal da Mg^{2+} -ATPase ($0,11 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$) estimulando-a cerca de 70 vezes para a concentração de actina máxima testada. Assumindo uma cinética de Michaelis-Menten determinou-se um K_m aparente de $5,0 \pm 0,8 \mu\text{M}$ e um V_{max} de $7,6 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$. Estes valores estão próximos dos valores reportados na literatura [Bagshaw, 1982; Eisenberg e Hill, 1985; Highsmith, 1997] e discordâncias que existam poderão dever-se à utilização de diferentes condições de reacção nos ensaios, uma vez que a força iónica, o valor de pH e a temperatura influenciam a velocidade de hidrólise de ATP pela miosina [Margossian e Lowey, 1982].

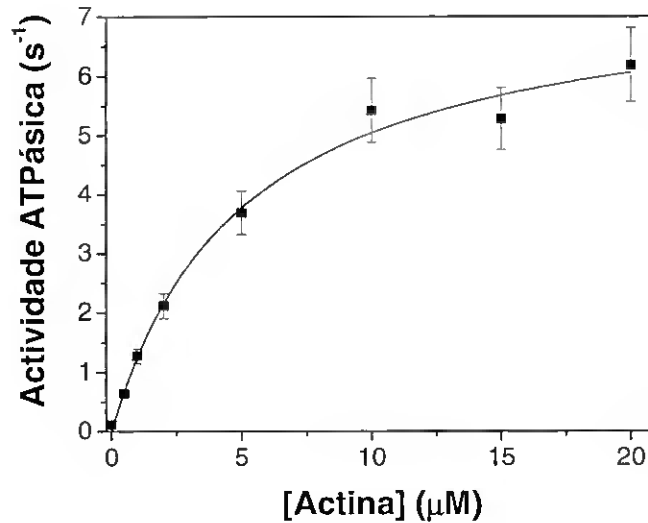


Figura II.5 – Actividade ATPásica do subfragmento-1 de miosina em função da concentração de actina (dada como concentração dos monómeros de actina presentes no filamento de actina). A F-actina (0,5, 1, 2, 5, 10, 15 e 20 μM) foi adicionada à mistura de reacção contendo 20 mM HEPES (pH 7.0), 2,5 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 0,42 mM fosfoenol piruvato (PEP), 0,375 mM NADH, 18 IU lactato desidrogenase, 18 IU piruvato cinase e 50 μg/ml (0,45 μM) S1 e a actividade foi medida a 25°C tal como se descreve na secção II.2.5.2. dos Materiais e Métodos. Os dados foram ajustados à equação de Michaelis-Menten usando o programa Origin^{5.0} para a determinação dos valores de K_m ($5,0 \pm 0,8 \mu\text{M}$) e V_{max} ($7,6 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$) e representam a média de experiências em triplicado.

II.4 – Referências Bibliográficas

- Bagshaw, C. R. (1982). "Muscle Contraction. Outline studies in biology." Chapman and Hall Ltd, New York.
- Banga, I. and A. Szent-Gyorgyi (1941). Studies from the Inst. Med. Chem., Univ. Szeged 1, 5.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Cuenda, A., F. Henao, et al. (1990). "Distances between functional sites of the Ca^{2+} + Mg^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum using Co^{2+} as a spectroscopic ruler." Eur J Biochem **194**(2): 663-70.
- Eisenberg, E. and T. L. Hill (1985). "Muscle contraction and free energy transduction in biological systems." Science **227**(4690): 999-1006.
- Feuer, G., F. Molnar, et al. (1948) Hung Acta Physiol **1**, 150.
- Highsmith, S. (1997). "Myosin regulatory light chain and nucleotide modulation of actin binding site electric charge." Biochemistry **36**(8): 2010-6.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4." Nature **227**: 680-85.
- Margossian, S. S. and S. Lowey (1982). "Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle." Methods Enzymol **85 Pt B**: 55-71.
- Ohtsuki, I., K. Maruyama, et al. (1986). "Regulatory and cytoskeletal proteins of vertebrate skeletal muscle." Adv Prot Chem **38**: 1-67.
- Pardee, J. D. and J. A. Spudich (1982). "Purification of muscle actin." Methods Enzymol **85**(Pt B): 164-81.
- Perrie, W. T. and S. V. Perry (1970). "An electrophoretic study of the low-molecular-weight components of myosin." Biochem J **119**(1): 31-8.

- Polosukhina, K., D. Eden, et al. (2000). "CaATP as a substrate to investigate the myosin lever arm hypothesis of force generation." Biophys J **78**(3): 1474-81.
- Reisler, E. (1982). "Sulfhydryl modification and labeling of myosin." Methods Enzymol **85 Pt B**: 84-93.
- Sekine, T., L. M. Barnett, et al. (1962). "The active site of myosin adenosine triphosphatase. I. Localization of one of the sulfhydryl groups." J Biol Chem **237**: 2769-72.
- Scopes, R. K. (1982). "Protein purification. Principles and practice." Springer Advanced Texts in Chemistry, ed. C. R. Cantor (Springer-Verlag New York Inc.).
- Straub, F.B. (1942) Studies from the Inst. Med. Chem., Univ. Szeged 2, 3.
- Taussky, H. H. and E. Shorr (1953). "A microcalorimetric method for the determination of inorganic phosphorous." J Biol Chem **202**: 675-85.
- Weeds, A. G. and R. S. Taylor (1975). "Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin." Nature **257**(5521): 54-6.
- Weeds, A. G. and B. Pope (1977). "Studies on the chymotryptic digestion of myosin. Effects of divalent cations on proteolytic susceptibility." J Mol Biol **111**(2): 129-57.
- Yamaguchi, M. and T. Sekine (1966). "Sulfhydryl groups involved in the active site of myosin A adenosine triphosphatase. I. Specific blocking of the SH group responsible for the inhibitory phase in "B phasic response" of the catalytic activity." J Biochem (Tokyo) **59**(1): 24-33.

CAPÍTULO III

INTERACÇÃO DE OLIGÓMEROS DE VANADATO COM MIOSINA: ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE ^{51}V -RMN

III.1 – Introdução

O vanádio, particularmente no estado de oxidação +5 (vanadato), apresenta uma química em solução excepcionalmente complexa, na medida em que não só vários equilíbrios de protonação existem como também podem ocorrer reacções redox e de oligomerização dependendo de outros compostos presentes em solução. Portanto, a análise correcta dos efeitos promovidos pelo vanadato em sistemas biológicos, nomeadamente no sistema contráctil actomiosina, implica a identificação prévia das espécies oligoméricas presentes no meio de reacção e das interacções a que estão sujeitas.

Um método atractivo que permite detectar por um lado, as espécies de vanadato presentes em solução e por outro, as interacções dessas espécies com o sistema em estudo, isto é, a formação de complexos de vanadato, é a espectroscopia de ressonância magnética nuclear do isótopo 51 de vanádio (^{51}V -RMN). A combinação de análises por RMN com estudos cinéticos tem permitido correlacionar assim os efeitos promovidos pelas soluções de vanadato com as diferentes espécies que ocorrem em solução e, adicionalmente, identificar as espécies de vanadato putativamente envolvidas na interacção com as proteínas.

III.1.1 – Oxovanadatos em soluções aquosas

Uma solução aquosa de vanadato contém uma série de espécies iônicas de oxovanádio (+5) cuja relativa abundância depende da concentração, pH, força iônica, temperatura e presença de outras substâncias [Heath e Howarth, 1981; Petterson *et al.*, 1985; Pope, 1983; Rehder, 1991]. Em condições neutras e na gama de concentrações mais frequentemente empregues em estudos bioquímicos (μM a mM), as espécies de vanadato predominantes são o monómero (V_1), o dímero (V_2), o tetrâmero (V_4) e o pentâmero (V_5). Estas espécies em solução atingem o equilíbrio muito rapidamente uma vez que a troca de átomos de vanádio e de oxigénio se dá numa escala temporal de milisegundos [Crans *et al.*, 1990].

O vanadato monomérico, vulgarmente designado de vanadato, tem 3 estados de protonação diferentes (HVO_4^{2-} , H_2VO_4^- e H_3VO_4) que se formam por protonação do ortovanadato, VO_4^{3-} . A pH neutro e na maioria das condições ambientais o monómero existe essencialmente como H_2VO_4^- . O vanadato monomérico pode oligomerizar para originar o dímero ($\text{H}_3\text{V}_2\text{O}_7^-$), o tetramero cíclico ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$) e por último o pentâmero cíclico ($\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$) [Crans *et al.*, 1990].

O termo “metavanadato” é habitualmente usado para descrever a mistura incolor de oxovanadatos em solução aquosa, com a forma empírica VO_3^- , um nome que tem origem na analogia ao metafosfato (PO_3^-) [Pope, 1983]. Após ajuste do pH, soluções contendo a mesma mistura de oxovanadatos (metavanadatos) podem ser obtidas por dissolução de metavanadato, na forma de NaVO_3 ou NH_4VO_3 , ou por dissolução de ortovanadato, na forma de Na_3VO_4 .

Para além dos metavanadatos, outros oxovanadatos podem ser formados, alguns dos quais estão limitados a concentrações e condições de pH específicas. Alguns derivados que se formam em concentrações muito baixas incluem o trimero e o tetrâmero lineares que foram observados a valores de pH ligeiramente alcalinos ou o hexâmero, que foi reportado a concentrações mais elevadas de vanadato [Howarth, 1990]. Sob condições

ácidas ($\text{pH} < 6$) forma-se o decâmero cuja solução pode apresentar uma cor amarela, laranja ou vermelha, dependendo da concentração da espécie. Apesar de ser termodinamicamente instável a pH neutro ou básico, o vanadato decamérico permanece intacto a $\text{pH} \geq 7$ por períodos de tempo limitado (até 2 dias), pois contrariamente aos oxovanadatos lábeis nas soluções de metavanadato, a sua velocidade de hidrólise é lenta [Pope, 1983].

III.1.2 – Interacção de vanadatos com ligandos biogénicos

A maioria dos sistemas biológicos é sensível a variações de pH, que por isso deverá ser cuidadosamente controlado [Scopes, 1982]. O pH é muitas vezes mantido constante por adição de um tampão. Em estudos com vanadato, a adição de um tampão pode ser problemática uma vez que se demonstrou que o vanadato interacciona com diversos tampões [Crans, 1994]. Para além disso, é comum a adição de determinados compostos às preparações de enzimas, que eventualmente poderão mascarar o efeito de vanádio no sistema em estudo. Nesse sentido, se as condições de reacção não forem adequadamente controladas e caracterizadas, os resultados observados podem ser devidos a artefactos e por isso irreproduzíveis.

Em geral, o melhor tampão para estudar a química do vanadato e os seus efeitos em reacções enzimáticas que não envolvam química redox é, o HEPES (ácido [N-2-hidroxietil] piperazina-N'-2-etano sulfónico) [Crans *et al.*, 1989]. Este tampão não interacciona de um modo significativo com os vanadatos e parece não afectar a estabilidade dos complexos formados em solução aquosa. Quando o tampão HEPES não é compatível com o sistema enzimático, o tampão TRIS (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol) pode ser apropriado para reacções químicas e biológicas, desde que usado para concentrações baixas. Esta conclusão é baseada no facto de que uma solução contendo 20 mM TRIS e 1 mM vanadato irá conter a pH neutro aproximadamente 0,01 mM do complexo vanadato-TRIS [Tracey e

Gresser, 1982]. Outros tampões como o TAPS (ácido N-tris[hidroximetil]metil-3-aminopropano sulfónico), Mes (ácido 2-[N-morfolino] etanosulfónico), Pipes (piperazina-N,N'-bis[ácido 2-etanosulfónico]) ou acetato podem ser usados em estudos com vanadatos ainda que estes tampões formem complexos com vanadato para elevadas concentrações [Crans, 1994]. Quando a interacção de vanadatos com enzimas é monitorizada pela reacção redox NADH/NAD ou NADPH/NADP, o imidazole é o tampão de escolha já que os tampões Hepes ou Tris suportam a reacção química entre o vanadato e os cofactores NADH ou NADPH [Vyskocil *et al.*, 1980]. Apesar da reacção ser lenta, a produção de vanádio (+4) introduz mais um derivado do vanádio que pode interagir com a enzima. Os tampões que devem ser evitados incluem trietanolamina, tricina (N-tris[hidroximetil]metil-glicina), bicina (N,N-bis[2-hidroxi-etil]glicina), fosfato, citrato e glicilglicina [Crans, 1994]. Todos estes tampões interagem fortemente com os vanadatos originando complexos estáveis e como tal, soluções de vanadato contendo estes ligandos irão conter concentrações insignificantes de vanadato livre para interagir com a proteína.

Por outro lado, também as preparações proteicas contêm por vezes aditivos de forma a aumentar a estabilidade das proteínas [Scopes, 1982]. Compostos como EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e citrato são muitas vezes adicionados para protecção contra metais pesados e os seus efeitos destrutivos; compostos como DTT (ditiotreitól) ou β -mercaptoetanol são adicionados para manter um ambiente redutor e prevenir a oxidação das proteínas; ou ainda compostos como glicerol ou sacarose são adicionados para preservar as proteínas em congelação. O EDTA forma um complexo 1:1 muito estável com o vanadato apesar de serem ambos aniões. O complexo foi reportado como um complexo entre o anião EDTA e o catião VO_2^+ e forma-se para concentrações na ordem dos μM de ligando e de vanadato [Crans, 1994]. Desta forma, deve-se usar preferencialmente substitutos do EDTA, tais como EGTA (ácido etilenoglicol-bis[β -aminoetil eter]N,N,N',N'-tetracético) que são menos efectivos na complexação com o vanadato

[Crans *et al.*, 1989]. Por sua vez, o DTT reduz rapidamente o vanadato ao catião vanadilo. Embora menos eficaz na redução do vanadato, o β -mercaptoetanol também é capaz de cumprir esta tarefa, pelo que deverão sempre que possível ser evitados os tiois como componentes dos meios de reacção [Crans, 1994]. Demonstrou-se ainda que glicerol [Crans, 1994] e sacarose [Aureliano e Madeira, 1998] formam complexos com vanadatos pelo que deverão ser evitados nos ensaios enzimáticos.

Em suma, tendo em conta que os sistemas biológicos em geral demonstram propriedades e actividades diferentes consoante os tampões e aditivos utilizados, não é possível seleccionar um meio de ensaio ideal para todos os sistemas, pelo que deverá ser escolhido aquele que melhor se adequa ao sistema em particular e que interactue o mínimo possível com vanadatos.

III.1.3 – Utilização de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/vísivel (UV/VIS) na caracterização de soluções de vanadato

As técnicas associadas às regiões ultravioleta e visível do espectro electromagnético são provavelmente as mais frequentemente utilizadas, tanto no trabalho analítico de rotina como na investigação bioquímica, e baseiam-se na absorção desta radiação por parte do denominado grupo cromóforo (unidade estrutural de determinado composto que absorve mensuravelmente a radiação incidente). Esta absorção é, portanto, proporcional à concentração de cromóforo (logo, de composto que o possui) presente, de acordo com a lei de Lambert-Beer. Assim, não só constitui um método de análise quantitativa, aproveitando o facto de certos cromóforos absorverem a comprimentos de onda específicos (por exemplo, os aminoácidos aromáticos das proteínas e as bases heterocíclicas dos ácidos nucleicos, que podem ser medidos a 280 e 260 nm, respectivamente), como também permite identificar certas classes de um composto, tanto no seu estado puro como em misturas biológicas. Pode ainda facultar informação sobre alguma alteração no ambiente

físico-químico desse cromóforo, dado que muitos desses compostos possuem espectros de absorção característicos nas regiões ultravioleta e visível, permitindo a sua identificação [Wilson e Walker, 1999; Robyt e White, 1990; Plummer, 1987].

A espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/visível foi uma das primeiras técnicas que permitiu esclarecer alguns aspectos da química do vanádio (+5) [Ingri e Brito, 1959]. Tendo em conta que o vanádio (+5) é um ião metálico d^0 , isto é, sem electrões na orbital d, não mostra transições na região visível do espectro electromagnético. A cor amarela que se observa com algumas soluções de vanádio (+5), nomeadamente a de decavanadato, deve-se a uma intensa absorção na cauda do ultravioleta. O espectro de absorção na região do ultravioleta para cada espécie de vanadato foi determinado tendo sido usado para o cálculo de constantes de equilíbrio de formação das diversas espécies de vanadato [Borgen *et al.*, 1967]. Contudo, a sobreposição dos espectros de absorvância para cada isómero de vanadato, levou a uma preferencial utilização da espectroscopia de RMN de ^{51}V cujas ressonâncias para cada espécie de vanadato são bem resolvidas no espectro.

III.1.4 – Utilização de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) na caracterização das soluções de vanadato

A ressonância magnética nuclear é uma técnica espectroscópica que monitoriza a absorção de energia associada a transições de núcleos entre níveis de energia magnética nuclear adjacentes. A energia é medida como uma função do campo magnético externo aplicado, e o resultado é um espectro de absorção em função da força do campo [Cantor e Schimmel, 1980].

As características dos sinais de um espectro de RMN de um determinado núcleo constituinte de uma molécula fornecem informações sobre a estrutura da molécula investigada, sobre as interacções intermoleculares ou ainda sobre processos dinâmicos em solução. O espectro de RMN apresenta bandas de ressonância de forma lorentziana, na

região das radiofrequências do espectro electromagnético, com os seguintes parâmetros espectrais (Fig. III.1): i) desvio químico, δ - refere-se à posição de cada banda em relação ao desvio químico de referência, δ_0 ; ii) amplitude - altura da banda em unidades arbitrárias; iii) intensidade - área da banda; iv) largura a meia altura, $\Delta\nu_{1/2}$ - medida da largura da banda a metade da amplitude máxima (em Hz); v) constante de acoplamento de spin, J - separação (em Hz) entre as bandas de um multipletto; vi) tempos de relaxação de spin nuclear longitudinal (T_1) e transversal (T_2). Todos estes parâmetros podem ser usados para obter informações sobre a estrutura, ambiente químico, mobilidade, concentração, interacção entre moléculas, ou ainda sobre processos cinéticos.

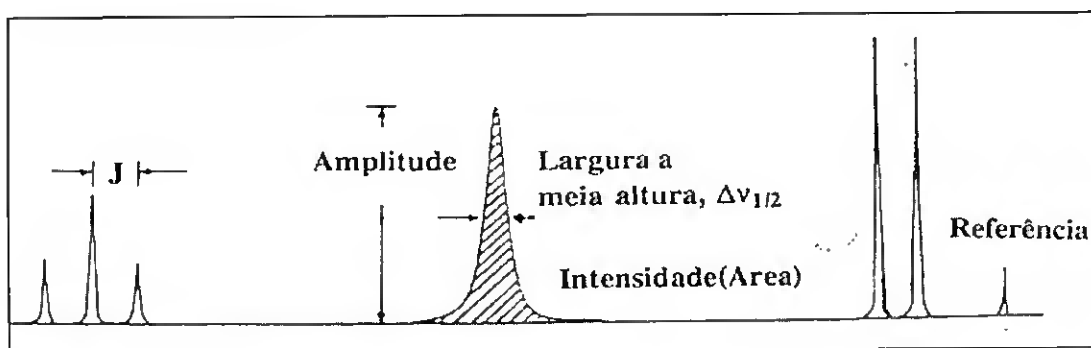


Figura III.1 - Parâmetros espectrais de RMN [adaptado de James, 1975].

Os desvios químicos reflectem a mudança do ambiente químico em torno do núcleo observado e o alargamento do sinal resulta de processos dinâmicos em solução. Os desvios químicos podem ser expressos em termos da frequência (em Hz) a que um sinal aparece em relação a um sinal de referência. Mas como o desvio é dependente da intensidade do campo magnético aplicado, é conveniente expressá-lo em função do campo magnético necessário para obter a condição de ressonância. Assim, o desvio químico é normalmente referido como um número adimensional, expresso em partes por milhão (ppm).

O valor de largura a meia altura de um sinal de RMN está directamente relacionado com o tempo de relaxação spin-spin (relaxação transversal), T_2 , do núcleo em causa ($\Delta\nu_{1/2} = 1/\pi T_2$). Na prática, para o valor de $\Delta\nu_{1/2}$ contribui não apenas o valor de T_2 , que

representa o tempo relativo ao processo de relaxação spin-spin, mas também a heterogeneidade do campo magnético exterior [Gil e Geraldés, 1987]. Quando um núcleo quadrupolar é colocado sob a acção de um campo magnético, o valor de T_2 depende inversamente do tempo de correlação rotacional, τ_r , do sistema, que por sua vez varia com a dimensão da molécula e com a viscosidade do meio onde ela se move. Assim, o tempo de correlação rotacional aumenta na presença de macromoléculas, soluções viscosas e temperaturas baixas.

As propriedades magnéticas do vanádio adequam-se bem a estudos por espectroscopia de RMN. O isótopo ^{51}V tem uma abundância natural perto de 100 %, um spin nuclear de $7/2$ e uma sensibilidade de 39 % relativamente à do protão, ^1H . Apesar do ^{51}V possuir um momento quadrupolar, as bandas dos vanadatos tetraédricos ou aproximadamente tetraédricos, não são excessivamente largas, 60 – 100 Hz (largura a meia altura) [O'Donnel e Pope, 1976]. Estas características tornam o núcleo de ^{51}V um dos mais bem sucedidos em estudos de RMN, particularmente em estudos que envolvam as espécies diamagnéticas (como as de vanádio (V)), já que as bandas das espécies paramagnéticas (como as do vanádio (IV)) alargam-se tanto que deixam de se observar [Chasteen, 1983]. Este método é responsável pela maioria da informação actualmente disponível para descrever este elemento no estado de oxidação +5.

Cada espécie de vanadato origina ressonâncias bem resolvidas no espectro de RMN, cuja localização é sensível ao estado de protonação da solução [Crans e Amin, 1998] (Tabela III.I). Como as diversas espécies têm tempos de relaxação semelhantes [Heath e Howarth, 1981], a integração dos sinais fornece a fracção molar de cada espécie que pode ser usada para calcular as concentrações de cada oligómero [Crans, 1994].

Tabela III.1 – Fórmulas, valores de pKa, desvios químicos, cor e estrutura das espécies maioritárias de vanadato em solução aquosa [adaptado de Crans *et al.*, 1998].

Formula	pKa	Desvio químico (ppm)	Cor e estrutura
VO_4^{3-}	-	-541,2	Incolor; linear
HVO_4^{2-}	~12	-538,8	Incolor; linear
H_2VO_4^-	7,1	-560,4	Incolor; linear
$\text{V}_2\text{O}_7^{4-}$	-	-561,0	Incolor; linear
$\text{HV}_2\text{O}_7^{3-}$	8,9	-563,5	Incolor; linear
$\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$	7,2	-572,7	Incolor; linear
$\text{V}_4\text{O}_{13}^{6-}$	-	-564 a -572	Incolor; linear
$\text{HV}_4\text{O}_{13}^{5-}$	8,3		
$\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$	-	-574,9	Incolor; cíclica
$\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$	-	-582,7	Incolor; cíclica
$\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$	-	-423, -497, -514	Amarelo/laranja; "cluster"
$\text{HV}_{10}\text{O}_{28}^{5-}$	5,7	-424, -500, -516	Amarelo/laranja; "cluster"
$\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{4-}$	3,6	-425, -506, -524	Amarelo/laranja; "cluster"
$\text{H}_3\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{3-}$	1,6	-427, -515, -534	Amarelo/laranja; "cluster"

De uma maneira geral, obtém-se uma boa correlação entre as simetrias do centro de coordenação (tetraédrica, octaédrica, bipiramidal trigonal) e os desvios químicos (que variam entre -480 e -600 ppm relativamente à referência VOCl_3) ou as larguras a meia altura dos sinais de ^{51}V -RMN [Rehder, 1982]. Como seria de esperar, em núcleos que possuem momentos quadrupolares, os valores de $\Delta\nu_{1/2}$ dependem da simetria de coordenação, e por isso a formação de compostos com simetrias distorcidas contribui para o aumento desse valor, como é o caso do complexo $\text{VO}_2(\text{EDTA})^{3-}$ (Tabela III.2). Também as espécies de vanádio ligadas a proteínas exibem um alargamento do sinal devido a um aumento do tempo de correlação rotacional e/ou a redução na simetria do campo eléctrico devido a um átomo dador da proteína na esfera de coordenação do vanádio [Crans *et al.*, 1990; Wittenkeller *et al.*, 1991].

A espectroscopia de RMN também pode fornecer informação sobre os aspectos dinâmicos de reacções. A obtenção de sinais médios estreitos caracteriza o chamado regime de troca rápida enquanto o aparecimento de duas bandas distintas para a forma livre e complexada caracteriza o regime de troca lenta. Assim, se uma determinada espécie de ^{51}V na presença de uma proteína sofrer um alargamento acentuado do seu respectivo sinal,

é possível que esse alargamento resulte de uma interacção (covalente ou não) dessa espécie com a proteína com um regime de troca rápida entre a espécie livre em solução e a espécie complexada [Crans *et al.*, 1990; Wittenkeller *et al.*, 1991; Crans, 1994]. Na Tabela III.3, apresentam-se alguns trabalhos publicados sobre estudos da interacção de vanádio com proteínas por espectroscopia de ^{51}V -RMN e os respectivos sinais de RMN mais afectados.

Tabela III.2 – Valores de largura a meia altura, $\Delta\nu_{1/2}$, observados em vários tipos de coordenação de átomos de vanádio [aptado de Redher, 1982].

Simetria do vanádio	Complexo ou espécie	$\Delta\nu_{1/2}$
Tetraédrico	VOCl_3 ; VO_4^{3-}	< 10 – 60
Quase tetraédrico	H_2VO_4^- ; “ VO_4^{3-} ”	80
Tetragonal	$\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$; $\text{V}_3\text{O}_9^{3-}$	150 – 180
Tetragonal	$\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$	150 (10A) ^a
(com átomos de V vizinhos)	$\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$	150 (10B) ^a
	$\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$	350 (10C) ^a
Rômbico	$\text{VO}_2(\text{EDTA})^{3-}$	800

10A, 10B e 10C, referem-se às três bandas que se observam no espectro de ^{51}V -RMN correspondentes à espécie decamérica..

Tabela III.3 – Estudos por RMN de ^{51}V de interacção de vanadatos com proteínas.

Proteína	Sinais de RMN mais afectados	Referência
Ca^{2+} -ATPase do RS	V_{10} e V_4	Csermely <i>et al.</i> , 1985
Ribonuclease	V_1	Borah <i>et al.</i> , 1985
Fosfogliceratomutase	V_2	Stankiewicz <i>et al.</i> , 1987 Liu <i>et al.</i> , 1992
Apo-transferrina	V_1	Butler e Eckert, 1989
6-fosfogluconato desidrogenase	V_2 e V_4	Crans e Schelble, 1990
Superóxido dismutase	V_4	Wittenkeller <i>et al.</i> , 1991
Ca^{2+} -ATPase do RS	V_{10} , V_4 e V_1^*	Aureliano e Madeira, 1994
Tubulina	V_4	Correia <i>et al.</i> , 1994
Hsp90	V_{10}	Soti <i>et al.</i> , 1998

*Sinais diferentemente afectados dependendo do estado conformacional da enzima

III.1.5 – Estudos por RMN de ^{51}V da interacção de vanadatos com miosina

A técnica de ^{51}V -RMN fora aplicada anteriormente a estudos de ligação com o subfragmento-1 de miosina [Cremo *et al.*, 1988; Cremo e Wilcott, 1990; Ringel *et al.*, 1990] onde se mostrou que das várias formas de vanadato em solução, a espécie tetramérica é aquela que liga com maior afinidade à enzima. Os estudos de Ringel *et al.* [1990] mostraram ainda que a presença de miosina ou S1 nas soluções de metavanadato produzem um alargamento do sinal de todas as espécies oligoméricas de vanadato (di-, tetra- e hexavanadatos) tendo sido interpretado como indicativo de ligação dos oligómeros de vanadato à proteína. Contudo, tendo em conta que estes oxovanadatos se encontram em equilíbrio rápido [Crans *et al.*, 1990], o desaparecimento ou alargamento dos sinais poderá implicar apenas que um dos oxovanadatos lábeis se ligou à miosina, mas não indica qual.

Mais recentemente, estudos preliminares com soluções de metavanadato e decavanadato indicaram uma ordem relativa de alargamento do sinal de ^{51}V -RMN, reflectindo a interacção dos oligómeros de vanadato com miosina, de $V_{10} > V_4 > V_1$ onde não foram observadas alterações para a espécie monomérica [Aureliano, 2000; Tiago *et al.*, 2002]. O decavanadato, contrariamente aos oxovanadatos lábeis (V_1 , V_2 , V_4 e V_5) tem um tempo de re-equilíbrio com as outras espécies, a pH neutro, suficientemente longo para que se possa atribuir o desaparecimento dos sinais de RMN unicamente a uma ligação da espécie oligomérica à proteína [Crans, 1994]. Nesse sentido, e uma vez que existem indicações de que a espécie decamérica difere das outras espécies oligoméricas no que diz respeito à forte interacção com a miosina e inibição da ATPase da enzima estimulada por actina [Aureliano, 2000; Tiago *et al.*, 2002], seria de interesse aprofundar, através da técnica de RMN de ^{51}V , os estudos de interacção do V_{10} com miosina e complexo actomiosina assim como investigar a competição entre as diferentes formas de vanadato para a ligação à enzima.

III.1.6 – Objectivos

No presente capítulo tem-se por objectivo caracterizar as espécies oligoméricas presentes em soluções de vanadato em determinadas condições experimentais apropriadas ao nosso sistema de estudo e determinar as interacções dessas espécies, particularmente a espécie decamérica, com o subfragmento-1 de miosina. Assim, depois da análise, por espectroscopia de RMN e de UV-vis, do efeito da concentração na composição das soluções de vanadato e da estabilidade das soluções de decavanadato após diluição no meio de reacção utilizado, estudou-se a interacção do decavanadato com o subfragmento-1 de miosina em diferentes condições experimentais bem como a competição entre os diferentes oligómeros de vanadato para o(s) sítios de ligação sob a influência de ligandos naturais da enzima, nomeadamente, actina e ATP.

III.2 – Materiais e Métodos

III.2.1 – Preparação de soluções de vanadato

As soluções de vanadato foram preparadas em água MiliQ a partir de metavanadato de amónio (NH_4VO_3) numa concentração de 50 mM, mediante agitação magnética e aquecimento ($\sim 30^\circ\text{C}$). Esta solução foi dividida em duas: uma cujo pH foi ajustado a 4,0 (com HCl) e que se designa nominalmente por “decavanadato”, enquanto que a solução inicial, que apresenta um pH de 6,7, é chamada nominalmente por “metavanadato”. A solução de metavanadato muda de cor amarelo claro para laranja, quando ajustada a pH 4, o que constitui indicativo da presença de espécies decaméricas que se encontram estabilizadas a este pH. As soluções foram armazenadas a 4°C e mantidas em gelo sempre que foram utilizadas.

III.2.2 – Caracterização de soluções de vanadato por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/visível (UV-vis)

Os espectros de UV-vis das soluções de metavanadato e decavanadato foram obtidos a 25°C , em células de quartzo de 1 cm de percurso óptico, num espectrómetro computadorizado Shimadzu modelo UV-2401 PC, nas seguintes condições: fenda, 1 nm e intervalo espectral, 240 a 700 nm. Antes da aquisição dos espectros, foi sempre realizado uma correcção da linha de base com o meio de reacção onde as soluções de vanadato foram diluídas. Os espectros de 2ª derivada e o gráfico de $\ln \text{Abs}$ versus tempo foram obtidos respectivamente a partir dos espectros de absorção e do gráfico de Abs versus tempo usando uma rotina do “software” instrumental.

III.2.3 – Obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{51}V

Os espectros de ressonância magnética nuclear do isótopo 51 de vanádio foram efectuados num espectrómetro Bruker AM-400 MHz equipado com uma sonda multinuclear inversa de 5 mm. Em tubos de RMN de 5 mm de diâmetro, 0,5 ml das soluções de meta- ou decavanadato suplementadas com 10% D_2O foram irradiados a uma frequência de 105,2 MHz. Os espectros foram adquiridos à temperatura ambiente da sonda com uma largura espectral de 23 923 Hz, um tempo de aquisição de 0,086 s, um número de transientes entre 10.000 e 12.000, um tempo de relaxação de 0,01 s e uma sequência de pulsos a 90° . Foram utilizadas transformadas de Fourier com um alargamento das bandas (LB) de 20 Hz para o processamento dos espectros, e os desvios químicos das ressonâncias de ^{51}V foram obtidos com relação à espécie tetramérica de vanadato que apresenta um desvio de -578 ppm relativamente ao VOCl_3 , independentemente do pH [Heath e Howarth, 1981].

As áreas dos sinais de RMN correspondentes às várias espécies oligoméricas de vanadato foram obtidas por integração dos sinais e as concentrações relativas das espécies de vanadato foram calculadas usando a equação III.1:

$$[\text{V}_i] = \frac{A(\text{V}_i)}{A_t} \times \frac{1}{n\text{V}_i} [\text{V}_t] \quad \text{[III.1]}$$

onde A corresponde à área medida referente à ressonância da espécie de vanadato V_i com o número de agregação n (n° de átomos de vanádio), A_t corresponde à soma total das áreas medidas e V_t é a concentração total de vanádio.

III.3 – Resultados e Discussão

III.3.1 – Análise da composição das soluções de vanadato por espectroscopia de ^{51}V -RMN: efeito da concentração

Para o presente estudo foram preparadas soluções stock de “metavanadato” e “decavanadato” que se supõem conter essencialmente espécies metaméricas $((\text{VO}_3)_n)$ e a espécie decamérica, respectivamente (Aureliano e Madeira, 1998). Conhecer a concentração original de cada oligómero nestas soluções stock é, no entanto, irrelevante porque é estabelecido um novo equilíbrio após diluição no meio de reacção para valores de $\text{pH} > 6,5$. A composição em oligómeros de vanadato quando a solução de metavanadato é diluída no meio de reacção depende fortemente da concentração final de vanádio. Por outro lado, a composição de uma solução de “decavanadato” depende do período de tempo após a diluição, devido à decomposição da espécie decamérica de vanadato. Portanto, torna-se importante recolher informação respeitante ao comportamento químico destas soluções especificamente nos meios de ensaio utilizados de forma a se poder correlacionar com os efeitos promovidos pelas espécies de vanadato no sistema biológico em estudo. Atendendo ao problema de o vanadato ter a possibilidade de interactuar com diversos ligandos biogénicos e com base na informação descrita na secção III.1.2, foi escolhido o tampão Hepes como meio de reacção para os ensaios, uma vez que para além de actuar no intervalo de pH desejado, não interfere com o sistema biológico em estudo.

Recorrendo à espectroscopia de ressonância magnética nuclear do isótopo 51 de vanádio (^{51}V -RMN) procedeu-se então à análise da composição das soluções de vanadato após diluição no meio de reacção contendo 25 mM Hepes, pH 7.0 e 25 mM KCl. O efeito da concentração na composição das soluções de vanadato foi determinada apenas para soluções de decavanadato uma vez que este estudo já tinha sido previamente realizado para soluções de metavanadato, nas mesmas condições de reacção, por Aureliano e Madeira [1998]. Na Figura III.2 mostram-se os espectros obtidos para as soluções de decavanadato

numa gama de concentrações de 2 a 15 mM após diluição no meio de reacção. A Tabela III.4, compila os parâmetros espectroscópicos obtidos para cada espécie presente nas soluções analisadas.

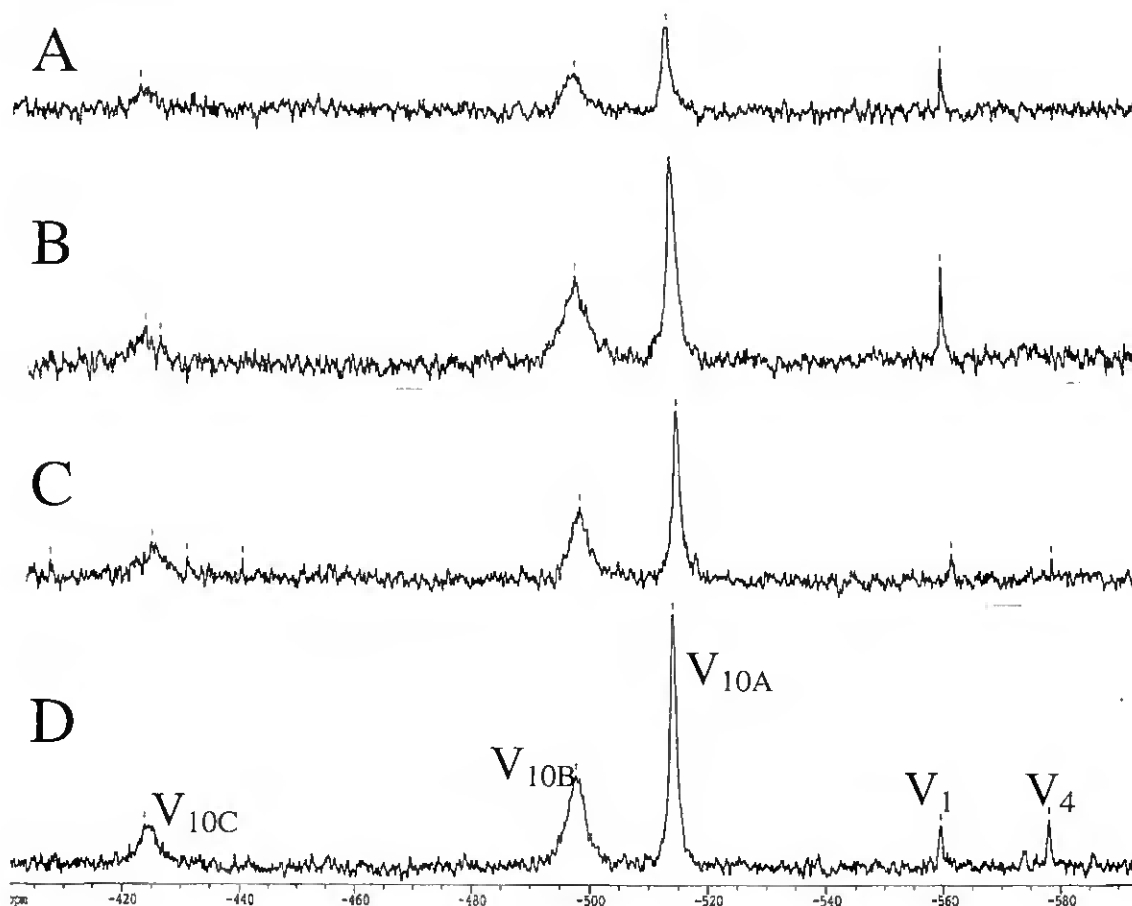


Figura III.2 – Espectros de RMN de ^{51}V de concentrações crescentes de decavanadato obtidos após diluição da solução stock de decavanadato no meio de reacção contendo 25 mM KCl, 25 mM Hepes, pH 7,0 para concentrações finais de: A) 2 mM; B) 5 mM; C) 10 mM e D) 15 mM em vanadato total. V_1 e V_4 referem-se às espécies monomérica e tetramérica de vanadato, respectivamente. V_{10A} , V_{10B} , V_{10C} correspondem respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) da estrutura da espécie decamérica apresentada na Figura I.6 do Capítulo I.

Table III.4 – Desvios químicos (δ) e larguras a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$) das ressonâncias das espécies decamérica (V_{10A} , V_{10B} e V_{10C}), monomérica (V_1) e tetramérica (V_4) presentes no espectro da solução de Decavanadato 15 mM (vanadato total).

	V_{10A}	V_{10B}	V_{10C}	V_1	V_4
δ (ppm)	-514	-497	-423	-560	-578
$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)	150	300	376	75,2	75,2

Segundo os desvios químicos que se apresentam, a espécie decamérica encontra-se na forma desprotonada ($V_{10}O_{28}^{6-}$) tal como se esperaria para um valor de pH superior a 5,7 de acordo com o descrito por Crans *et al.* [1998] (ver Table III.2). Para além da espécie decamérica, os espectros mostram uma “contaminação” por outras espécies de vanadato que varia entre 5 e 10%. Esta percentagem é independente da concentração total de vanadato, verificando-se por isso uma correlação linear para a espécie decamérica com o aumento da concentração de vanadato total (Figura III.3).

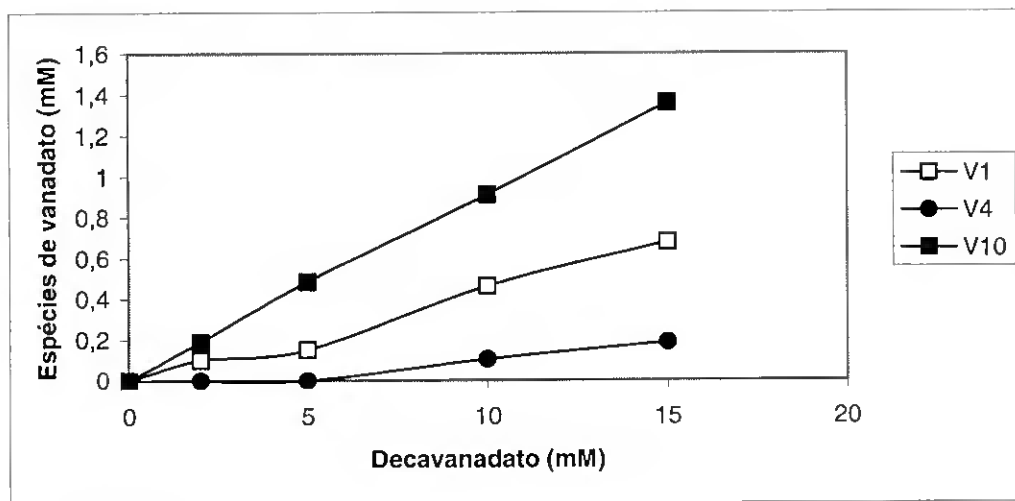


Figura III.3 – Distribuição das espécies oligoméricas de vanadato em função da concentração de decavanadato. As concentrações de cada espécie foram obtidas a partir das áreas dos sinais de ^{51}V -RMN observados na Figura III.2, tal como se descreve na secção III.2.2 dos Materiais e Métodos. V₁, V₄ e V₁₀ correspondem às espécies monomérica, tetramérica e decamérica, respectivamente.

Nas soluções de decavanadato, a espécie monomérica de vanadato que se apresenta como sendo a única espécie “contaminante” para concentrações de decavanadato inferiores a 2 mM, aumenta com o aumento da concentração total de vanadato. Tal como se constata para as soluções de metavanadato a pH neutro [Aureliano e Madeira, 1998], quando a concentração da espécie monomérica começa a ser superior a 200 μ M, esta começa a oligomerizar para originar as espécies di- e tetraméricas. Devido à baixa razão sinal/ruído só foi possível identificar a espécie tetramérica para concentrações de vanadato superiores a

5 mM (Figura III.3). A espécie dimérica não foi possível quantificar, mesmo para as concentrações de vanadato superiores, uma vez que a sua contribuição é menor. Estes resultados indicam claramente que a espécie decamérica se encontra em equilíbrio com a espécie monomérica e que o aparecimento de outras espécies oligoméricas está dependente da formação desta última. Sendo assim, podemos inferir que para concentrações de decavanadato inferiores a 2 mM e cerca de 20 minutos (que inclui o tempo de preparação da amostra e o tempo de aquisição do espectros) após diluição da solução de decavanadato no meio de reacção a pH fisiológico, coexistem em solução as espécies decamérica e monomérica de vanadato.

III.3.2 – Estabilidade das soluções de decavanadato: análise por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/visível

A estabilidade da espécie decamérica numa solução de decavanadato depende, tal como foi previamente referido, do tempo após o qual esta solução é diluída no meio de reacção e obviamente das condições do próprio meio de reacção (pH, temperatura e força iónica). A velocidade de hidrólise da espécie decamérica pode ser facilmente observada por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/visível uma vez que esta espécie apresenta uma banda característica na região do visível que não se verifica para quaisquer outras espécies oligoméricas de vanadato, nomeadamente a dimérica ou tetramérica, presentes nas soluções de metavanadato (Figura III.4, painel A). Esta banda larga de absorção é bem resolvida através da obtenção da derivada de 2ª ordem do espectro e apresenta a forma de dois vales com mínimos centrados a 358 e 400 nm (Figura III.4, painel B). Os valores mínimos obtidos a 358 e 400 nm, apresentam uma dependência linear relativamente à concentração de decavanadato (Figura III.5) indicando que as absorções electrónicas que ocorrem nestes comprimentos de onda se encontram efectivamente relacionadas com a espécie decamérica de vanadato.

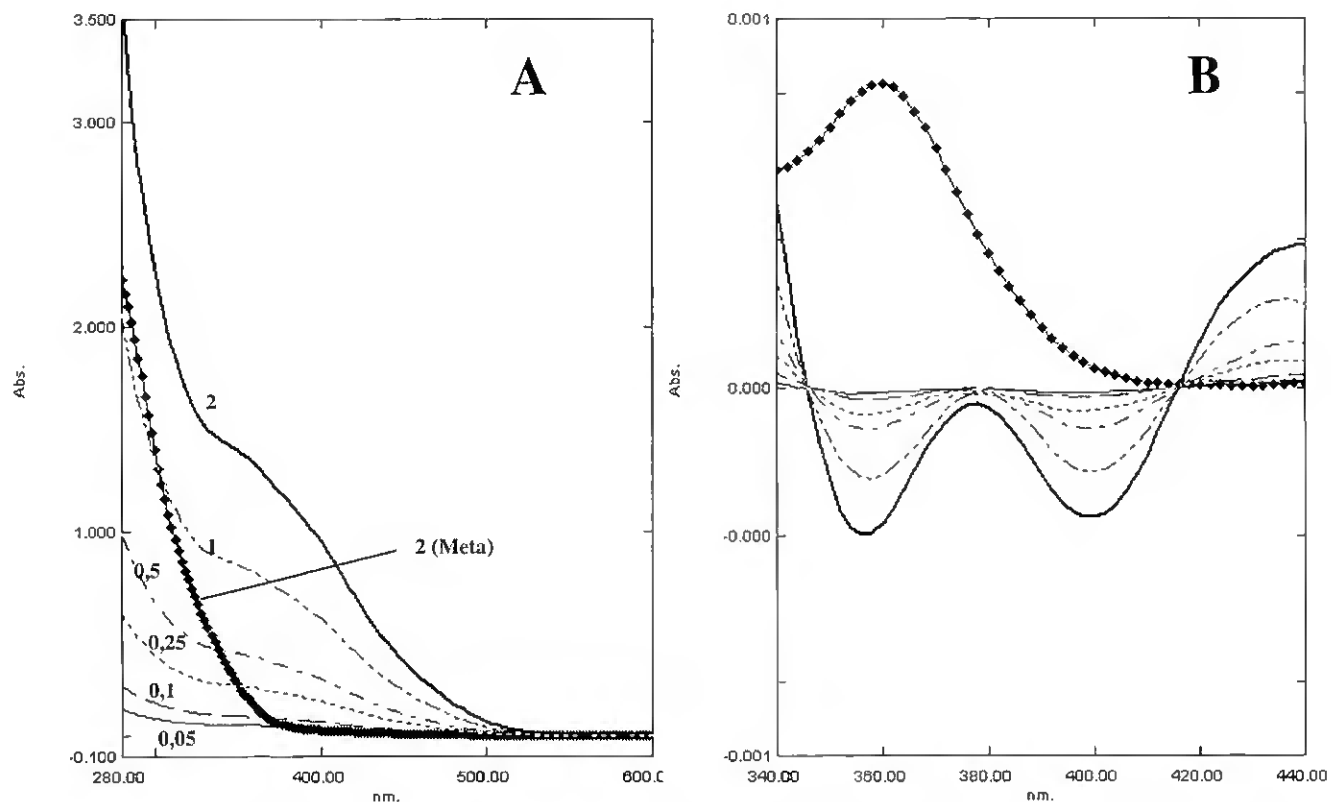


Figura III.4 – Espectros de absorção electrónica (painel A) e correspondentes derivadas de 2ª ordem (painel B) de soluções de decavanadato (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2 mM vanadato total) e de metavanadato (2 mM vanadato total) após diluição das soluções concentradas no meio de reacção contendo 25 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂ e 25 mM Hepes, pH 7.0. As experiências foram realizadas a 25 °C conforme se descreve na secção III.2.2 dos Materiais e Métodos.

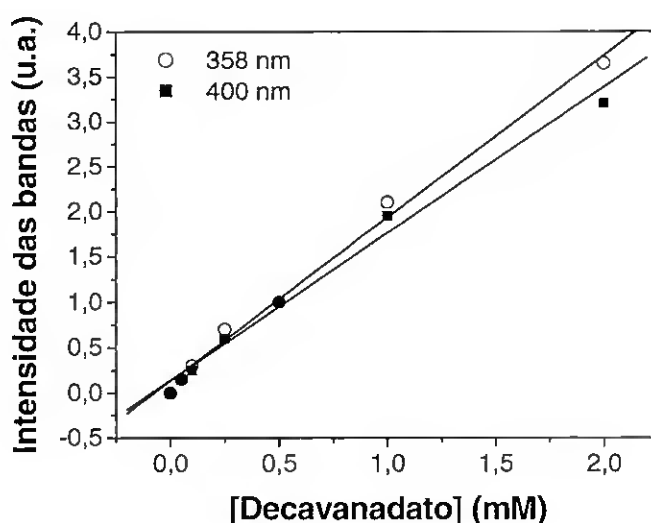


Figura III.5 – Variação dos mínimos obtidos a 358 e 400 nm após derivação dos espectros que se apresentam na Figura III.4 com o aumento da concentração de decavanadato.

Com base nesta característica, a estabilidade da espécie decamérica após diluição da solução de decavanadato, no meio de reacção dos ensaios (25 mM Hepes, pH 7.0 e 25 mM KCl), para uma concentração final de 50 μ M foi caracterizada através da leitura da absorvância a 400 nm em função do tempo. Obteve-se uma cinética de dissociação de 1ª ordem tal como se pode verificar pela linearidade do gráfico do ln da absorvância em função do tempo de aquisição espectral (Figura III.6).

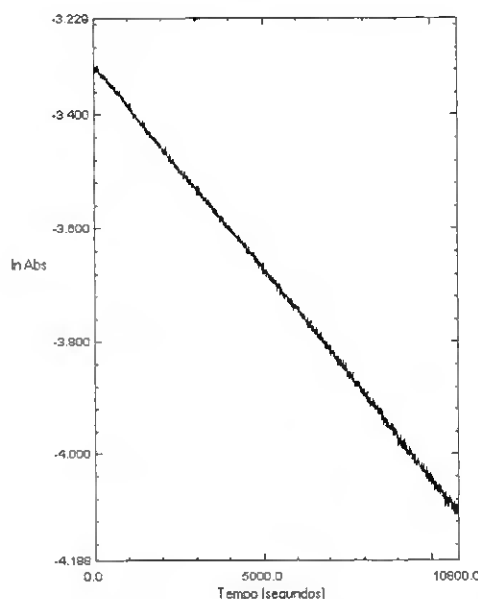


Figura III.6 – Gráfico do ln Abs a 400 nm em função do tempo (segundos) para uma solução de decavanadato 50 μ M (vanadato total) após diluição da solução concentrada no meio de reacção contendo 25 mM KCl e 25 mM Hepes, pH 7.0. A experiência foi realizada a 25 °C conforme se descreve na secção III.2.2 dos Materiais e Métodos.

A linha tendência que se observa no gráfico pode ser descrita pela equação III.2:

$$A = A_0 e^{-Kt} \quad \text{[III.2]}$$

cujo declive é $-K$ e cuja intercepção no eixo do $\ln A$ é $\ln A_0$. Numa reacção de 1ª ordem, o tempo de meia vida é independente da concentração inicial do reagente, e como tal pode ser descrito pela equação III.3:

$$t_{1/2} = \ln 2 / K \quad \text{[III.3]}$$

onde K representa a constante de 1ª ordem previamente determinada pelo declive da linha tendência. Tendo por base a equação III.2, determinou-se a constante de dissociação para a espécie decamérica e aplicou-se à equação III.3 de onde se obteve um tempo de meia vida de 158 minutos para as condições de reacção referidas no presente estudo.

III.3.3 – Estudo por ^{51}V -RMN da ligação de decavanadato ao subfragmento-1 de miosina: efeito da força iónica

Após uma análise criteriosa das espécies de vanadato que ocorrem nas condições experimentais seleccionadas, para o estudo da interacção da espécie decamérica com a miosina, decidiu-se utilizar uma solução de decavanadato de 5 mM (em vanádio total) que apresenta uma boa razão sinal/ruído relativamente aos sinais do vanadato decamérico e uma contaminação de apenas 3% da espécie monomérica, ou seja, cerca de 485 μM V_{10} e cerca de 150 μM de V_1 . Com o intuito de compreender a natureza da interacção do vanadato decamérico com a proteína, começou-se por estudar o efeito da força iónica na ligação de decavanadato ao subfragmento-1 de miosina. Os espectros de ^{51}V -RMN das soluções de decavanadato em meios com três concentrações diferentes de KCl (25, 150 e 300 mM) foram adquiridos na ausência e presença de S1 e apresentam-se na Figura III.7.

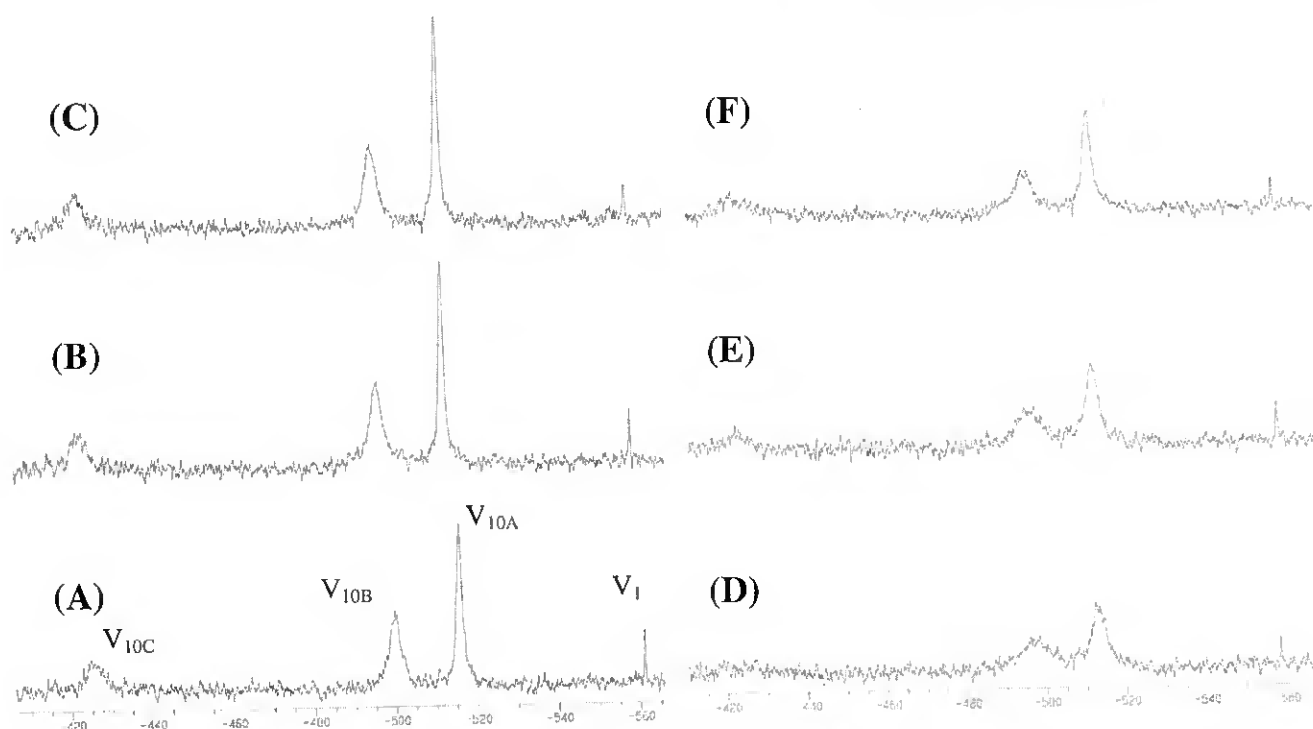


Figura III.7 – Espectros de ^{51}V -RMN de soluções de decavanadato (5 mM em vanádio total) num meio contendo 25 mM Hepes (pH 7,0) e 25 mM (A e D), 150 mM (B e E) ou 300 mM (C e F) KCl, na presença (direita) ou ausência (esquerda) de subfragmento-1 de miosina (2,5 mg/ml; 20 μM). Os espectros foram adquiridos a 25°C como se descreve na secção III.2.2 dos Materiais e Métodos. $\text{V}_{10\text{A}}$, $\text{V}_{10\text{B}}$ e $\text{V}_{10\text{C}}$ correspondem respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) da estrutura da espécie decamérica apresentada na Figura I.6 do Capítulo I.

Tabela III.5 – Parâmetros espectrais, nomeadamente desvios químicos (δ), larguras a meia altura ($\Delta v_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de decavanadato em diferentes condições experimentais apresentados na Figura III.7. Os parâmetros espectrais apresentados para o vanadato decamérico (V_{10}) referem-se apenas ao sinal de RMN V_{10A} que apresenta uma melhor razão sinal/ruído. O factor de alargamento da largura a meia altura (F) é definido como o quociente entre os valores de $\Delta v_{1/2}$ na presença e ausência de subfragmento-I de miosina (2,5 mg/ml; 20 μM). A concentração (C) das espécies de vanadato presentes nas soluções de decavanadato na ausência de proteína foram calculadas através da equação III.1 tal como se descreve na secção III.2.2 dos Materiais e Métodos.

	“Decavanadato” (5 mM)	
	V_1	V_{10}
A: 25 mM KCl		
δ (ppm)	-561,0	-515,6
I (cm)	2,0	6,0
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	nd	150,3
C (μM)	150	485
B: (A) + 20 μM S1		
δ (ppm)	-558,5	-512,2
I (cm)	1,0	2,4
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	nd	451,1
F (relativo a A)	-	3,0
C: 150 mM KCl		
δ (ppm)	-558,0	-512,0
I (cm)	1,9	7,5
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	nd	150,3
C (μM)	150	485
D: (C) + 20 μM S1		
δ (ppm)	-558,1	-511,6
I (cm)	1,6	3,2
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	nd	375,9
F (relativo a C)	-	(2,5)
E: 300 mM KCl		
δ (ppm)	-557,6	-511,6
I (cm)	1,3	7,6
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	nd	150,3
C (μM)	130	487
F: (E) + 20 μM S1		
δ (ppm)	-557,7	-511,7
I (cm)	1,2	3,8
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	nd	300,7
F (relativo a E)	-	(2,0)

Nota: Aos valores de $\Delta v_{1/2}$ está associada uma variação de ± 10 Hz; nd: não determinado.

A análise dos espectros de ^{51}V -RMN mostra-nos que a adição de subfragmento-1 de miosina (2,5 mg/ml ou 20 μM) às soluções de decavanadato produz um acentuado

alargamento e decréscimo da intensidade dos sinais correspondentes ao vanadato decamérico (Figura III.7). O alargamento dos sinais nas diferentes condições experimentais pode ser melhor visualizado na Tabela III.5, onde se inclui o factor de alargamento dos sinais (F), definido como o quociente entre os valores da largura do sinal a meia altura, na presença e ausência de proteína. Como se pode verificar, o efeito de alargamento e diminuição da intensidade dos sinais de RMN correspondentes ao vanadato decamérico é mais pronunciado para forças iónicas mais baixas (factor de alargamento de 3,0 para 25 mM KCl) diminuindo com o aumento da força iónica (factor de alargamento de 2,0 para 300 mM KCl). Estes resultados sugerem que a ligação da espécie decamérica à miosina é de natureza electrostática o que está de acordo com o facto de se tratar de uma espécie polianiónica com seis cargas negativas. Relativamente ao sinal correspondente ao vanadato monomérico, embora parece não haver alterações significativas com a adição de proteína, a análise da sua interacção com a proteína será considerada em condições experimentais mais apropriadas na secção III.3.5.

III.3.4 - Estudo por ^{51}V -RMN da ligação de decavanadato ao subfragmento-1 de miosina na presença de ligandos naturais da enzima

Uma vez que se verificou que a interacção de decavanadato com a miosina é favorecida para forças iónicas mais baixas, prosseguiram-se os estudos de ^{51}V -RMN nas condições experimentais iniciais, isto é, 25 mM KCl, 25 mM Hepes, pH 7,0. A adição de actina (40 μM) ou MgATP (2 mM) à solução de decavanadato (5 mM) na ausência de proteína não induz alterações significativas nas larguras a meia altura ($\Delta v_{1/2}$) ou nos desvios químicos (δ) das ressonâncias dos vanadatos (Figura III.8-A e Tabela III.6-A para a actina e Figura III.9-A e Tabela III.7-A para o ATP) indicando que nem a actina nem o ATP se associam a V_{10} . Pode-se inferir daí que quaisquer alterações nos espectros de RMN na presença de proteína resultam de modificações induzidas pelos ligandos naturais na miosina. Quando a

adição de S1 (20 μM) é realizada na presença de F-actina (40 μM) verifica-se que o factor de alargamento do sinal de RMN do vanadato decamérico (V_{10A}) aumenta de 3,0 para 3,2 (comparar Tabela III.5-B com Tabela III.6-B) sugerindo que a presença de actina poderá estar a favorecer a interacção do vanadato decamérico com o subfragmento-1 de miosina.

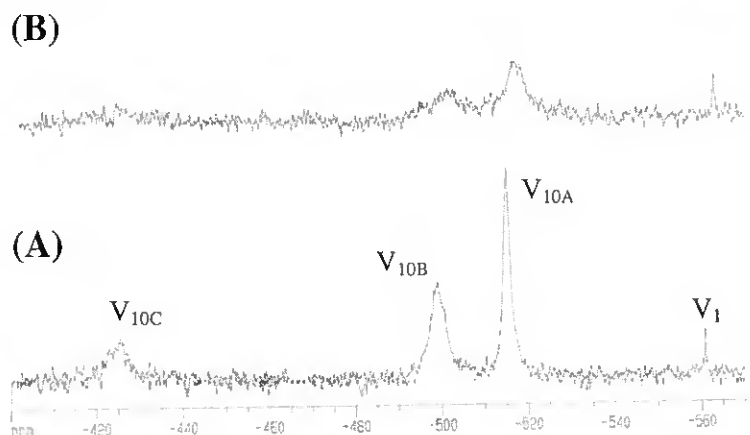


Figura III.8 - Espectros de ^{51}V -RMN de soluções de decavanadato (5 mM em vanádio total) num meio contendo 25 mM KCl e 25 mM Hepes (pH 7,0) com 40 μM F-actina na ausência (A) ou presença (B) de subfragmento-1 de miosina (2,5 mg/ml; 20 μM). Os espectros foram adquiridos a 25°C como se descreve na secção III.2.2 dos Materiais e Métodos. V_{10A} , V_{10B} e V_{10C} correspondem respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) da estrutura da espécie decamérica apresentada na Figura I.6 do Capítulo I.

Tabela III.6 - Parâmetros espectrais, nomeadamente desvios químicos (δ), larguras a meia altura ($\Delta v_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de decavanadato apresentados na Figura III.8. O factor de alargamento da largura a meia altura (F) é definido como o quociente entre os valores de $\Delta v_{1/2}$ na presença e ausência de subfragmento-1 de miosina (20 μM).

	"Decavanadato" (5 mM)	
	V_1	V_{10}
A: 40 μM F-actina		
δ (ppm)	-558,4	-512,7
I (cm)	1,5	7,1
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	nd	150,3
F(relativo a A da Tab. III.4)	-	1,0
B: (G) + 20 μM S1		
δ (ppm)	-561,0	-514,8
I (cm)	1,4	1,9
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	nd	488,5
F (relativo a A)	-	(3,2)

Por outro lado, quando a adição de S1 (20 μM) é realizada na presença de MgATP (2 mM) observa-se que o factor de alargamento correspondente à ressonância do vanadato decamérico é menor relativamente à mesma situação experimental na ausência do substrato. Este resultado verifica-se tanto na ausência (Figura III.9-C e Tabela III.7-C) como na presença (Figura III.9-D e Tabela III.7-D) de F-actina (40 μM), embora seja mais pronunciado no primeiro caso. É de referir ainda que foram obtidos os mesmos resultados com MgADP (resultados não apresentados). Estas observações sugerem que a ligação do nucleótido à miosina diminui a afinidade do vanadato decamérico para proteína e que a F-actina parece reverter parcialmente este efeito.

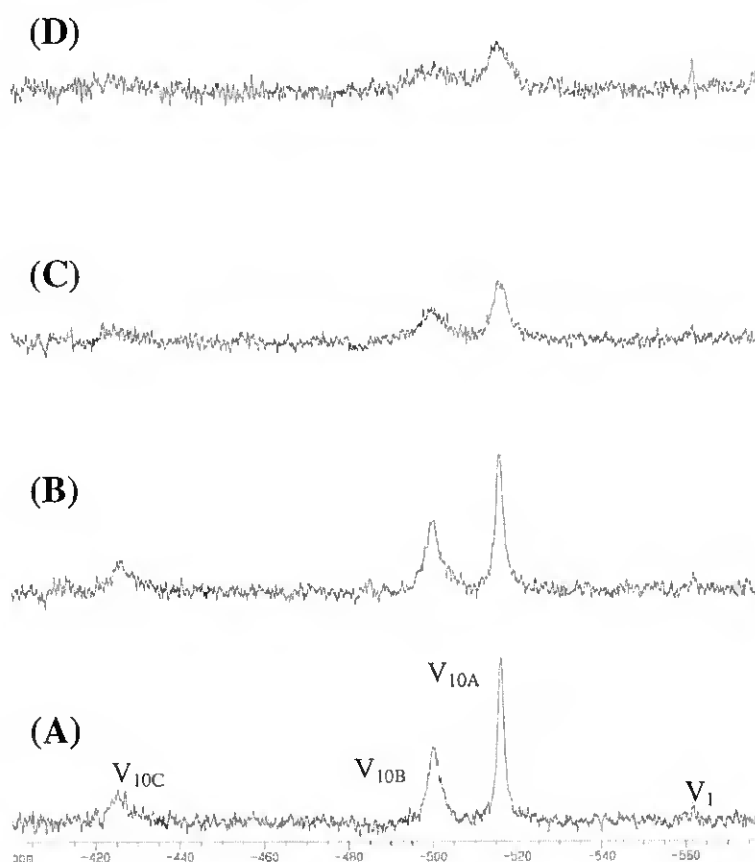


Figura III.9 - Espectros de ^{51}V -RMN de soluções de decavanadato (5 mM em vanádio total) num meio contendo 25 mM KCl, 25 mM Hepes (pH 7,0) e 2 mM MgATP na ausência (A e B) ou presença (C e D) de subfragmento-1 de miosina (2,5 mg/ml; 20 μM). Os espectros (B) e (D) contêm adicionalmente 40 μM de F-actina. Os espectros foram adquiridos a 25°C como se descreve na secção III.2.2 dos Materiais e Métodos. V_{10A} , V_{10B} e V_{10C} correspondem respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) da estrutura do V_{10} apresentada na Figura I.6 do Capítulo I.

Tabela III.7 - Parâmetros espectrais, nomeadamente desvios químicos (δ), larguras a meia altura ($\Delta v_{1/2}$) e intensidade (I) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de decavanadato apresentados na Figura III.9. O factor de alargamento da largura a meia altura (F) é definido como o quociente entre os valores de $\Delta v_{1/2}$ na presença e ausência de subfragmento-1 de miosina (2,5 mg/ml; 20 μM).

	"Decavanadato" (5 mM)	
	V ₁	V ₁₀
A: 2 mM MgATP		
δ (ppm)	-561,7	-516,0
I (cm)	1,0	5,9
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	nd	187,9
F (relativo a A da Tab. III.4)	-	(1,2)
B: (A) + 40 μM F-actina		
δ (ppm)	-	-515,6
I (cm)	-	4,9
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	-	225,5
F (relativo a A)	-	(1,2)
C: (A) + 20 μM S1		
δ (ppm)	-	-515,6
I (cm)	-	2,1
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	-	451,1
F (relativo a A)	-	(2,4)
D: (B) + 20 μM S1		
δ (ppm)	-561,7	-515,4
I (cm)	1,1	1,8
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	nd	601,4
F (relativo a B)	-	(2,7)

Nota: Aos valores de $\Delta v_{1/2}$ está associada uma variação de ± 10 Hz; nd: não determinado.

III.3.5 - Estudo por ^{51}V -RMN da competição entre as diferentes formas de vanadato para a ligação ao subfragmento-1 de miosina

A competição entre as diferentes formas de vanadato para a ligação à miosina, foi avaliada primeiramente entre as espécies "metaméricas", nomeadamente o monómero, dímero e tetrâmero, presentes numa solução de 2 mM metavanadato e seguidamente entre a espécie decamérica e os restantes oligómeros presentes numa solução mista contendo 2 mM de metavanadato e 5 mM decavanadato. Os espectros de RMN de ^{51}V das soluções de metavanadato e mista foram adquiridos na ausência ou presença dos ligandos naturais da enzima e a ordem relativa do alargamento dos sinais de vanadato após adição de

proteína foi avaliado e apresenta-se nas Tabelas III.8 e III.9, respectivamente. Os espectros de RMN correspondentes podem ser seguidos nas Figuras III.10 e III.11.

Na solução de metavanadato, a adição de subfragmento-1 de miosina (30 μM), alargou selectivamente por um factor de 3,0 e diminui a intensidade do sinal correspondente ao vanadato tetramérico não causando alterações nos sinais do monómero e do dímero (Figura III.10-B e Tabela III.8-B). Da mesma forma, a ressonância correspondente ao vanadato decamérico na solução mista, foi selectivamente alargada, por um factor de 2,8, prevenindo quaisquer alterações dos sinais do V_4 ou de outros vanadatos (Figura III.11-B e Tabela III.9-B). Resultados semelhantes foram previamente observadas por Csermely *et al.* [1985] para a Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático mostrando claramente uma ligação preferencial da proteína aos oligómeros de vanadato maiores e com uma maior densidade de carga negativa como é o caso do tetravanadato ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$) e do decavanadato ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$). Para além disso, estes resultados indicam uma competição entre o decavanadato e o tetravanadato para o(s) mesmo(s) sítio(s) de ligação na proteína.

A adição de F-actina (30 μM) ou MgATP (2 mM) às soluções de vanadato na ausência de subfragmento-1 de miosina não induz alterações significativas nos valores de largura a meia altura ou nos desvios químicos das ressonâncias dos vanadatos (ver Tabela III.8-C e -E e Tabela III.9-C e -E para as soluções de metavanadato e mista, respectivamente), indicando que os ligandos naturais da enzima não se associam com quaisquer formas de vanadato presentes nos meios de reacção, o que está de acordo com resultados anteriormente reportados [Ringel *et al.*, 1990]. A adição de F-actina na presença de subfragmento-1 parece favorecer a ligação quer do V_4 na solução de metavanadato, quer do V_{10} na solução mista, uma vez que o factor de alargamento aumenta para 5,0 (Tabela III.8-D) e 3,0 (Tabela III.9-D), respectivamente. Por outro lado, quando o MgATP é adicionado ao meio contendo subfragmento-1 de miosina quer na ausência (Figura III.10-F) quer na presença (Figura III.10-H) de actina, o sinal do V_4 torna-se mais estreito (Tabela

III.8-F e -H) embora este efeito seja mais evidente na ausência de actina. Em estudos com o S1 de miosina na ausência de actina [Ringer *et al.*, 1990] e com a Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático [Aureliano e Madeira, 1994], fora observado o mesmo efeito do MgATP sugerindo: (i) uma competição entre o tetravanadato e o ATP para o local de ligação do nucleótido nas enzimas; ou (ii) uma alteração conformacional local provocada pelo ATP que diminua a afinidade do tetravanadato para a enzima. Este comportamento na presença dos ligandos naturais da miosina, embora de uma forma menos pronunciada, também se verificou para o vanadato decamérico quer na solução de decavanadato (mostrado na secção anterior) quer na solução mista (Figura III.11 e Tabela III.8). Ao interpretar este facto, não seria contudo correcto afirmar que a ligação do V_{10} à miosina é menos afectada pelos ligandos naturais da enzima que o V_4 uma vez que: (i) é conhecido que a rápida troca química entre o decavanadato livre e complexado contribui para o desaparecimento ou alargamento excessivo do sinal mesmo na presença de excesso de vanadato [Crans, 1994]; (ii) o alargamento excessivo do sinal do V_{10} pode estar a mascarar possíveis efeitos dos ligandos naturais da miosina.

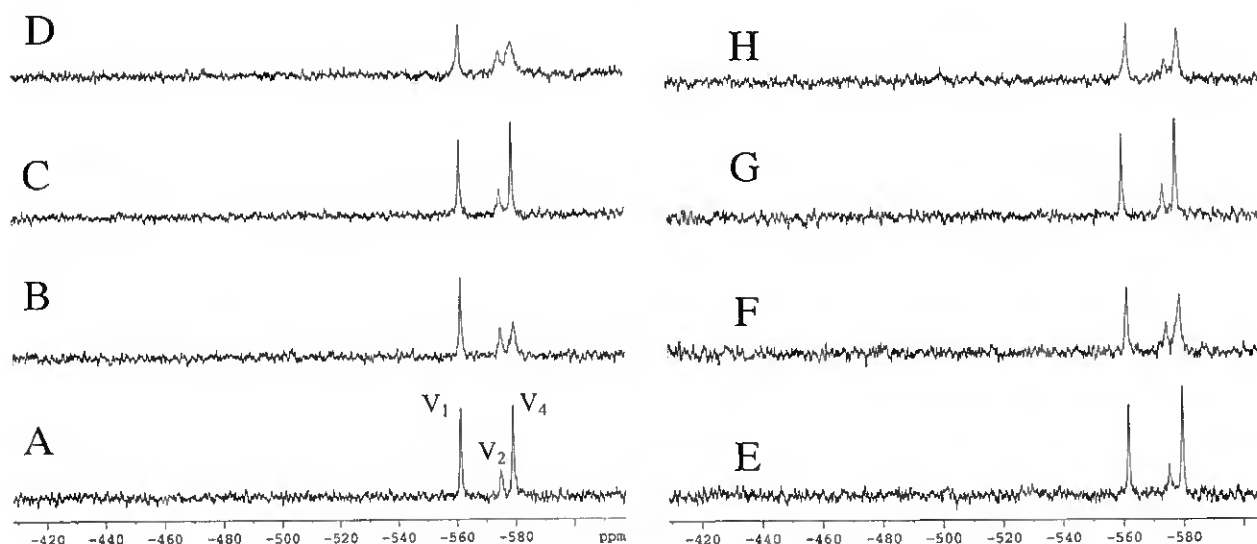


Figura III.10 - Espectros de ^{51}V -RMN de soluções de metavanadato (2 mM) num meio contendo 25 mM KCl, 25 mM Hepes (pH 7,0) na ausência (A, E) ou presença de 30 μM S1 (B, F); 30 μM F-actina (C, G); 30 μM S1 + 30 μM F-actina (D, H) com (direita) ou sem (esquerda) 2 mM MgATP. Os espectros foram adquiridos a 25°C como se descreve na secção III.2.2 dos Materiais e Métodos. V_1 , V_2 e V_4 referem-se aos vanadatos monomérico, dimérico e tetramérico cíclico, respectivamente.

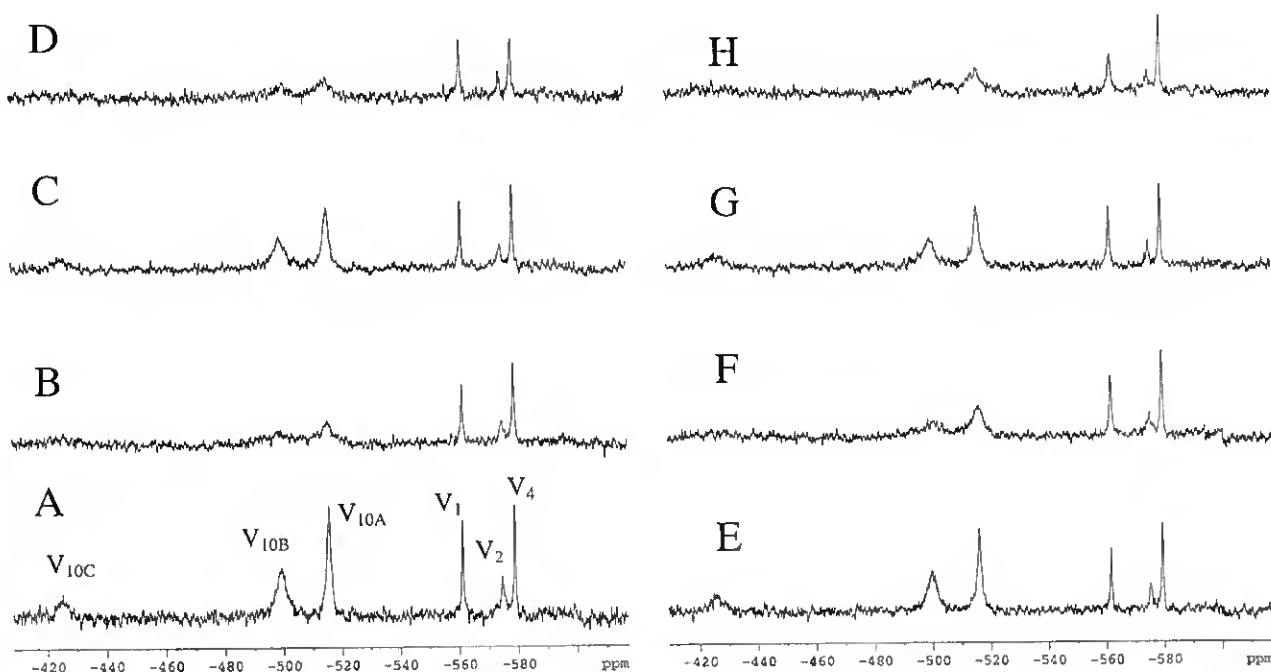


Figura III.11 - Espectros de ^{51}V -RMN de soluções mistas compostas por metavanadato (2 mM) e decavanadato (5 mM) num meio contendo 25 mM KCl, 25 mM Hepes (pH 7,0) na ausência (A, E) ou presença 30 μM de S1 (B, F); 30 μM F-actina (C, G); 30 μM S1 + 30 μM F-actina (D, H) com (direita) ou sem (esquerda) 2 mM MgATP. Os espectros foram adquiridos a 25°C como se descreve na secção III.2.2 dos Materiais e Métodos. V_{10A} , V_{10B} e V_{10C} correspondem respectivamente, aos átomos de vanádio V(2), V(1) e V(3) da estrutura da espécie decamérica apresentada na Figura I.6 do Capítulo I.

Tabela III.8 - Parâmetros espectrais, nomeadamente desvios químicos (δ) e larguras a meia altura ($\Delta v_{1/2}$) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções de metavanadato (META) apresentados na Figura III.10. O factor de alargamento da largura a meia altura (F) é definido como o quociente entre os valores de $\Delta v_{1/2}$ na presença e ausência de subfragmento-1 de miosina (30 μM). A concentração (C) das espécies de vanadato presentes na solução de metavanadato na ausência de proteína foram calculadas através da equação III.1, tal como se descreve na secção III.2.2 dos Materiais e Métodos.

	META (2 mM)		
	V ₁	V ₂	V ₄
A: Controlo			
δ (ppm)	-561,0	-574,6	-578,8
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	75,2	150,3	75,2
C (μM)	766	146	236
B: 30 μM S1			
δ (ppm)	- 561,2	- 574,6	-579,1
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	75,2	150,3	225,6
F (relativo a A)	(1,0)	(1,0)	(3,0)
C: 30 μM F-actina			
δ (ppm)	-561,0	- 574,5	-578,8
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	75,2	150,3	75,2
F (relativo a A)	(1,0)	(1,0)	(1,0)
D: 30 μM S1 + 30 μM F-actina			
δ (ppm)	-561,1	-574,6	-578,8
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	112,8	225,6	376
F (relativo a C)	(1,5)	(1,5)	(5,0)
E: A + 2 mM ATP			
δ (ppm)	- 561,0	- 574,5	- 578,9
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	75,2	150,3	75,2
F (relativo a A)	(1,0)	(1,0)	(1,0)
F: 30 μM S1 + 2 mM ATP			
δ (ppm)	- 561,6	-574,8	- 579,0
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	90,2	150,3	150,3
F (relativo a E)	(1,2)	(1,0)	(2,0)
G: 30 μM F-actina + 2 mM ATP			
δ (ppm)	- 561,0	- 574,5	- 578,9
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	75,2	150,3	75,2
F (relativo a E)	(1,0)	(1,0)	(1,0)
H: 30 μM S1 + 30 μM F-actina + 2 mM ATP			
δ (ppm)	- 562,0	- 574,8	- 578,8
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	112,8	150,3	188,0
F (relativo a G)	(1,5)	(1,0)	(2,5)

Tabela III.9 - Parâmetros espectrais, nomeadamente desvios químicos (δ) e larguras a meia altura ($\Delta v_{1/2}$) dos sinais de ^{51}V -RMN das espécies de vanadato presentes nas soluções mistas (META + DECA) apresentados na Figura III.11. O factor de alargamento da largura a meia altura (F) é definido como o quociente entre os valores de $\Delta v_{1/2}$ na presença e ausência de subfragmento-I de miosina (30 μM). A concentração (C) das espécies de vanadato presentes na solução mista na ausência de proteína foram calculadas através da equação III.1, tal como se descreve na secção III.2.2 dos Materiais e Métodos.

	META (2 mM) + DECA (5 mM)			
	V_1	V_2	V_4	V_{10}
A: Controlo				
δ (ppm)	-561,1	-574,5	-578,8	- 515,5
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	75,2	150,3	75,2	150,3
C (μM)	908	300	219	461
B: 30 μM S1				
δ (ppm)	- 561,2	- 574,7	-578,7	- 515,2
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	75,2	188,0	75,2	413,3
F (relativo a A)	(1,0)	(1,2)	(1,0)	(2,8)
C: 30 μM F-actina				
δ (ppm)	-561,1	- 574,5	-578,8	- 515,4
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	75,2	150,3	75,2	225,6
F (relativo a A)	(1,0)	(1,0)	(1,0)	(1,5)
D: 30 μM S1 + 30 μM F-actina				
δ (ppm)	-561,3	- 574,6	-578,7	- 515,7
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	75,2	112,8	75,2	676,4
F (relativo a C)	(1,0)	(1,0)	(1,0)	(3,0)
E: A + 2 mM ATP				
δ (ppm)	- 561,1	- 574,6	- 578,8	- 515,5
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	75,2	112,8	75,2	150,3
F (relativo a A)	(1,0)	(0,8)	(1,0)	(1,0)
F: 30 μM S1 + 2 mM ATP				
δ (ppm)	- 561,3	- 574,6	- 579,0	- 515,6
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	75,2	188,0	75,2	413,3
F (relativo a E)	(1,3)	(1,3)	(1,0)	(2,8)
G: 30 μM F-actina + 2 mM ATP				
δ (ppm)	- 561,1	- 574,6	- 578,8	- 515,4
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	75,2	150,3	75,2	225,6
F (relativo a E)	(1,0)	(1,3)	(1,0)	(1,5)
H: 30 μM S1 + 30 μM F-actina + 2 mM ATP				
δ (ppm)	- 561,8	- 574,7	- 578,8	- 515,4
$\Delta v_{1/2}$ (Hz)	150,3	150,3	75,2	639,0
F (relativo a G)	(1,0)	(1,0)	(1,0)	(2,8)

III.4 - Conclusões

A ocorrência simultânea, em solução, de diferentes espécies oligoméricas de vanadato em equilíbrio, acrescida da possível interacção dessas espécies com os mais variados compostos, obrigou a uma análise prévia das espécies oligoméricas de vanadato presentes nas soluções de meta- e decavanadato após diluição nos meios de reacção utilizados. Este estudo recaiu essencialmente sobre a solução de decavanadato onde se pretendeu analisar a sua composição em função da concentração de vanadato total, bem como a estabilidade da espécie decamérica após diluição no meio de reacção. Se por um lado, o aparecimento de espécies metaméricas de vanadato, nas soluções de decavanadato, pode ser observado recorrendo à espectroscopia de ressonância magnética nuclear, o desaparecimento da espécie decamérica é facilmente observado através de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/visível. Os resultados aqui apresentados demonstram que a combinação destas duas técnicas favorece a análise do comportamento químico das soluções de decavanadato após diluição nos meios de reacção pretendidos, permitindo definir as condições mais apropriadas ao estudo dos efeitos dos vanadatos no sistema biológico em estudo.

Embora instáveis, as soluções de decavanadato, quando diluídas no meio de reacção utilizado (25 mM KCl, 25 mM Hepes, pH 7.0, 25 °C), apresentam vanadato maioritariamente na forma decamérica, cuja concentração varia linearmente com a concentração total de vanadato. Para as condições experimentais, a cinética de dissociação da espécie decamérica confirma um processo cinético de 1ª ordem com um tempo de meia vida de 158 minutos. Consequentemente, a espécie decamérica é suficientemente estável para que se possa determinar o seu efeito no sistema biológico em estudo, sendo possível deduzir o efeito putativo de espécies de vanadato “contaminantes”, maioritariamente a espécie monomérica, nas condições experimentais seleccionadas.

Espectros de ^{51}V RMN de soluções meta e decavanadato foram obtidos em diferentes condições experimentais e a ordem relativa de alargamento dos sinais após adição de subfragmento-1 de miosina, reflectindo a interacção das diferentes espécies oligoméricas de vanadato com a proteína, foi avaliada. É sugerido que o V_{10} e o V_4 competem para os mesmos sítios de ligação na miosina e são igualmente modulados pelos ligandos naturais da enzima, isto é, a sua interacção é afectada na presença de nucleótido e favorecida na presença de actina. Como espécies polianiónicas, é provável que o tetravanadato e o decavanadato se liguem a uma porção policatiónica da miosina com forças electrostáticas envolvidas tal como se comprova pelos resultados obtidos, nomeadamente: (i) o V_{10} tem uma maior afinidade para os sítios de ligação na miosina que o V_4 , da mesma forma que o V_4 tem maior afinidade que os vanadatos menores; (ii) a interacção do V_{10} é afectada pela força iónica do meio sendo favorecida para forças iónicas mais baixas.

III.5 – Referências Bibliográficas

- Aureliano, M. and V. M. Madeira (1994). "Interactions of vanadate oligomers with sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase." Biochim Biophys Acta **1221**(3): 259-71.
- Aureliano, M. and V. M. C. Madeira (1998). "Energy transduction mechanisms as affected by vanadium (V) species: Ca²⁺-pumping in sarcoplasmic reticulum." Adv Environ Sci **30**: 333-357.
- Aureliano, M. (2000). "Vanadate oligomers interactions with myosin." J Inorg Biochem **80**(1-2): 141-3.
- Borah, B., C. W. Chen, et al. (1985). "Nuclear magnetic resonance and neutron diffraction studies of the complex of ribonuclease A with uridine vanadate, a transition-state analogue." Biochemistry **24**(8): 2058-67.
- Borgen, O., M. R. Mahmoud, et al. (1977) "Reinvestigation of hydrolysis of pentavalent vanadium" Acta Chem Scand **A31**: 329.
- Butler, A. and H. Eckert (1989). "⁵¹V NMR as a probe of vanadium(V) coordination to human apotransferrin." J Am Chem Soc **111**: 2802-2809.
- Cantor, C. R. and P. R. Schimmel (1980). "Biophysical Chemistry. Part II: Techniques for the study of biological structure and function." W. H. Freeman and company, New York, pp. 481-525.
- Chasteen, N. D. (1983). "The biochemistry of vanadium." Struct Bonding **53**: 105-138.
- Correia, J. J., L. D. Lipscomb, et al. (1994). "Cleavage of tubulin by vanadate ion." Arch Biochem Biophys **309**(1): 94-104.
- Crans, D. C., R. L. Bunch, et al. (1989). "Interaction of trace levels of vanadium (IV) and vanadium (V) in biological systems." J Am Chem Soc **111**: 7597-7607.

- Crans, D. C., C. D. Rithner, et al. (1990). "Application of time-resolved ^{51}V 2-D NMR for quantitation studies of kinetic exchange between vanadate oligomers." J Am Chem Soc **112**: 2901-2908.
- Crans, D. C. and S. M. Schelble (1990). "Vanadate dimer and tetramer both inhibit glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*." Biochemistry **29**(28): 6698-706.
- Crans, D. C. (1994). "Aqueous chemistry of labile oxovanadatos: relevance to biological studies." Comments Inorg Chem **16**: 1-33.
- Crans, D. C., S. S. Amin (1998). "Chemistry of relevance to vanadium in the environment." In: *Vanadium in the Environment* (J. O. Nriagu, ed.), pp. 73-95.
- Cremo, C. R., J. C. Grammer et al. (1988). "Spectroscopic studies of vanadate promoted photochemical modification of myosin subfragment-1." Biophys J **53**: 236a.
- Cremo, C. R. and J. Wilcott (1990). "Vanadate mediated photocleavage of myosin S1 at the V2 site." Biophys J **57**: 329a.
- Csermely, P., A. Martonosi, et al. (1985). " ^{51}V -n.m.r. analysis of the binding of vanadium(V) oligoanions to sarcoplasmic reticulum." Biochem J **230**(3): 807-15.
- Gil, V. M. S. e Geraldés, C. F. G. C. (1987). "Ressonância magnética nuclear." Ed. Fundação Calouste Gulbenkian.
- Gresser, M. J. and A. S. Tracey (1986). "Vanadium(V) oxyanions – formation of cyclic esters with ethylene-glycol." J Am Chem Soc **108**: 1935-1939.
- Heath, E. and O. W. Howarth (1981). "Vanadium-51 and oxygen-17 nuclear magnetic resonance study of vanadate (V) equilibria and kinetics" J Chem Soc Dalton Trans, pp. 1105-1110.
- Howarth, O. W. (1990). "Vanadium-51 NMR." Prog NMR Spectrosc **22**: 453-483.

- Ingri, N. and F. Brito (1959). "Equilibrium studies of polyanions. VI. Polyvanadates in alkaline Na(Cl) medium." Acta Chim Scand **13**: 1971-1996.
- James, T. L. (1975). "Nuclear Magnetic Resonance in biochemistry. Principles and applications." Academic Press, Inc.
- Liu, S., M. J. Gresser, et al. (1992). "¹H and ⁵¹V NMR studies of the interaction of vanadate and 2-vanadio-3-phosphoglycerate with phosphoglycerate mutase." Biochemistry **31**(10): 2677-85.
- O'Donnel, S. E. and M. T. Pope (1976). "Applications of vanadium-51 and phosphorous-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy to the study of iso- and hetero-polyvanadates." J Chem Soc Dalton Trans 2290-2297.
- Petterson, L., I. Andersson, et al. (1985). "Multicomponent polyanions. 37. A potentiometric and ⁵¹V-NMR study of equilibria in the H⁺-HVO₄²⁻ system in 3.0 M-Na(ClO₄) medium covering the range $\leq -\lg[H^+] \leq 10$." Chem Scripta **25**: 309-317.
- Pope, M. T. (1983). "Heteropoly and Isopoly Oxometalates", Springer-Verlag, New York, p. 180.
- Rehder, D. (1982). "A survey of ⁵¹V NMR spectroscopy." Bull Magnetic Resonance **4**: 33-83.
- Rehder, D. (1991) "The Bioinorganic chemistry of vanadium" Chem Int Ed Engl **30**: 148-167.
- Ringel, I., Y. M. Peyser, et al. (1990). "⁵¹V NMR study of vanadate binding to myosin and its subfragment 1." Biochemistry **29**(38): 9091-6.
- Scopes, R. K. (1982). "Protein purification. Principles and practice." Springer Advanced Texts in Chemistry, ed. C. R. Cantor (Springer-Verlag New York Inc.).

- Soti, C., L. Radics, et al. (1998). "Interaction of vanadate oligomers and permolybdate with the 90-kDa heat-shock protein, Hsp90." Eur J Biochem **255**(3): 611-7.
- Stankiewicz, P. J., M. J. Gresser, et al. (1987). "2,3-diphosphoglycerate phosphatase activity of phosphoglycerate mutase: stimulation by vanadate and phosphate." Biochemistry **26**(5): 1264-9.
- Tracey, A. S. and M. J. Gresser (1988). "Vanadium (V) oxyanions: interactions of vanadate with 1,1,1-Tris (hydroxymethyl) ethane and with buffer Tris (hydroxymethyl) aminoethane." Inorg Chem **27**: 1269-1275.
- Tiago, T., M. Aureliano et al. (2002). "Vanadate oligomers interaction with phosphorylated myosin." Inorg Chim Acta **339**: 317-321.
- Vyskocil, F., J. Teisinger et al. (1980). "A specific enzyme is not necessary for vanadate-induced oxidation of NADH." Nature **286**: 516-517.
- Wittenkeller, L., A. Abraha et al. (1990). "Vanadate interactions with bovine Cu,Zn-superoxide dismutase as probed by ^{51}V NMR spectroscopy." J Am Chem Soc **113**: 7872-7881.

CAPÍTULO IV

INIBIÇÃO DA ACTIVIDADE ATPásica DE MIOSINA POR DECAVANADATO

IV.1 – Introdução

A semelhança química do ortovanadato, VO_4^{3-} , com o ortofosfato, PO_4^{3-} , foi inicialmente considerada como sendo o factor responsável pela inibição de processos enzimáticos que envolvem hidrólise de um grupo fosfato (PO_4^{3-}), nomeadamente a ATPase da miosina [Goodno, 1982], ou a transferência de um grupo fosforilo (PO_3^-), como é o caso da Ca^+ -ATPase [Dupont e Bennet, 1982; Pick, 1982]. No entanto, as soluções de vanadato apresentam, para além da espécie monomérica de vanadato, uma variedade de outras espécies oligoméricas que podem influenciar igualmente a actividade enzimática. Uma preocupação realística no estudo da acção do vanadato nos sistemas biológicos deve obviamente incidir na identificação das espécies de vanadato envolvidas na inibição bem como na contribuição de cada espécie para o efeito observado.

IV.1.1 – O inibidor ortovanadato

Apesar de muitos investigadores não especificarem as espécies activas de vanadato, os seus estudos são muitas vezes realizados a concentrações de vanadato tão baixas que a espécie maioritária em solução, é a monomérica [Chasteen, 1983]. Na Tabela IV.1, apresentam-se constantes de inibição do vanadato para algumas enzimas, atribuídas à forma monomérica sendo a Na^+/K^+ -ATPase a mais fortemente inibida ($K_i = 4 \text{ nM}$).

Ainda assim, mesmo para concentrações de vanadato baixas, por vezes não é possível atribuir a inibição unicamente à espécie monomérica. Por exemplo, uma solução de vanadato de concentração 60 μM a pH 7,0 e 1 M KCl, contém cerca de 1,2 μM de divanadato e 0,3 μM de tetravanadato, livres em solução [Stankiewicz *et al.*, 1995]. Dada a rápida troca química que ocorre entre as espécies de vanadato lábeis (V_1 , V_2 , V_4 e V_5) não é possível isolar um anião específico para testar a inibição [Crans *et al.*, 1990a]. De forma a identificar o inibidor são necessários estudos de titulação em que os efeitos na actividade das enzimas deverão ser correlacionados com alterações na concentração das diferentes espécies de vanadato lábeis [Crans e Schelble, 1990]. Com base neste procedimento têm sido identificadas enzimas que são inibidas ou estimuladas pelas espécies dimérica e tetramérica de vanadato.

Tabela IV.1 – Valores de constantes de inibição (K_i) ou de IC_{50} para algumas enzimas, atribuídas à forma monomérica de vanadato [adaptado de Chasteen, 1983].

<i>Enzima</i>	<i>K_i ou IC_{50} (M)</i>
Ribonuclease (linfócitos humanos)	1×10^{-5}
Fosfatase ácida (fígado humano)	2×10^{-7}
Fosfatase ácida (embrião de trigo)	$6,7 \times 10^{-7}$
Fosfatase alcalina (Escherichia coli)	4×10^{-7}
Na^+ , K^+ -ATPase (rim de cão)	4×10^{-9}
ATPase de miosina (músculo esquelético de coelho)	$< 10^{-6}$
Ca^{2+} -ATPase (RS de músculo esquelético de coelho)	50×10^{-6}
Ca^{2+} -ATPase (glóbulo vermelho humano)	$1,5 \times 10^{-6}$

IV.1.2 – Os inibidores di- e tetravanadato

A analogia estrutural entre o divanadato e o pirofosfato sugere que o $\text{V}_2\text{O}_7^{4-}$ tem o potencial de interactuar com sítios de ligação de cofactores tais como o NAD, NADP, FAD e CoA. Curiosamente, o divanadato mostra ser um inibidor competitivo relativamente ao

NADP, $K_i \sim 0,12$ mM, mas um fraco inibidor competitivo para o NAD, $K_i \sim 15$ mM, da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase [Crans e Schelble 1990]. O divanadato, também se mostrou um inibidor competitivo da fructose-1,6-bifosfato aldolase, $K_i \sim 0,23$ mM [Crans *et al.*, 1992a] e um inibidor não-competitivo da glicerol-3-fosfato desidrogenase [Crans e Simone, 1991]. Um efeito ainda mais potente foi observado com a fosfoglicerato mutase (PGM). Esta enzima liga o V_2 a cada uma das suas duas subunidades com uma constante de dissociação intrínseca de 4×10^{-6} M [Stankiewicz *et al.*, 1987].

Aparentemente, o vanadato tetramérico, $V_4O_{12}^{4-}$, não tem uma analogia estrutural com substratos ou cofactores e como tal, durante algum tempo acreditou-se ser uma forma inactiva de vanadato. Em 1990, estudos com a enzima 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) indicaram, pela primeira vez, que o V_4 actua como inibidor competitivo em relação ao substrato, e não-competitivo com respeito ao cofactor com constantes na ordem dos mM [Crans *et al.*, 1990b]. Hoje, conhecem-se outras enzimas que são inibidas pelo tetravanadato, incluindo a glucose-6-fosfato desidrogenase [Crans *et al.*, 1990b], fosfoglucone isomerase [Crans, 1993], frutose 1,6-bisfosfato aldolase [Crans *et al.*, 1992b] e fosfolipase de fosfatidil inositol [Campbell e Thatcher, 1992]. Na maioria dos casos, a afinidade do V_4 para as enzimas é modesta, com um K_i que varia entre concentrações de micro a milimolar. Uma excepção, é a afinidade do V_4 pela enzima superóxido dismutase (SOD) com um $K_i \sim 0,5$ μ M [Wittenkeller *et al.*, 1991]. Contudo, qualquer afinidade destas enzimas para V_4 é surpreendente, considerando a sua estrutura cíclica, e pelo facto de, por exemplo, o vanadato pentamérico (V_5) não interaccionar com nenhuma destas enzimas.

IV.1.3 – O inibidor decavanadato

De entre as formas de vanádio no estado livre ou complexado, a espécie decamérica ($V_{10}O_{28}^{6-}$) é de todos os inibidores conhecidos, um dos mais potentes. Na Tabela IV.2,

apresentam-se constantes de inibição (K_i) ou valores de IC_{50} do vanádio para algumas enzimas, atribuídas à forma decamérica de vanadato. De todos os exemplos conhecidos, o decavanadato parece ligar-se preferencialmente a sítios de ligação de polifosfatos de enzimas quer no domínio de ligação do substrato, quer no domínio alostérico.

Já em 1973, foi referido que a espécie oligomérica de vanádio (V), decavanadato, inibia a adenilato cinase de músculo esquelético de coelho [DeMaster e Mitchell, 1973]. Mais tarde, estudos cristalográficos indicaram que a susceptibilidade da adenilato cinase ao decavanadato se poderia dever a um domínio carregado positivamente no sítio activo da enzima onde se ligaria o polianião [Pai *et al.*, 1977]. O decavanadato, contrariamente ao vanadato monomérico, é um bom inibidor não-competitivo de várias cinases. Por exemplo, mostrou-se um bom inibidor não-competitivo da hexocinase relativamente ao ATP e à glucose e da fosfofructocinase de uma forma alostérica ligando-se aos sítios inibitórios de polianiões (ATP, citrato, glicerato-3P ou fosfoenolpiruvato) [Boyd *et al.*, 1985]. Verificou-se também, que a cinase dependente de AMPc é inibida de uma forma não-competitiva em relação ao ATP e de uma forma competitiva em relação ao substrato [Pluskey *et al.*, 1997]. O mecanismo de inibição proposto para o substrato da cinase é de alguma forma diferente dos mecanismos até então propostos. Foi sugerido que o decavanadato se ligava ao próprio substrato, um péptido de 7 aminoácidos contendo duas argininas e uma serina, prevenindo-o de se ligar à proteína. Este resultado demonstrou que sequências de aminoácidos específicas podem levar à ligação de oligómeros poli-aniónicos.

Outras evidências da interacção de decavanadato com sítios de ligação de polifosfatos são a inibição de reacções relacionadas com o metabolismo de inositol fosfato [Stankiewicz *et al.*, 1995] (ver Tabela IV.2) ou a inibição da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático. Neste último caso, foi sugerido que contrariamente ao vanadato monomérico que se liga ao local de fosforilação, o decavanadato interacciona com o sítio de ligação do nucleótido [Hua *et al.*, 2000]. Mais recentemente, foi demonstrado que o

INIBIÇÃO DA ACTIVIDADE ATPásica DE MIOSINA POR DECAVANADATO

decaavanadato inibe a proteína MutS, envolvida no processo de reparação de ADN e pertencente à superfamília das ABC (“ATP Binding Casset”) ATPases [Pezza *et al.*, 2002]. A inibição da hidrólise de ATP por esta enzima parece ocorrer por um mecanismo não-competitivo em que o decavanadato se liga ao motivo Walker A envolvido na coordenação dos fosfatos do ATP.

Tabela IV.2 – Valores de constantes de inibição (K_i) ou de IC_{50} para algumas enzimas, atribuídas à forma decamérica de vanadato.

	K_i (M)	IC_{50} (M)	Referência
Adenilato cinase (músculo de coelho)	1×10^{-6}		DeMaster e Mitchell, 1973
Fosforilase b (músculo esquelético coelho)	4×10^{-6}		Carreras <i>et al.</i> , 1980
Fosfofrutocinase (músculo de coelho)		10×10^{-6}	Boyd <i>et al.</i> , 1985
Hexocinase (<i>S. cerevisiae</i> e músculo de coelho)		62×10^{-6}	Boyd <i>et al.</i> , 1985
Ca^{2+} -ATPase (retículo sarcoplasmático de músculo esquelético de coelho)	50×10^{-6}		Varga <i>et al.</i> , 1985
6-fosfofructo-2-cinase/fructose-2,6-bisfosfatase	27×10^{-6}		Kountz <i>et al.</i> , 1986
Frutose 1,6-bisfosfato aldolase (músculo de coelho)	$0,92 \times 10^{-3}$		Crans <i>et al.</i> , 1992b
Cinase dependente de AMP cíclico			
ATP	$0,8 \times 10^{-3}$		Pluskey <i>et al.</i> , 1997
Substrato	$1,4 \times 10^{-3}$		
Enzimas envolvidas no metabolismo do inositol-Pi			
3-Cinase inositol-1,4,5-trifosfato	5×10^{-6}		Stankiewicz <i>et al.</i> , 1995
5-Fosfatase inositol-1,4,5-trifosfato	$1,5 \times 10^{-6}$		
5-Fosfatase inositol-1,3,4,5-tetrafosfato	$0,6 \times 10^{-6}$		
Ribonuclease A		$0,27 \times 10^{-6}$	Messmore e Raines, 2000
MutS (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>E.coli</i>)	$2,2 \times 10^{-6}$		Pezza <i>et al.</i> , 2002

Parece, pois, claro que as enzimas inibidas por decavanadato possuem como factor comum a capacidade de ligar grupos fosforilo. No entanto, a inibição por V_{10} não é de

forma alguma, uma propriedade geral de todas essas enzimas. Por exemplo, a creatina cinase, a piruvato cinase, ou a galactocinase são todas enzimas que ligam grupos fosforilo em múltiplos locais e, no entanto, não são afectadas por decavanadato [Boyd *et al.*, 1985]. Assim, a capacidade do decavanadato inibir uma determinada enzima não pode ser prevista simplesmente através das propriedades macroscópicas desta, devendo ser importante as características estruturais e conformacionais das enzimas.

IV.1.4 – Oligómeros de vanadato e a ATPase de miosina

No caso particular da ATPase de miosina, está descrito que não apenas a espécie monomérica, mas também as espécies oligoméricas de vanadato, nomeadamente di-, tetra- e hexa-vanadatos interagem com a enzima [Ringel *et al.*, 1990; Aureliano e Madeira, 1998]. A interacção das espécies oligoméricas, contrariamente à monomérica, não depende da formação de um complexo ternário com o nucleótido no local activo. Foi também sugerido que as espécies tetramérica e decamérica de vanadato interactuam com a miosina afectando a sua actividade ATPásica bem como a do complexo actomiosina [Aureliano, 2000]. Mais recentemente, num estudo publicado pelo nosso laboratório em que se usou uma preparação de miosina parcialmente purificada, em condições próximas das fisiológicas sob o ponto de vista da regulação da contracção contendo cinases, fosfatases, e actina, verificou-se que a espécie decamérica de vanadato difere das outras espécies oligoméricas no que diz respeito à forte interacção com a enzima e inibição da ATPase da miosina [Tiago *et al.*, 2002].

Apesar de alguns estudos terem sido desenvolvidos no sentido de uma melhor compreensão da contribuição das espécies oligoméricas de vanadato na inibição da ATPase de miosina, pouco se sabe acerca dos mecanismos de inibição envolvidos especialmente na actividade ATPásica de miosina estimulada por F-actina. Provavelmente, o facto de as soluções de “metavanadato” e “decavanadato” para as concentrações (na

ordem dos mM) que foram usadas nos estudos descritos apresentarem uma mistura de espécies oligoméricas, que não partilham as mesmas propriedades inibitórias em relação à enzima, tenha dificultado a determinação das constantes de inibição bem como a análise do tipo de inibição.

IV.1.5 – Objectivos

O estudo que se apresenta neste capítulo teve por base a análise previamente obtida por espectroscopia de absorção UV-vis e de ^{51}V -RMN onde se mostrou claramente que, contrariamente às outras espécies oligoméricas que se interconvertem muito rapidamente quando diluídas no meio de reacção, a espécie decamérica nas condições experimentais seleccionadas possui um tempo de vida suficientemente longo para que se possa determinar o seu efeito na actividade da enzima em estudo. Assim, no presente capítulo analisaram-se os efeitos promovidos pela solução de decavanadato nas actividades ATPásicas de miosina e de subfragmento-1 estimuladas por actina, procurando determinar-se: (i) o efeito do pH (6,0; 6,8 e 7,0) na inibição da actividade ATPásica de S1; (ii) a estequiometria de ligação $V_{10}/S1$; (iii) a constante de inibição para a espécie molecular; e (iv) o mecanismo de inibição relativamente aos ligandos naturais da enzima, isto é, ATP e actina.

IV.2 – Materiais e Métodos

IV.2.1 – Estudos Cinéticos

As actividades de estado estacionário da Mg^{2+} -ATPase de miosina ou de S1 foram medidas espectrofotometricamente, a 25 °C, usando o sistema de enzimas acopladas piruvato cinase/lactato desidrogenase, nas condições experimentais previamente descritas na secção II.2.5.2 do Capítulo II. As soluções de vanadato, nomeadamente decavanadato e metavanadato foram adicionadas aos ensaios a partir das soluções stock concentradas (50 mM) ou diluídas 10 vezes, preparadas tal como se descreve no Capítulo III, secção III.2.1. A alteração de pH do meio de reacção após adição das soluções de metavanadato ou decavanadato foi sempre inferior a 0,05 unidades de pH.

Uma vez que está descrito que o vanadato pode promover a clivagem do fosfoenol-piruvato (PEP) com a concomitante libertação de piruvato [Aureliano *et al.*, 1994], o sistema de detecção de enzimas acopladas foi testado na ausência de miosina ou de subfragmento-1 e na presença das soluções de vanadato. Para as concentrações de metavanadato ou decavanadato usadas (0-150 μ M vanadato total) no presente estudo o sistema não é afectado, confirmado pela rápida diminuição (indicando uma boa resposta do sistema) e posterior estabilidade (indicando que não há conversão de NADH a NAD) da absorção a 340 nm após adição de 40 μ M ADP. Este estudo exclui adicionalmente a possibilidade de ocorrer uma reacção química entre o vanadato e o cofactor NADH com a produção de vanadilo (+4) e NAD tal como foi previamente sugerido para as reacções monitorizadas em tampão Hepes [Vyskocil *et al.*, 1980].

IV.2.2 – Tratamento de resultados

Os parâmetros cinéticos (IC_{50} , K_i e I_{max}) foram determinados pelo ajuste não-linear dos mínimos quadrados dos dados experimentais à equação hiperbólica do tipo Michaelis-Menten [IV.1] usando o programa Origin 5.0TM:

$$V/V_0 = 1 - [I_{\max} \cdot X / (K_i + X)] \quad [IV.1]$$

em que V_0 representa a actividade inicial na ausência do inibidor, I_{\max} corresponde ao valor máximo de inibição, V representa a actividade inicial na presença de uma determinada concentração de inibidor e K_i é a constante de dissociação do sitio inibitório na miosina.

IV.3 – Resultados e Discussão

IV.3.1 – Inibição por decavanadato da actividade ATPásica da miosina estimulada por actina

As actividades ATPásicas estimuladas por actina quer da miosina quer do subfragmento-1 monitorizadas na presença da solução de decavanadato mostram que as actividades enzimáticas são progressivamente inibidas com o aumento da concentração de vanadato (Figura IV.1). A inibição é atingida em menos de 15 segundos, demonstrado pela linearidade da cinética da actividade ATPásica após homogeneização manual, desde o ponto inicial até um período superior a 10 minutos. Para além disso, a titulação da actividade ATPásica da enzima com 3-4 adições sucessivas de decavanadato no mesmo ensaio (com um intervalo de 3-5 minutos entre cada adição) origina inibições idênticas às obtidas por uma única adição de decavanadato para as mesmas concentrações totais de vanadato.

Apesar da espécie decamérica de vanadato ser um oligómero menos lábil que os restantes oligómeros (V_2 , V_4 e V_5), permanecendo relativamente intacto para estudos de duração limitada, foi demonstrado no capítulo anterior que após diluição no meio de reacção (pH 7.0), a solução de decavanadato pode conter aproximadamente 10% de vanadato monomérico para as concentrações (0-150 μM) e tempo de reacção (< 30 min) utilizados. Desta forma, a pH 7,0, uma solução de decavanadato com 150 μM (vanádio total) conterà cerca de 13,5 μM de espécie decamérica e cerca de 15 μM de vanadato monomérico. Ainda assim, averiguou-se o efeito de soluções de metavanadato até uma concentração de vanadato total de 150 μM (contendo apenas a espécie monomérica) na actividade ATPásica estimulada por actina do subfragmento-1 de miosina. Uma vez que a solução de metavanadato produziu menos de 20% de inibição para a concentração máxima de vanadato testada, não afectando a actividade ATPásica para concentrações inferiores a

50 μM , podemos atribuir a inibição observada na presença de solução de decavanadato exclusivamente à espécie decamérica de vanadato.

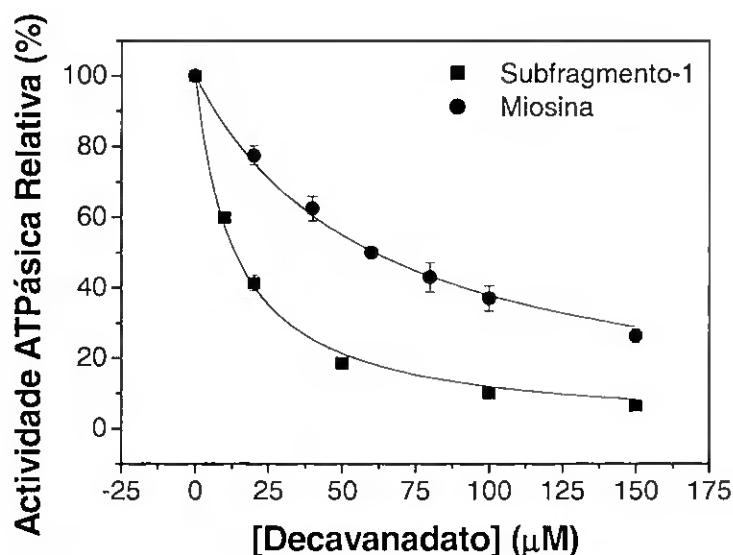


Figura IV.1 – Inibição por decavanadato das actividades ATPásicas estimuladas por actina da miosina (círculos) ou do subfragmento-1 (quadrados). A actividade é expressa como percentagem da actividade controlo na ausência de decavanadato. Os ensaios foram realizados usando o sistema de enzimas acopladas (como anteriormente descrito) com 50 $\mu\text{g/ml}$ de enzima e 1 μM F-actina, a 25 $^{\circ}\text{C}$, num meio contendo 20 mM HEPES (pH 7,0), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl_2 e 2 mM ATP. As linhas resultam do ajuste não-linear dos mínimos quadrados dos dados experimentais (que representam a média de pelo menos 3 ensaios diferentes) à equação IV.1 (como descrito na secção IV.2.2 dos Materiais e Métodos) com os seguintes valores para os parâmetros: $I_{\text{max}} = 100$ e $\text{IC}_{50} = 6,11 \pm 0,74 \mu\text{M}$ (para a espécie molecular) para a miosina; $\text{IC}_{50} = 0,85 \pm 0,02 \mu\text{M}$ (para a espécie molecular) para o subfragmento-1.

Pela análise do ajuste não-linear dos mínimos quadrados dos dados experimentais à equação IV.1 obtiveram-se os valores de IC_{50} , isto é, a concentração de decavanadato necessária para produzir 50% de inibição das actividades ATPásicas estimuladas por actina. Para a miosina, o valor de IC_{50} foi de $61,1 \pm 7,4 \mu\text{M}$ vanadato total ($6,11 \mu\text{M}$ para a espécie molecular) enquanto que para o subfragmento-1 foi de $13,6 \pm 1,4 \mu\text{M}$ vanadato total ($1,36 \mu\text{M}$ para a espécie molecular).

Apesar do valor de pKa do $\text{HV}_{10}\text{O}_{28}^{5-}$ ser 6,14 [Pettersen *et al.*, 1983], não se verificou uma variação significativa dos valores de IC_{50} entre pH 6,0 e pH 7,0 (Tabela IV.3). Aparentemente, as formas $\text{HV}_{10}\text{O}_{28}^{5-}$ e $\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$ têm afinidades semelhantes para o subfragmento-1 da miosina.

Tabela IV.3 – Efeito do pH na inibição da actividade ATPásica de S1 por decavanadato. Os ensaios foram realizados usando um sistema de enzimas acopladas (tal como descrito anteriormente), a 25 °C, com 50 µg/ml de S1 e 1 µM F-actina num meio contendo 20 mM Hepes ou 20 mM Mes, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl_2 e 2 mM ATP. Os valores de IC_{50} foram obtidos pelo ajuste não-linear dos dados experimentais à equação IV.1 (como descrito na secção IV.2.2 dos Materiais e Métodos) e representam a média de pelo menos 3 ensaios diferentes.

Tampão	pH	IC_{50} (µM)
20 mM Hepes	7,0	$0,85 \pm 0,02$
20 mM Hepes	6,8	$1,21 \pm 0,09$
20 mM Mes	6,0	$1,08 \pm 0,09$

Em ensaios de actividade ATPásica com o complexo actomiosina, é desejável manter-se uma baixa força iónica de forma a fortalecer a interacção da actina com a miosina [Margossian e Lowey, 1982], pelo que a utilização da molécula intacta de miosina não é apropriada uma vez que tende a polimerizar em filamentos. Estes filamentos não se misturam convenientemente, tendem a precipitar no fundo da cuvette de ensaio, dispersam uma grande quantidade de luz (interferindo com a medição espectroscópica) e interactuam de uma forma heterogénea com os filamentos de actina. Assim, e de modo a obter uma melhor reprodutibilidade de resultados, os estudos que a seguir se apresentam foram efectuadas apenas com o fragmento solúvel, S1.

IV.3.2 – Efeito da actina na inibição da actividade ATPásica de S1 por decavanadato

Com o intuito de se esclarecer se a inibição da actividade ATPásica estimulada por actina poderia ser devida a uma competição entre o decavanadato e a F-actina para a ligação ao

S1, estudou-se a inibição da actividade ATPásica de S1 para diferentes concentrações de F-actina. O aumento da concentração de F-actina de 0,5 a 4 μM , mantendo a concentração de S1 fixa (0,45 μM) no ensaio, não aumentou a concentração de decavanadato necessária para inibir a actividade ATPásica em 50% mas, pelo contrário, diminui-a ligeiramente de $0,75 \pm 0,07 \mu\text{M}$ (relativo à espécie molecular) para $0,55 \pm 0,05 \mu\text{M}$ (Tabela IV.1). Desta forma podemos excluir que a inibição seja o resultado de uma competição directa entre o decavanadato e a F-actina para a ligação à miosina.

Tabela IV.4 – Efeito da concentração de actina nas constantes de inibição do V_{10} relativa à actividade ATPásica de S1. Os ensaios foram realizados a 25 °C usando o sistema de enzimas acopladas (previamente descrito) com 0,45 μM S1 num meio contendo 20 mM Hepes (pH 7.0), 2 mM ATP e 2,5 mM MgCl_2 . Os valores de IC_{50} correspondem à média dos resultados obtidos com pelo menos três preparações de S1 e F-actina.

[F-actina] (μM)	IC_{50} (μM)
0	$12,5 \pm 0,25$
0,5	$0,75 \pm 0,06$
1,0	$0,60 \pm 0,06$
2,0	$0,58 \pm 0,06$
4,0	$0,55 \pm 0,05$

Por outro lado, verifica-se que o V_{10} inibe a actividade ATPásica de S1 na ausência de F-actina, mas com um valor de IC_{50} de 12,5 μM , ou seja, aproximadamente 20 vezes superior ao obtido na presença de 2-4 μM F-actina. Estes resultados sugerem que o sítio de ligação do V_{10} responsável pela inibição da actividade ATPásica de S1 se situa provavelmente num domínio funcional da proteína que se altera após ligação do filamento de actina, como por exemplo, o sítio catalítico ou o domínio de transdução de energia que interliga o sítio catalítico e o de ligação à actina.

IV.3.3 – Dependência do valor de IC₅₀ com a concentração de S1

Uma vez que se constatou que os valores de IC₅₀ de inibição pelo decavanadato da actividade ATPásica de S1 estimulada por actina correspondem a uma razão molar V₁₀/S1 de 1,0-1,5/1,0, estudou-se a dependência do valor de IC₅₀ com a concentração de S1, mantendo-se constante a razão entre a concentração de actina e S1. Como se pode verificar na Figura IV.2, os valores de IC₅₀ são linearmente dependentes com a concentração de S1 apresentando um declive de $1,06 \pm 0,12 \mu\text{M V}_{10} / \mu\text{M S1}$. Estes resultados mostram assim que a inibição da actividade ATPásica de S1 estimulada por actina resulta da ligação da molécula de V₁₀ a um sítio inibitório de alta afinidade por molécula de subfragmento-1 de miosina.

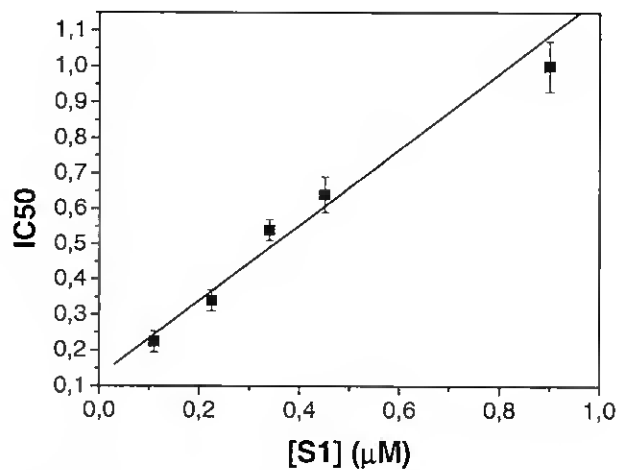


Figura IV.2 – Dependência do IC₅₀ com a concentração de S1 (0,11 – 0,9 μM), mantendo uma razão constante entre a concentração de actina / S1 de 4,4. Os ensaios foram realizados usando o sistema de enzimas acopladas (como anteriormente descrito) com 2 mM ATP a 25 °C, num meio contendo 20 mM Hepes (pH 7.0), 25 mM KCl e 2.5 mM MgCl₂.

IV.3.4 - Efeito de ATP na inibição da actividade ATPásica de S1 por decavanadato

Para analisar o tipo de inibição produzido pelo V₁₀ com respeito ao substrato, a inibição da actividade ATPásica de S1 foi determinada para diferentes concentrações de ATP. Os resultados obtidos apresentam-se na Figura IV.3-A, sob a forma de uma gráfico de Hanes

([Substrato]/ v versus [Inibidor]). Apesar da possibilidade de coexistência de ambas as espécies decamérica e monomérica na solução de decavanadato, a determinação do mecanismo de inibição não foi dificultado, uma vez que se verificou que apenas o V_{10} é a espécie efectiva na inibição da actividade ATPásica de S1 estimulada por actina.

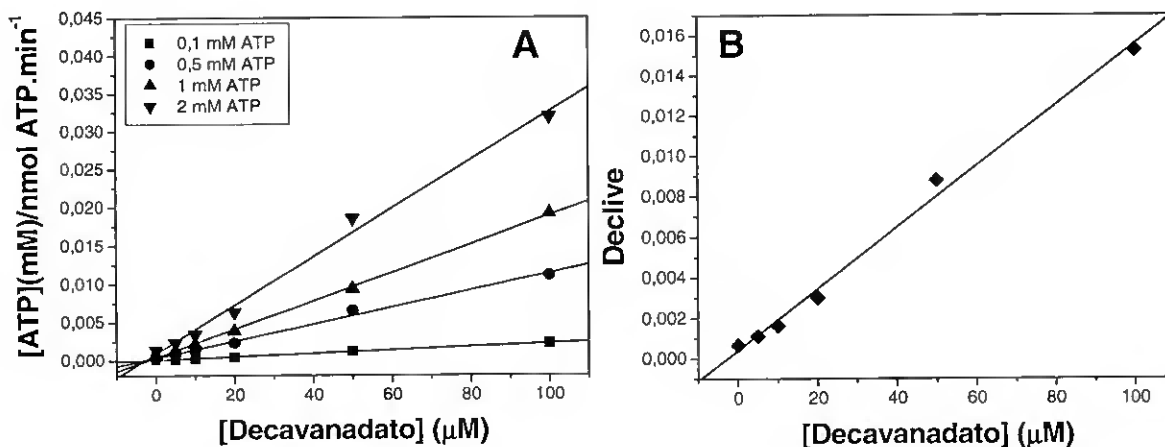


Figura IV.3 – Inibição por decavanadato da actividade ATPásica de S1 estimulada por actina. Os ensaios foram realizados usando o sistema de enzimas acopladas (como anteriormente descrito) com $0,45 \mu\text{M}$ ($50 \mu\text{g/ml}$) S1 e $2 \mu\text{M}$ F-actina, a 25°C , num meio contendo 20 mM Hepes (pH 7.0), 25 mM KCl e $2,5 \text{ mM}$ MgCl_2 . (A) Gráfico de Hanes da $[\text{ATP}]/v$ versus concentração de decavanadato até $100 \mu\text{M}$ (vanádio total), isto é, até $10 \mu\text{M}$ V_{10} , para concentrações de ATP de $0,1 \text{ mM}$ (quadrados), $0,5 \text{ mM}$ (círculos), 1 mM (triângulos) e 2 mM (triângulos invertidos). (B) Gráfico dos declives obtidos do gráfico de Hanes versus [decavanadato].

O padrão obtido é claramente indicativo de que a inibição pelo V_{10} é do tipo não-competitiva relativamente ao ATP, confirmando-se a tendência geral da espécie decamérica seguir um mecanismo de inibição não-competitivo como se verifica, por exemplo, para várias cinases [Boyd *et al.*, 1985; Pluskey *et al.*, 1997] ou para a proteína MutS de *E coli* [Pezza *et al.*, 2002]. Este tipo de inibição envolve um sítio de ligação distinto do local activo e como tal a inibição não pode ser superada pelo aumento da concentração de ATP. Como consequência o V_{max} , mas não o K_m , diminui porque o inibidor e o substrato não afectam a ligação de cada um e, como tal, todos os declives

convergem num só ponto no eixo das ordenadas [Wilson e Walker, 2000]. Assim, a equação de Hanes [IV.2] será dada por:

$$[ATP]/v = K_m/V_{max} + [ATP]/V_{max} (1+([decavanadato]/K_i)) \quad [IV.2]$$

Uma vez diagnosticado o tipo de inibição, o valor da constante de inibição (K_i) pode ser facilmente obtido através do gráfico dos declives adquiridos para as diferentes concentrações de ATP em função da concentração de inibidor (Figura IV.3-B). Pela intercepção com o eixo das ordenadas obtém-se uma constante de inibição, K_i de $0,27 \pm 0,05 \mu\text{M}$ V_{10} ou $2,7 \pm 0,5 \mu\text{M}$ vanadato total. Este valor encontra-se dentro da gama de valores de K_i usualmente encontrados para enzimas inibidas por V_{10} tais como algumas cinases, RNase A, ou proteína MutS (Tabela IV.2).

IV.4 - Conclusões

Os estudos cinéticos apresentados neste capítulo demonstraram que a espécie decamérica de vanadato, contrariamente à espécie monomérica, é capaz de inibir as actividades ATPásicas da miosina ou do subfragmento-1 de miosina estimuladas por actina, com um IC_{50} na ordem dos micromolar em condições próximas das fisiológicas. Estes resultados vieram confirmar, assim, a hipótese inicial de que a inibição que se verifica na actividade ATPásica da miosina estimulada por actina na presença de concentrações de vanadato na gama dos milimolar se deve à presença de espécies oligoméricas e não à espécie monomérica de vanadato.

A análise cinética da inibição revelou um mecanismo não-competitivo quer com a actina, quer com o ATP, resultante da interacção do V_{10} com um único sítio de ligação inibitório por molécula de subfragmento-1 de miosina. Este sítio de ligação do V_{10} situa-se provavelmente num domínio funcional da proteína que se altera após ligação do filamento de actina. O tipo de inibição pelo V_{10} parece seguir assim a tendência geral da espécie decamérica actuar por um mecanismo de inibição não-competitivo e além disso, a constante de inibição calculada ($K_i = 0,27 \pm 0,05 \mu M$) situa-se dentro da gama de valores de K_i usualmente encontrados para enzimas inibidas por V_{10} .

IV.5 – Referências Bibliográficas

- Aureliano, M., J. Leta, et al. (1994). "The cleavage of phosphoenolpyruvate by vanadate." Biochem Biophys Res Commun **201**(1): 155-9.
- Aureliano, M. and V. M. Madeira (1994). "Vanadate oligoanions interact with the proton ejection by the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum." Biochem Biophys Res Commun **205**(1): 161-7.
- Aureliano, M. (2000). "Vanadate oligomer interactions with myosin." J Inorg Biochem **80**(1-2): 141-3.
- Boyd, D. W., K. Kustin, et al. (1985). "Do vanadate polyanions inhibit phosphotransferase enzymes?" Biochim Biophys Acta **827**(3): 472-5.
- Carreras, J., R. Bartrons et al. (1980). "Vanadate inhibits 2,3-bisphosphoglycerate dependent phosphoglycerate mutase but does not affect the 2,3-bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase." Biochem Biophys Res Commun **96**: 1267-1273.
- Campbell, A. S. and G. R. J. Thatcher (1992). "Tetravanadate is an inhibitor of phosphatidyl inositol-specific phospholipase-c." Bioorg Med Chem Lett **2**: 655-658.
- Chasteen, N. D. (1983). "The biochemistry of vanadium." Struct Bonding **53**: 105-138.
- Crans, D. C., C. D. Rithner et al. (1990a). "Application of time-resolved V-51 NMR for quantitation of kinetic exchange pathways between vanadate monomer, dimer, tetramer, and pentamer." J Am Chem Soc **112**: 2901-2908.
- Crans, D. C., E. M. Willging et al. (1990b). "Vanadate tetramer as the inhibiting species in enzyme-reactions *in vitro* and *in vivo*." J Am Chem Soc **112**: 427-432.

- Crans, D. C. and S. M. Schelble (1990). "Vanadate dimer and tetramer both inhibit glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*." Biochemistry **29**(28): 6698-706.
- Crans, D. C. and C. M. Simone (1991). "Nonreductive interaction of vanadate with an enzyme containing a thiol group in the active site: glycerol-3-phosphate dehydrogenase." Biochemistry **30**(27): 6734-41.
- Crans, D. C., K. Sudhakar, et al. (1992a). "Interaction of rabbit muscle aldolase at high ionic strengths with vanadate and other oxoanions." Biochemistry **31**(29): 6812-21.
- Crans, D. C., K. Sudhakar, et al. (1992b). "Interaction of rabbit muscle aldolase at high ionic strengths with vanadate and other oxoanions." Biochemistry **31**(29): 6812-21.
- Crans, D. C. (1993). "Polyoxometalates: From Platonic Solids to Anti-Retroviral Activity." (Müller, A. and M. T. Pope Eds.) Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 399-406.
- DeMaster, E. G. and A. Mitchell (1973). "A comparison of arsenate and vanadate as inhibitors or uncouplers of mitochondrial and glycolytic energy metabolism." Biochemistry **12**(19): 3616-21.
- Dupont, Y. and N. Bennett (1982). "Vanadate inhibition of the Ca²⁺-dependent conformational change of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase." FEBS Lett **139**(2): 237-40.
- Goodno, C. C. (1982). "Myosin active-site trapping with vanadate ion." Methods Enzymol **85 Pt B**: 116-23.

- Hua, S., G. Inesi, et al. (2000). "Distinct topologies of mono- and decavanadate binding and photo-oxidative cleavage in the sarcoplasmic reticulum ATPase." J Biol Chem **275**(39): 30546-50.
- Kountz, P. D., R. W. McCain, et al. (1986). "Hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: phosphate dependence and effects of other oxyanions." Arch Biochem Biophys **251**(1): 104-13.
- Margossian, S. S. and S. Lowey (1982). "Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle." Methods Enzymol **85 Pt B**: 55-71.
- Messmore, J. M. and R. T. Raines (2000). "Decavanadate inhibits catalysis by ribonuclease A." Arch Biochem Biophys **381**(1): 25-30.
- Pai, E. F., W. Sachsenheimer, et al. (1977). "Substrate positions and induced-fit in crystalline adenylate kinase." J Mol Biol **114**(1): 37-45.
- Petterson, L., B. Hedman et al. (1983). "Multicomponent polyanions." Chem Scripta **22**: 254-264.
- Pezza, R. J., M. A. Villarreal, et al. (2002). "Vanadate inhibits the ATPase activity and DNA binding capability of bacterial MutS. A structural model for the vanadate-MutS interaction at the Walker A motif." Nucleic Acids Res **30**(21): 4700-8.
- Pluskey, S., M. Mahroof-Tahir, et al. (1997). "Vanadium oxoanions and cAMP-dependent protein kinase: an anti-substrate inhibitor." Biochem J **321 (Pt 2)**: 333-9.
- Pick, U. (1982). "The interaction of vanadate ions with the Ca-ATPase from sarcoplasmic reticulum." J Biol Chem **257**(11): 6111-9.
- Ringel, I., Y. M. Peyser, et al. (1990). "⁵¹V NMR study of vanadate binding to myosin and its subfragment 1." Biochemistry **29**(38): 9091-6.

- Stankiewicz, P. J., M. J. Gresser, et al. (1987). "2,3-diphosphoglycerate phosphatase activity of phosphoglycerate mutase: stimulation by vanadate and phosphate." Biochemistry **26**(5): 1264-9.
- Stankiewicz, P. J., A. S. Tracey, et al. (1995). "Inhibition of phosphate-metabolizing enzymes by oxovanadium(V) complexes." Met Ions Biol Syst **31**: 287-324.
- Tiago, T., M. Aureliano et al. (2002). "Vanadate oligomers interaction with phosphorylated myosin." Inorg Chim Acta **339**: 317-321.
- Varga, S., P. Csermely, et al. (1985). "The binding of vanadium (V) oligoanions to sarcoplasmic reticulum." Eur J Biochem **148**(1): 119-26.
- Vyskocil, F., J. Teisinger, et al. (1980). "A specific enzyme is not necessary for vanadate-induced oxidation of NADH." Nature **286**(5772): 516-7.
- Wilson, K. And J. Walker (2000). "Principles and Techniques of Practical Biochemistry." Fifth edition, Cambridge University Press, pp. 360-365.
- Wittenkeller, L., A. Abraha et al. (1991). "Vanadate interactions with bovine Cu,Zn-superoxide dismutase as probed by V-51 NMR-spectroscopy." J Am Chem Soc **113**: 7872-7881.

CAPÍTULO V

INTERACÇÃO DE DECAVANADATO COM MIOSINA: ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E DE DISPERSÃO DE LUZ

V.1 – Introdução

De todas as técnicas espectroscópicas disponíveis para estudar interações ligando-proteína, a fluorescência é provavelmente a que oferece a maior versatilidade de aplicações, devido à sua inerente sensibilidade e simplicidade de uso. É um fenómeno que envolve a emissão de radiação electromagnética alguns nanosegundos após absorção por um cromóforo apropriado. A fluorescência não é, contudo, um fenómeno de todas as moléculas biológicas e apesar de muitas proteínas, nucleótidos, entre outros, possuírem esta propriedade (i.e. intrínseca) por vezes não é apropriado fazer uso dela. Deste modo, muitas vezes é necessário incorporar (normalmente covalentemente) uma sonda fluorescente para visualizar uma reacção particular.

O espectro de emissão e excitação de cromóforos intrínsecos, extrínsecos e prostéticos pode fornecer informação sobre a conformação da proteína, interacção de um ligando e acessibilidade do cromóforo a supressores de fluorescência; a polarização da fluorescência pode ser usada para medir a velocidade das rotações “brownianas” e definir a orientação do cromóforo em sistemas cuja estrutura está organizada numa escala macroscópica; e a transferência de energia entre cromóforos pode ser usada como “régua molecular” para medir a distância entre eles. O sistema contráctil actomiosina em

particular tem fornecido um excelente objecto de estudo para aplicação de todas estas técnicas de fluorescência [Cooke, 1982; Thomas, 1987].

Uma outra ferramenta que tem sido amplamente usada na caracterização das propriedades de ligação do complexo actomiosina é a técnica de dispersão de luz (“light-scattering”). Esta técnica é, sobretudo, função da diferença entre o índice de refração da partícula em estudo e do meio de suspensão. A dispersão de luz é geralmente aplicada ao estudo do tamanho e da forma de polímeros, como por exemplo, a actina ou ao estudo de agregados macromoleculares, como é o caso da actomiosina [Cooper e Pollard, 1982].

V.1.1 – Espectroscopia de fluorescência: considerações gerais

A absorção da radiação electromagnética provoca a transição de um electrão para uma orbital molecular de maior energia, representado pela transição de S_0 a S_2 na Figura V.1. Este processo ocorre muito rapidamente (10^{-15} segundos) em relação a outros processos, e as posições dos núcleos da molécula não se alteram durante este tempo. Uma vez que a densidade da nuvem electrónica é diferente no estado excitado, os núcleos da molécula excitada bem como grupos carregados circundantes deixam de estar nas suas posições de equilíbrio. Estes grupos relaxam para as suas novas posições de equilíbrio através de uma transição não-radiativa, S_2 para S_1 , que requer aproximadamente 10^{-12} segundos. Seguidamente, vários processos podem competir para a transição do estado excitado de menor energia para o estado fundamental. O estado excitado pode decair pela emissão de um fóton, isto é, uma transição fluorescente, ou a sua energia pode ser dissipada em vibrações moleculares através de uma transição não-radiativa conhecida por conversão interna. Alternativamente, o spin de um electrão pode rodar, originando um estado excitado tripleto que pode decair via emissão de um fóton, isto é, fosforescência, ou por conversão interna. Sob condições apropriadas, como será discutido mais adiante, a energia

do estado excitado pode ser transferida para outro cromóforo num processo designada de Transferência de Energia de Förster [Lakowicz, 1999].

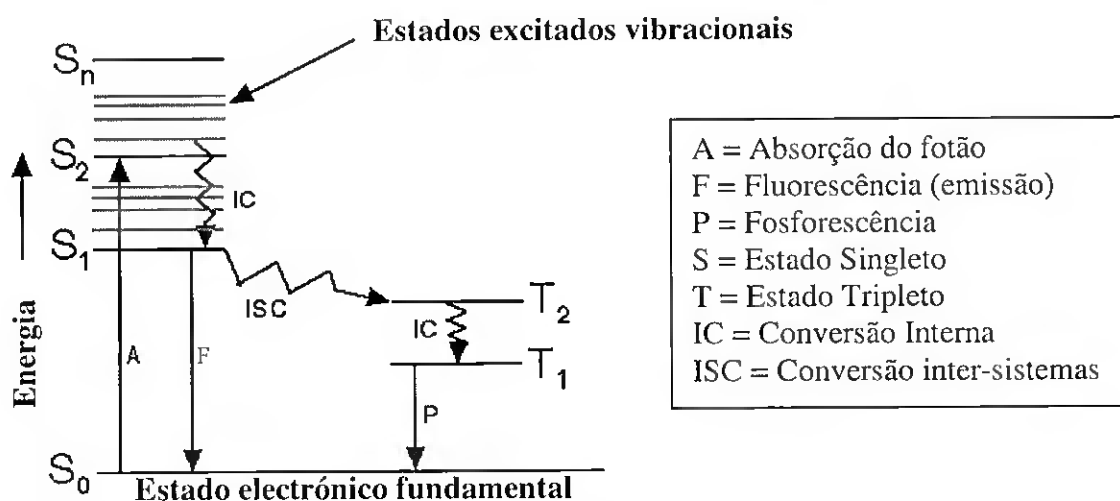


Figura V.1 – Uma forma de representação do diagrama de Jablonski.

O ambiente que rodeia o cromóforo no estado excitado pode afectar a sua fluorescência de diversas formas. A reorientação de grupos carregados determina parcialmente a quantidade de energia dissipada na transição de S_2 para S_1 , e como tal, determina a energia do fóton emitido numa transição radiativa de retorno ao estado fundamental. Grupos carregados também fornecem interações que aumentam a velocidade de conversão interna e, por isso, influenciam a quantidade de fluorescência emitida. Estes dois processos baseiam-se no facto do tempo de vida do estado excitado ser longo quando comparado com o período de vibração molecular. Como a absorção ocorre mais rapidamente do que uma vibração molecular, o espectro de fluorescência de uma molécula é mais sensível ao meio envolvente do que o espectro de absorção [Lakowicz, 1999].

A quantidade de fluorescência emitida é conhecida por rendimento quântico (Q), sendo este definido pelo número de fótons emitidos dividido pelo número de fótons absorvidos. Também pode ser definido pelas constantes:

$$Q = \Gamma / (\Gamma + K_{nr}) \quad [V.1]$$

onde Γ e K_{nr} representam as constantes de decaimento por um processo radiativo e não-radiativo, respectivamente. O rendimento quântico pode ser próximo da unidade se a constante de decaimento não-radiativa for muito inferior à constante de decaimento radiativa ($K_{nr} \ll \Gamma$) [Lakowicz, 1999].

Devido à escala temporal (nanossegundos) da fluorescência, a maioria das medições são de estado-estacionário em que a amostra é iluminada por um feixe de luz contínuo e a intensidade ou o espectro de emissão monitorizados. Quando a amostra é exposta à luz, o estado estacionário é atingido quase instantaneamente, e o espectro de fluorescência pode fornecer informação sobre o ambiente que rodeio o fluoróforo [Lakowicz, 1999]. Este tipo de medição tem sido largamente usada para estudar diversas proteínas contrácteis, nomeadamente a miosina e a actina, pelo que todos os estudos de fluorescência que se apresentam neste capítulo serão medições de estado-estacionário usando a fluorescência intrínseca ou a fluorescência de sondas incorporadas (extrínseca).

V.1.2 –Fluorescência intrínseca

A fluorescência intrínseca de aminoácidos específicos, em particular a do triptofano, tem demonstrado fornecer informação valiosa acerca do seu ambiente local nas proteínas e constituiu alguns dos primeiros sinais espectroscópicos da miosina. Werber e seus colaboradores [1972] descreveram pela primeira vez que a ligação de nucleótidos à miosina provoca um aumento da intensidade da fluorescência de triptofanos e um desvio da intensidade máxima para comprimentos de onda mais curtos. Verificou-se que durante a hidrólise de ATP a intensidade da fluorescência aumenta 17%. Este efeito não requer hidrólise uma vez que a ligação do ADP causa um aumento da fluorescência de apenas 6%. Por outro lado, a ligação do pirofosfato (PP_i) não produz alteração da intensidade, indicando que o nucleótido é necessário para alterar a fluorescência. Todas estas alterações

espectrais são consistentes com a mudança de um ou mais triptofanos de um ambiente polar para um não-polar após ligação do nucleótido. Empiricamente, estas alterações da fluorescência intrínseca têm contribuído para a descrição de alguns estados intermediários do ciclo de hidrólise de ATP pela miosina [Bagshaw *et al.*, 1974; Johnson e Taylor, 1978], embora o mecanismo (bem como os triptofanos envolvidos) permaneçam ainda por esclarecer.

V.1.3 – Fluorescência extrínseca

Os fluoróforos extrínsecos apresentam algumas vantagens em relação aos fluoróforos intrínsecos, embora o seu uso também possa levantar alguns problemas. As sondas podem ser escolhidas de forma a possuírem as características desejadas, tais como comprimentos de onda de emissão e excitação específicos, tempos de vida mais longos ou maior resposta a alterações de polaridade. Quando incorporadas apenas num único sítio fornecem uma informação mais fidedigna, e tal especificidade tem sido obtida com uma variedade de sondas fluorescentes que reagem com grupos sulfídrico ou amina. As sondas deverão, por um lado, ser sensíveis aos efeitos que se pretende monitorizar e por outro, não deverão perturbar a função da proteína na qual foram incorporadas. Quando todas estas condições se reúnem, os sinais obtidos pelas sondas podem ser mais informativos do que os obtidos pelos fluoróforos intrínsecos, nomeadamente o triptofano que por existir em abundância em muitas proteínas, torna complexa a interpretação dos resultados.

A miosina contém cerca de 40 resíduos com grupos tióis dos quais 12 residem no subfragmento-1 [Lowey *et al.*, 1969]. Apenas alguns destes estão disponíveis para alquilação. Os grupos sulfidrílico SH1 e SH2, são os resíduos mais usualmente modificados na miosina e têm sido largamente utilizados para estudos estruturais e funcionais da enzima. Apesar de não estarem directamente envolvidos na hidrólise de ATP, parecem estar localizados numa posição chave da transdução de energia entre os sítios de ligação da

actina e do ATP fazendo com que sejam, por excelência, os grupos de escolha para monitorizar determinados eventos na miosina, nomeadamente a interacção de diferentes moduladores da ATPase [Reisler, 1982; Aguirre *et al.*, 1986; Maruta *et al.*, 2000]. Para além dos grupos sulfidrilo SH1 e SH2 correspondentes às Cys-707 e Cys-697, respectivamente, outros resíduos usualmente derivatizados com sondas incluem a Cys-177 localizada na cadeia leve essencial A1 ou as aminas das Lys-83 e -553 localizadas na cadeia pesada do subfragmento-1 de miosina [Bertrand *et al.*, 1995; Xing e Cheung, 1995; Smoczynski e Kasprzak, 1997]. No que diz respeito à actina, a Cys-374 é normalmente o resíduo derivatizado com sondas diversas embora a Lys-372 possa também ser modificada [Cooper e Pollard, 1982; Trayer e Trayer, 1983; Xing e Cheung, 1995]

No que diz respeito a sondas extrínsecas não covalentes, as mais específicas são os análogos de nucleótidos, nomeadamente mant-, TNP, ou eteno-ATP e seus derivados, que ligam com alta afinidade ao local activo da miosina [Thomas, 1987; Aguirre *et al.*, 1989; Bauer *et al.*, 1997; Smoczynski e Kasprzak, 1997; Maruta e Homma, 2000].

V.1.4 – Supressão (“quenching”) da fluorescência

Ao oferecerem uma via alternativa de depopulação do estado excitado, algumas moléculas são capazes de reduzir a fluorescência de um dado fluoróforo desde que se consigam mover para a proximidade do centro fluorescente. A acessibilidade destes supressores colisionais ao meio fluorescente é um parâmetro que dita a eficácia do “quenching”; e este comportamento é caracterizado pela equação de Stern-Volmer:

$$F_0/F = 1 + K_{sv} [Q] = 1 + K_q \tau_0 [Q] \quad [V.2]$$

onde F_0 e F correspondem à intensidade da fluorescência antes e depois da adição do supressor (Q); K_{sv} representa a constante de “quenching” efectiva e é dependente tanto do tempo de vida antes da adição do quencher (τ_0) como da constante bimolecular da reacção

de quenching (K_q). De acordo com a equação V.2, um gráfico $1/F$ versus $[Q]$ é linear com um declive K_{sv} [Lakowicz, 1999].

A constante de “quenching” é de grande utilidade na indicação de como grupos fluorescentes em moléculas grandes como proteínas estão expostos ao meio envolvente. E, como a exposição ou geometria desses grupos pode ser modificada com alterações conformacionais da proteína, uma análise de Stern-Volmer antes e após a ocorrência deste processo, pode ser extremamente reveladora no que diz respeito às propriedades dessas alterações conformacionais bem como acerca da interacção de um ligando com a proteína. Por exemplo, a hipótese proposta por Werber *et al.* [1972] de que após ligação de nucleótidos à miosina alguns triptofanos eram transferidos para um ambiente hidrofóbico foi testada através do uso de “quenchers” em que se provou que estas alterações eram consistentes com o movimento de dois triptofanos de um ambiente polar, acessível ao solvente, para um não-polar, inacessível ao solvente.

V.1.5 – Polarização da fluorescência ou anisotropia de fluorescência

As medições de anisotropia são baseadas no princípio de excitação fotoselectiva de fluoróforos por luz polarizada. Os fluoróforos absorvem preferencialmente fótons cujos vectores eléctricos estão alinhados paralelamente ao momento de transição do fluoróforo que tem uma orientação definida em relação ao eixo molecular. Numa solução isotrópica, os fluoróforos estão orientados de uma forma arbitrária. Após incidência de luz polarizada excita-se selectivamente aqueles fluoróforos cujo dipolo de transição é paralelo ao vector eléctrico de excitação. Esta excitação selectiva resulta numa população de fluoróforos parcialmente orientados e na emissão de fluorescência parcialmente polarizada. O ângulo relativo destes momentos determina a anisotropia (r) ou a polarização (P) que são definidas por [Lakowicz, 1999]:

$$r = I_{||} - I_{\perp} / (I_{||} + 2I_{\perp}) \quad [V.3]$$

$$P = I_{||} - I_{\perp} / (I_{||} + I_{\perp}) \quad [\text{V.4}]$$

em que $I_{||}$ e I_{\perp} são as intensidades da fluorescência medidas com os polarizadores orientados verticalmente e horizontalmente, respectivamente, quando a amostra é excitada com luz polarizada vertical. A anisotropia e a polarização são expressões para o mesmo fenómeno e podem ser interconvertidas usando as seguintes equações [Lakowicz, 1999]:

$$P = 3r / (2 + r) \quad [\text{V.5}]$$

$$r = 2P / (3 - P) \quad [\text{V.6}]$$

Vários fenómenos podem contribuir para a diminuição da anisotropia para valores inferiores aos valores teóricos máximos ($r_0 = 0,4$). A causa mais comum é a difusão rotacional. Se durante o tempo de vida do estado excitado o fluoróforo mudar a sua orientação, a anisotropia irá diminuir. Este efeito tem sido usado para medir as rotações Brownianas de fluoróforos ligados a proteínas. Um fluoróforo numa solução aquosa não viscosa apresenta tipicamente uma anisotropia próxima de zero. Se for transferido para uma macromolécula, os efeitos de difusão rotacional diminuem e como consequência a anisotropia aumenta [Lakowicz, 1999].

Se assumirmos que outros processos não contribuem para uma perda de anisotropia, esta pode ser dada pela equação de Perrin:

$$r = r_0 / (1 + (\tau/\theta)) \quad [\text{V.7}]$$

onde τ corresponde ao tempo de vida do fluoróforo e θ é o tempo de correlação rotacional para o processo de difusão [Lakowicz, 1999]. Proteínas mais pequenas têm tempos de correlação rotacional menores e por isso espera-se que originem anisotropias menores. A anisotropia de proteínas maiores também pode ser baixa se forem modificadas com fluoróforos que tenham um tempo de vida longo. O ponto essencial é que os tempos de correlação rotacional da maioria das proteínas são comparáveis aos tempos de vida de fluoróforos típicos. Como resultado, as medições da anisotropia de fluorescência vão ser sensíveis a qualquer factor que afecte a velocidade de difusão rotacional. Medições da

anisotropia de fluorescência foram, por exemplo, usadas por Highsmith *et al.* [1976] para determinar as constantes de ligação do complexo actina-subfragmento-1. A diferença na velocidade das rotações “brownianas” entre o subfragmento-1 livre em solução e ligado à actina permitiu determinar a fracção ligada. Também a flexibilidade da molécula de miosina foi estudada pela medição das rotações “brownianas” da sonda 1,5-IAEDANS incorporada no sulfidrilo reactivo SH1. Os tempos de correlação rotacional (θ) foram de 220, 400 e 450 para o subfragmento-1, meromiosina pesada e miosina intacta, respectivamente demonstrando que a cabeça de miosina possui uma flexibilidade rotacional considerável quando comparada com a molécula de miosina inteira.

V.1.6 – Transferência de energia por ressonância (TER)

Outro processo importante que ocorre durante o estado excitado é a transferência de energia por ressonância (TER). Este processo pode ocorrer se o espectro de emissão do fluoróforo, designado de dador, se sobrepuser ao espectro de absorção de outra molécula, o aceitante que não tem que ser necessariamente fluorescente. A extensão da transferência de energia é determinada pela distância entre o dador e o aceitante e pela extensão de sobreposição espectral. Esta última é descrita em termos da distância de Förster (R_0):

$$R_0 = 9,78 \times 10^3 [k^2 \eta^{-4} Q_D J(\lambda)]^{1/6} \text{ (Å)} \quad [\text{V.8}]$$

onde k^2 é um factor que descreve a orientação relativa no espaço dos dipolos de transição do dador e do aceitante usualmente assumido como 2/3 (que é apropriado a uma média aleatória dinâmica do dador e aceitante); η é o índice refractivo do meio, que se assume tipicamente como 1,4 para biomoléculas em solução aquosa; Q_D corresponde ao rendimento quântico do dador na ausência do aceitante; $J(\lambda)$ é o integral de sobreposição (neste caso em $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$) que expressa o grau de sobreposição espectral entre a emissão do dador e a absorção do aceitante [Lakowicz, 1999].

A eficiência de transferência de energia para um par dador-aceitante a uma distância fixa é então dado pela equação:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad [\text{V.9}]$$

Assim, a gama de distâncias que são acessíveis a este método depende da magnitude dos factores que determinam R_0 . De uma maneira geral, os fluoróforos usualmente utilizados medem distâncias entre 10 e 80 Å, comparável ao tamanho de macromoléculas biológicas [Lakowicz, 1999]. Por esta razão, a transferência de energia por ressonância tem sido usada como régua espectroscópica para medições de distâncias em proteínas. Na miosina e na actina, têm sido medidas as distâncias entre vários locais marcados especificamente com sondas fluorescentes em grupos sulfidrílo, lisinas e sítios de ligação de nucleótidos dos quais se listam alguns exemplos na Tabela V.1.

Para além de determinar a distância entre os locais marcados, a medição da transferência de energia é um instrumento sensível a alterações conformacionais na estrutura da proteína. Uma vez que a eficiência de energia depende do inverso da sexta potência da distância, pequenas alterações nesta distância, de alguns angstroms, irão produzir alterações de fluorescência mensuráveis. Assim, a observação de Marsh e Lowey [1980] de que a ligação de nucleótidos e actina não produz alteração na distância entre um sítio na cadeia leve de miosina e o SH1 indica que estes ligandos não induzem alterações conformacionais globais na miosina entre estes dois locais.

Tabela V.1 – Distâncias entre sítios marcados com sondas fluorescentes na miosina e na actina medidas por transferência de energia por ressonância (TER).

Sítio do dador	Sítio do aceitador	Distância (nm)	Referência
ϵ -ATP na actina	DDPM na actina (Cys ³⁷³)	3,0	Miki e Mihashi, 1978
1,5-IAEDANS na actina (Cys ³⁷³)	5-IAF na miosina (SH1)	6,0	Takashi, 1979
1,5-IAEDANS na miosina (SH1)	5-IAF na actina (Cys ³⁷³)	6,0	Takashi, 1979
1,5-IAEDANS na cadeia leve (A1) da miosina (Cys ¹⁷⁷)	5-IAF da miosina (SH1)	3,9	Marsh e Lowey, 1980
1,5-IAEDANS na miosina (SH1)	5-IAF na cadeia leve (A1) da miosina (Cys ¹⁷⁷)	4,0	Marsh e Lowey, 1980
1,5-IAEDANS na miosina (SH1)	TNP na miosina (Lys)	2,6	Takashi <i>et al.</i> , 1980
1,5-IAEDANS na cadeia leve (A1) da miosina (Cys ¹⁷⁷)	TNP-ADP na miosina	5,5	Moss e Trentham, 1983
1,5-IAEDANS na miosina (SH1)	TNP-ADP na miosina	3,8	Takashi, 1980
ϵ -ADP na miosina	TNP na miosina (Lys)	4,2	Takashi, 1980
1,5-IAEDANS na cadeia leve (A1) de S1	5-IAF na actina	5,1	Trayer e Trayer, 1983
1,5-IAEDANS na cadeia leve (A2) de S1	5-IAF na actina	5,0	Trayer e Trayer, 1983
MIANS / 1,5-IAEDANS no S1 (SH1)	DABMI na actina (Cys ³⁷⁴)	4,8	Xing e Cheung, 1995
MIANS / 1,5-IAEDANS no S1 (SH2)	DABMI na actina (Cys ³⁷⁴)	4,6	Xing e Cheung, 1995
1,5-IAEDANS na cadeia leve (A1) de S1 (Cys ¹⁷⁷)	TNBS no S1 (Lys ⁸³)	2,5	Smyczynski e Kasprzak, 1997
1,5-IAEDANS na cadeia leve (A1) de S1 (Cys ¹⁷⁷)	FHS no S1 (Lys ⁵⁵³)	5,1	Smyczynski e Kasprzak, 1997

V.1.7 – Dispersão de luz (Light-Scattering): considerações gerais

O fenómeno de dispersão de luz ocorre quando o campo eléctrico da radiação incide num átomo induzindo oscilações periódicas na sua nuvem electrónica, passando este a funcionar como uma fonte secundária de radiação [Cantor e Schimmel, 1980]. A luz dispersa é emitida a uma frequência idêntica à da luz incidente e é normalmente medida com

equipamento especializado que mede a intensidade da luz de acordo com o tempo e ângulos relativos ao eixo da luz incidente. No entanto, também pode ser seguida quer através da diminuição da luz transmitida num espectrofotómetro normal, quer através de um método mais sensível que mede a luz dispersa directamente através do uso da geometria a 90° de um fluorímetro.

A intensidade de luz dispersa num período de tempo de segundos varia com o ângulo de medição (θ) e com a concentração de acordo com a equação [Zimm, 1948]:

$$Kc / R_{\theta} = (1 / MP) + 2 A_2 c \quad [V.10]$$

sendo,

$$K = [4 \pi^2 \eta_0^2 (d\eta/dc)^2] / (N_A \lambda^4) \quad [V.11]$$

$$R_{\theta} = (d^2 / \text{sen}^2 \theta_z) \cdot (I_S / I_0) \quad [V.12]$$

onde c representa a concentração (expressa em massa/volume), K a constante óptica do sistema, R_{θ} a razão de Rayleigh, $d\eta/dc$ o incremento do índice de refração com a concentração (derivada de n em ordem a c), N_A a constante de Avogadro, λ o comprimento de onda da radiação incidente, I_0 a intensidade do feixe de luz incidente, I_S a intensidade da luz dispersa, θ_z o ângulo de medição relativo ao eixo vertical, d a distância entre a amostra e o detector, η_0 o índice de refração do solvente, η o índice de refração da solução, A_2 o coeficiente relativo às interações interpartículas, M a massa molecular, e,

$$P_{\theta} = I_{S, \theta} / I_{S, \theta=0} \quad [V.13]$$

é o factor estrutural intrapartícula, relativo à interferência da luz dispersa de pontos diferentes da molécula ou agregado molecular. Wegner e Engel [1975] usaram extensivamente a técnica de dispersão de luz no estudo da polimerização da actina. Os filamentos de actina dispersam mais luz do que os monómeros e a dispersão de luz a 90° é proporcional à concentração do polímero de F-actina. Esta técnica é igualmente sensível a proteínas que ligam actina, que aumentam apreciavelmente a massa transversal do

filamento. Por exemplo, White e Taylor [1976] aplicaram esta técnica ao estudo do mecanismo da ATPase do complexo actomiosina baseada na observação de que a intensidade de luz dispersa do complexo acto-S1 é superior ao somatório da dispersão de luz da actina e do S1 separadamente, e que este aumento é aproximadamente linear ao aumento de S1 ligado ao filamento.

V.1.8 – Objectivos

Tendo em conta que o sistema contráctil miosina-actina tem demonstrado ser um excelente objecto de estudo de aplicação das mais diversas técnicas de fluorescência, procurou-se no presente capítulo beneficiar da vasta experiência adquirida neste campo e aplicá-la ao estudo da interacção de decavanadato com miosina e seu subfragmento-1. Nesse sentido, numa primeira fase pretendeu-se analisar o efeito da titulação de decavanadato na fluorescência intrínseca da miosina e o efeito do decavanadato na acessibilidade dos triptofanos da miosina ao supressor de fluorescência colisional iodeto de potássio (KI). Numa segunda fase, marcando-se o subfragmento-1 de miosina com duas sondas fluorescentes (IAEDANS e IAF) na Cys-707 (SH1) e Cys-697 (SH2) procurou-se monitorizar alterações de fluorescência induzidas pelo decavanadato na presença de diferentes moduladores da ATPase da miosina. Seguidamente, analisou-se o efeito do decavanadato na ligação do ATP pelo subfragmento-1, monitorizando o aumento da anisotropia de um análogo de ATP fluorescente após ligação ao S1. Por último, foi testada a possibilidade de modulação do complexo acto-miosina por decavanadato quer através de medições de TER entre o S1 marcado com IAF (dador) e a F-actina marcada com eosina (aceitante) quer por medições da dispersão de luz do complexo na presença ou ausência de ATP. Adicionalmente, foi ainda testado o efeito de decavanadato na polimerização/despolimerização da actina por medições de dispersão de luz e despolarização de fluorescência de actina modificada com eosina.

V.2 – Materiais e Métodos

V.2.1 – Reagentes

Os reagentes utilizados são de elevado grau de pureza e foram adquiridos a empresas especializadas, referindo-se em seguida alguns exemplos: ditioneitol (DTT), 2,4-dinitro-1-fluorobenzeno (FDNB), P¹P⁵-diadenosina pentafofato (AP₅A), (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo); N-iodoacetil-N'-(5-sulfo-1-naftil) etilenediamina (1,5-IAEDANS), 5-iodoacetamida fluoresceína (5-IAF), eosina-5-iodoacetamida, 2'-(ou-3')-O-(N-metilnraniloil)- β : γ -imidoadenosina 5'-trifosfato (mant-AMPPNP) (Molecular Probes, Eugene, OR).

V.2.2 – Modificação covalente do subfragmento-1 de miosina

O subfragmento-1 de miosina (5-6 mg/ml) foi marcado no resíduo SH1 (Cys-707) com as sondas IAEDANS ou IAF tendo por base os protocolos previamente descritos por Reisler [1982] e Cheung et al. [1983]. A marcação específica do resíduo SH1 é favorecida a baixa temperatura, baixa força iónica e a pH ligeiramente alcalino. Assim, antes da modificação, o subfragmento-1 de miosina é dializado contra uma solução tampão contendo 60 mM KCl, 25 mM Hepes (pH 7.5). A amostra dializada é então incubada no gelo durante 1 hora no escuro com o reagente IAEDANS (dissolvido no mesmo tampão) 20 vezes em excesso relativamente ao S1; ou com o reagente IAF (dissolvido no mesmo tampão a pH 9,0) 5 vezes em excesso relativamente ao S1. A reacção é parada pela adição de um excesso de DTT, sendo a sonda que não reagiu subsequentemente removida por cromatografia de exclusão molecular utilizando uma coluna PD-10 (Pharmacia). Estas amostras de S1 modificado são designadas de S1(AEDANS, SH2) e S1(AF, SH2), respectivamente, tendo em conta que o resíduo SH2 se encontra livre.

O subfragmento-1 de miosina (5-6 mg/ml) foi também marcado no resíduo SH2 (Cys-697) novamente com as sondas fluorescentes IAEDANS e IAF como previamente

descrito [Reisler, 1982; Cheung *et al.*, 1983]. De forma a evitar a modificação da Cys-707 (a mais reactiva), este resíduo foi reversivelmente bloqueado fazendo reagir o S1 com o reagente FDNB (2 vezes em excesso em relação ao S1) a 4°C durante 30 minutos na presença de 1 mM MgCl₂, 1 mM ADP, 60 mM KCl e 25 mM Hepes (pH 8,0). O S1 protegido com FDNB é subsequentemente incubado a 4°C durante 1 hora no escuro na presença de 5 mM MgCl₂ e 5 mM ADP (a reactividade do grupo SH2 é aumentada consideravelmente pela inclusão de MgADP) com IAEDANS (8 vezes em excesso) ou com IAF (2 vezes em excesso). A reacção é parada pela adição de 10 mM DTT e o grupo protector dinitrobenzeno é removido do resíduo SH1 por incubação com 10 mM DTT a 4°C durante a noite. O excesso de sonda bem como o DTT são removidos utilizando uma coluna PD-10 (Pharmacia). Estas amostras de S1 modificadas são designadas de S1(SH1, AEDANS) e S1(SH1, AF), respectivamente, uma vez que neste caso se tem o resíduo SH1 livre.

As concentrações de S1 marcado foram determinadas pelo método de Bradford [1976] usando a albumina de soro bovino como padrão e, a extensão de marcação do S1 pelas sondas fluorescentes foi medida por espectroscopia de UV-visível usando os seguintes coeficientes de extinção: $E^{1\%}_{337} = 6100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o IAEDANS e $E^{1\%}_{337} = 80.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o IAF. O grau de marcação do resíduo SH1 do subfragmento-1 esteve sempre na gama de 0,7-1 para ambas as sondas, enquanto que o do resíduo SH2 foi cerca de 0,9 para o IAEDANS e 0,5 para o IAF.

A especificidade de marcação do subfragmento-1 de miosina foi verificada (i) pela medição das actividades ATPásicas não fisiológicas dependentes de Ca²⁺ e K⁺ pela determinação do fosfato inorgânico libertado tal como previamente descrito na secção II.2.5.1. e (ii) por SDS-PAGE (12,5%) (tal como se descreve na secção II.2.4) de S1 modificado parcialmente digerido com tripsina na qual os fragmentos fluorescentes foram localizados nos geis não corados sob iluminação UV [Cheung *et al.*, 1983].

V.2.3 – Tripsinização do subfragmento-1

A digestão do subfragmento-1 de miosina com tripsina foi realizada a 25°C durante 30 minutos com uma razão molar de 1:50 relativamente ao S1. A digestão foi terminada pela adição do inibidor de tripsina com uma razão molar de 2:1 relativamente à tripsina.

V.2.4 – Modificação covalente de F-actina

A F-actina foi modificada na Cys-374 com eosina (5 vezes em excesso relativamente à actina) durante 2 horas no gelo numa solução tampão contendo 2 mM MgCl₂, 0,2 mM ATP, 50 mM KCl e 2 mM Tris-HCl (pH 8,0) seguido da adição de um excesso de DTT de forma a parar a reacção. A F-actina modificada é extensivamente dializada contra a mesma solução tampão de forma a remover a sonda que não tenha reagido. A F-actina marcada é usada durante vários dias e imediatamente antes das medições de fluorescência é dializada contra 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl e 2 mM Tris-HCl (pH 8,0) de forma a remover o nucleótido livre. A extensão da marcação foi estimada espectroscopicamente usando um coeficiente de extinção para a eosina de $E_{519}^{1\%} = 100.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

V.2.4 – Preparação dos complexos estáveis S1·ADP·VO₄³⁻ e S1·ADP·AlF₄⁻

Os complexos S1·ADP·VO₄³⁻ e S1·ADP·AlF₄⁻ foram preparados com a proteína modificada S1(AEDANS, SH2) e S1(AF, SH2) de acordo com o protocolo previamente descrito por Werber *et al.* [1992]. Assim, o S1 modificado em tampão 60 mM KCl, 25 mM Hepes (pH 7,9) é incubado a 25°C durante 5 minutos com 1 mM MgCl₂, 0,2 mM ADP e no caso do AlF₄⁻ com 5 mM NaF. Seguidamente, a solução de metavanadato (para o complexo de VO₄³⁻) ou de AlCl₃ (para o AlF₄⁻) é adicionada para uma concentração final de 0,2 mM e incubada durante 90 minutos a 25°C. Por último, o excesso de nucleótido é removido através da passagem das amostras por uma coluna PD-10 (Pharmacia).

V.2.5 – Medições da fluorescência intrínseca

A fluorescência intrínseca foi medida a 25°C numa cuvette com agitação contínua usando um espectrofluorímetro Hitachi-Perkin-Elmer (modelo 650-40) com comprimentos de excitação e emissão de 280 e 340 nm, respectivamente. As experiências foram realizadas num meio contendo 0,3 M KCl, 5 mM CaCl₂ e 25 mM Tris-HCl (pH 7,0) com 0,1 mg/ml de miosina e soluções de vanadato de 0 a 200 µM (concentração de vanádio total). A variação de pH durante a titulação com as soluções de metavanadato ou decavanadato foi sempre inferior a 0,05 unidades de pH.

Os efeitos de filtro interno (no lado da excitação) devido à absorção a 280 nm (A_{280}) das soluções de metavanadato e decavanadato foram corrigidas usando soluções de triptofano (Trp) com a mesma A_{280} e com os mesmos parâmetros de medição da fluorescência da miosina. Excepto para concentrações de decavanadato superiores a 50 µM, os factores de correcção (C_{ex}) obtidos através da equação:

$$C_{ex} = F_{\text{corrigida}}/F_{\text{observada}} \quad [\text{V.14}]$$

originaram valores semelhantes (< 5%) aos que podem ser obtidos através da equação [Lackowicz, 1999]:

$$C_{ex} = \text{antilog} (A_{280}/2) \quad [\text{V.15}]$$

usando um coeficiente de extinção a 280 nm para o metavanadato e decavanadato de $2,12 \pm 0,05 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (medido com as soluções usadas no presente trabalho). Para as concentrações mais elevadas de decavanadato usadas (200 µM), o C_{ex} , usando a equação V.14, foi cerca de 14% superior ao valor obtido usando a equação V.15, e por isso de forma a obter uma melhor correcção dos efeitos de filtro interno, para concentrações de vanadato superiores a 50 µM usou-se a primeira equação. No lado da emissão, os valores para o factor de correcção (C_{em}) foram calculados usando a equação [Lackowicz, 1999]:

$$C_{em} = \text{antilog} (A_{340}/2) \quad [\text{V.16}]$$

onde A_{340} representa a absorvância a 340 nm das soluções de decavanadato (o coeficiente de extinção molar medido experimentalmente a 340 nm é de $1,00 \pm 0,05 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A absorvância a 340 nm da solução de metavanadato é negligível e como tal não foi aplicado qualquer factor de correcção. Os valores dos factores de correcção de filtro interno totais (C_T):

$$C_T = C_{ex} \cdot C_{em} \quad [V.17]$$

usados para a titulação da fluorescência com soluções de metavanadato e decavanadato encontram-se na Tabela V.2.

Tabela V.2 – Factores de correcção de filtro interno usados para a titulação de fluorescência intrínseca da miosina com soluções de decavanadato e metavanadato.

Decavanadato		Metavanadato	
$[\mu\text{M}]$	C_T	$[\mu\text{M}]$	C_T
10	1,07	10	1,04
20	1,12	20	1,07
50	1,28	50	1,15
100	1,58	100	1,29
150	1,915	150	1,465
200	2,34	200	1,69

V.2.6 – Medições da fluorescência extrínseca

As medições de fluorescência extrínseca foram efectuadas numa cuvette com agitação contínua usando os seguintes espectrofluorímetros: Hitachi-Perkin-Elmer (modelo 650-40) e SLM-4800C, com polarizadores calibrados no caso das medições da polarização. Todas as experiências foram realizadas a 25°C num meio contendo 2,5 mM MgCl_2 e 20 mM Hepes (pH 7,0). As emissões da fluorescência de S1-AEDANS e S1-AF foram monitorizadas a 470 e 520 nm com a excitação a 336 e 490 nm, respectivamente. A fluorescência da F-actina-eosina foi medida com a excitação e emissão a 475 e 520 nm, respectivamente.

A ligação de vanadatos ao S1 foi monitorizada pela titulação do S1 modificado (0,45 μM) com soluções de metavanadato e decavanadato de 0 a 50 μM (concentração total de vanádio). Os efeitos de filtro interno, devido à absorvância a 336 e 470 nm pelas soluções de vanadato foram corrigidos usando a equação [Lakowicz, 1999]:

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \cdot \text{antilog} ((A_{\text{S}_{\text{exc}}} + A_{\text{S}_{\text{em}}})/2) \quad [\text{V.18}]$$

onde F_{corr} e F_{obs} representam os valores de fluorescência corrigidos e observados, respectivamente. Para a obtenção dos valores de absorvância foram usados os seguintes coeficientes de extinção determinados sob as condições experimentais usadas no presente trabalho a partir das soluções “stock” de vanadato: 0,4 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para a solução de metavanadato a 336 nm; e 1,12 e 0,09 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para a solução de decavanadato a 336 e 470 nm, respectivamente.

A polarização da fluorescência foi calculada usando a expressão descrita por Weber [1966]:

$$P(\lambda) = [(I_{||} - G(\lambda)I_{\perp}) / (I_{||} + G(\lambda)I_{\perp})] \quad [\text{V.19}]$$

em que $I_{||}$ e I_{\perp} correspondem às intensidades da fluorescência medida com polarizadores orientados paralelamente e perpendicularmente, respectivamente, e $G(\lambda)$ é o factor de correcção para a polarização característica da emissão do monocromador. Para cada par excitação/emissão o valor de $G(\lambda)$ corresponde à média de pelo menos 10 medições e foi de $1,085 \pm 0,005$ para o S1-AEDANS e de $1,140 \pm 0,005$ para o S1-AF. A anisotropia (r_s) foi calculada a partir da medição da polarização (P) usando a equação V.6, previamente descrita na secção V.1.5 [$r_s = 2P/(3-P)$].

As constantes de dissociação foram obtidas usando o programa Origin^{5.0}, a partir dos declives, pelo ajuste linear dos mínimos quadrados dos dados de titulação da fluorescência à equação de Scatchard assumindo a variação da fluorescência (ou anisotropia no caso da titulação do mant-AMPPNP) como a fracção de sítios de ligação saturados (β). Assim, a concentração de ligando ligado, $[\text{ligado}] = n\beta[\text{S1}]$, em que $n = n^\circ$

de sítios de ligação/molécula de S1; e a concentração de ligando livre, [livre] = [total] – [ligado].

V.2.7 – Análise da transferência de energia por ressonância (TER)

O cálculo das distâncias obtidas pelas medições de transferência de energia por ressonância foi efectuado usando a equação fundamental para um par dador/aceitante [Stryer, 1978]. A distância R_0 para os pares S1-AF/F-actina-eosina e S1-AEDANS/V₁₀ foi calculado como descrito em Gutiérrez-Merino *et al.* [1987], com a equação V.8 descrita na secção V.1.6 ($R_0 = 9,78 \times 10^3 [k^2 \eta^{-4} Q_D J(\lambda)]^{1/6}$), usando um valor de $k^2 = 2/3$ e um índice de refração $\eta = 1,33$. O rendimento quântico foi medido para o S1-AF ($Q_D = 0,35 \pm 0,05$) e para o S1-AEDANS ($Q_D = 0,18 \pm 0,03$) usando como referência 1 mM de sulfato de quinino em 1 N de ácido sulfúrico a 25°C, tal como descrito em Centeno e Gutiérrez-Merino [1992]. Os valores do integral de sobreposição (J) foram calculados a partir dos espectros de absorção e emissão (corrigidos) do aceitante e dador, respectivamente, tal como descrito anteriormente [Gutiérrez-Merino *et al.*, 1987; Centeno e Gutiérrez-Merino, 1992].

V.2.8 – Medições de dispersão de luz

A intensidade da dispersão de luz foi monitorizada a 90° em relação à luz incidente usando um espectrofluorímetro Hitachi-Perkin-Elmer (modelo 650-40). Ambos os monocromadores foram posicionados a 400 nm para medições da polimerização da actina ou a 500 nm (para evitar efeitos de filtro interno pela solução de decavanadato) para os ensaios com o complexo acto-S1.

V.3 – Resultados e Discussão

V.3.1 – Supressão da fluorescência intrínseca de miosina por decavanadato

De forma a monitorizar os possíveis locais de interacção de V_{10} na miosina começou-se por medir o efeito de titulação da fluorescência intrínseca proveniente dos triptofanos com decavanadato de 0-200 μM (concentração de vanádio total). Na figura V.2, pode-se observar que após correcção dos efeitos de filtro interno (como se descreve na secção de Materiais e Métodos) a solução de decavanadato produz uma supressão da fluorescência intrínseca de aproximadamente 25% com uma constante de dissociação aparente (K_d) de $1,4 \mu\text{M} \pm 0,2$ para a espécie molecular ($14 \mu\text{M} \pm 2$ vanadato total). A titulação com a solução de metavanadato até uma concentração final de 200 μM (contendo essencialmente a espécie monomérica nas condições experimentais usadas) não induziu qualquer supressão da fluorescência indicando que a espécie decamérica é claramente a molécula promotora do efeito observado. Para além disso, verificou-se que a espécie decamérica induz o mesmo efeito na fluorescência intrínseca na presença ou ausência de 2 mM MgADP (resultados não mostrados) sugerindo que contrariamente ao vanadato monomérico, o decamérico não necessita do nucleótido para interagir com a proteína.

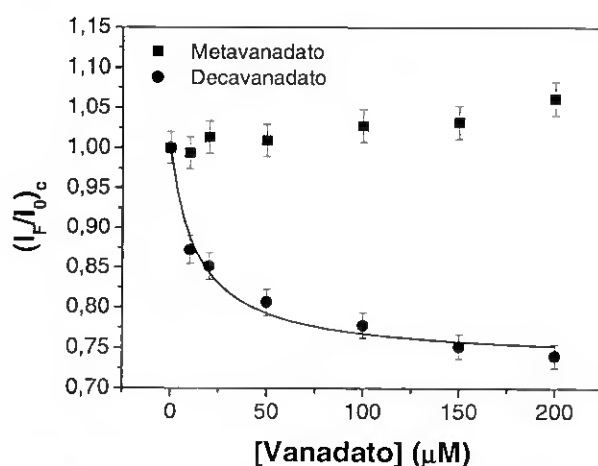


Figura V.2 – Titulação da fluorescência intrínseca com decavanadato (círculos) e metavanadato (quadrados). No eixo das ordenadas é dada a fluorescência relativa à fluorescência na ausência de vanadato (I_0). As experiências foram realizadas a 25°C num meio contendo 0,3 M KCl, 5 mM CaCl_2 e 25 mM Tris-HCl (pH 7,0) com 0,1 mg/ml de miosina. Os resultados apresentados representam a média dos dados obtidos pelo menos em triplicado.

V.3.2 – Efeito de decavanadato na acessibilidade dos triptofanos da miosina

Para medir o efeito de decavanadato na acessibilidade dos triptofanos (Trp) da miosina ao solvente foi realizada uma titulação com o supressor de fluorescência colisional iodeto de potássio (KI). Os resultados obtidos representados sob a forma de um gráfico de Stern-Volmer modificado (Figura V.3) indicam que a extensão da supressão da fluorescência dos Trp da miosina por KI diminui na presença de concentrações de decavanadato na ordem dos micromolar (50 μM vanadato total), enquanto que a solução de metavanadato não demonstrou ter qualquer efeito até uma concentração final de 50 μM .

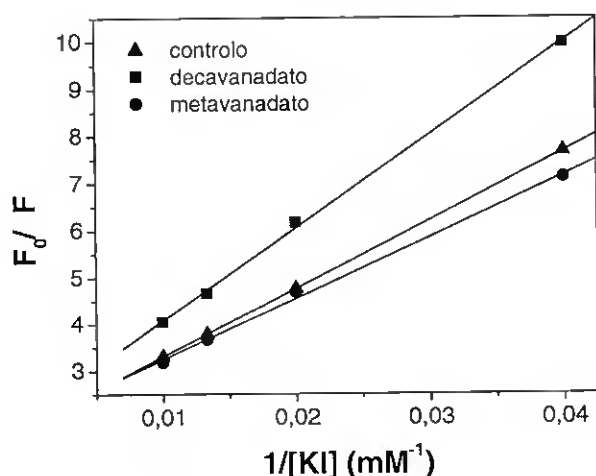


Figura V.3 – Gráfico de Stern-Volmer modificado do quenching por KI da fluorescência intrínseca da miosina. Os ensaios foram realizados a 25°C num meio contendo 0,3 M KCl, 5 mM CaCl₂ e 25 mM Tris-HCl (pH 7,0) com 0,1 mg/ml de miosina na ausência (triângulos) e presença de 50 μM de metavanadato (círculos) ou 5 μM decavanadato (quadrados). Os resultados apresentados representam a média dos dados obtidos pelo menos em triplicado.

A partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados dos dados obtidos para soluções de miosina e triptofano na ausência e na presença de metavanadato e decavanadato, calcularam-se as constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) e os factores de acessibilidade (f_a) apresentados na Tabela V.3. Os resultados mostram que concentrações de decavanadato na ordem dos micromolar (50 e 100 μM vanadato total) diminuem a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) em cerca de 33% e diminuem também o factor de acessibilidade (f_a) em

aproximadamente 20%. As constantes de Stern-Volmer obtidas para os triptofanos acessíveis na miosina na ausência de decavanadato são idênticas às obtidas para o L-Trp nas mesmas condições experimentais e também aos valores reportados para o subfragmento-1 da miosina [Park e Burghardt, 2000]. A diminuição das constantes de Stern-Volmer não foi observada com soluções de L-Trp na presença de decavanadato nem com miosina na presença de soluções de metavanadato até uma concentração de 50 μM (Tabela V.3). Desta forma, podemos concluir que se trata de um efeito específico de ligação da espécie decamérica de vanadato à miosina.

Tabela V.3 – Parâmetros do quenching da fluorescência intrínseca da miosina derivados dos gráficos de Stern-Volmer modificados: efeito de decavanadato (V_{10}) e metavanadato (V_1).

Amostra	$[V_{10}]$ (μM)	$[V_1]$ (μM)	f_a	K_{sv} (mM^{-1})
L-Trp (5 μM)	0	0	$0,97 \pm 0,05$	$0,0125 \pm 0,001$
L-Trp (5 μM)	10	0	$1,00 \pm 0,05$	$0,0130 \pm 0,001$
L-Trp (5 μM)	0	100	$0,97 \pm 0,05$	$0,0125 \pm 0,001$
Miosina (0,1 mg/ml)	0	0	$0,56 \pm 0,03$	$0,0120 \pm 0,001$
Miosina (0,1 mg/ml)	5	0	$0,45 \pm 0,05$	$0,0090 \pm 0,001$
Miosina (0,1 mg/ml)	10	0	$0,45 \pm 0,05$	$0,0080 \pm 0,001$
Miosina (0,1 mg/ml)	0	50	$0,52 \pm 0,03$	$0,0150 \pm 0,001$

Nota: As medições de fluorescência foram realizadas como indicado na secção V.2.5 dos Materiais e Métodos. Os dados obtidos com as soluções de L-Trp (no mesmo tampão usado para a miosina) são incluídos para mostrar que não existe um efeito directo de uma possível complexação de vanadatos com L-Trp. Os dados referentes à miosina representam ensaios em triplicado com duas preparações de proteína diferentes. K_{sv} e f_a correspondem à constante de Stern-Volmer e factor de acessibilidade, respectivamente, derivados da regressão linear dos dados experimentais à equação de Stern-Volmer modificada: $F_0/\Delta F = f_a^{-1} \cdot K_{sv}^{-1} \cdot [Q]^{-1} + f_a^{-1}$.

Os resultados obtidos por fluorescência intrínseca sugerem que a ligação da espécie decamérica de vanadato à miosina produz alterações conformacionais locais perto dos Trp mais acessíveis ao solvente na estrutura tri-dimensional da proteína. A miosina contém cerca de 10 Trp, dos quais 7 se localizam na cadeia pesada do subfragmento-1 e um na

cadeia leve regulatória (LC-2) assinalados a vermelho na Figura V.4. Devido à abundância e dispersão de Trp ao longo da estrutura 3D da miosina bem como à possibilidade de ocorrência de migração de fótons entre os Trp, a localização do(s) possíve(i)s local(i)s de interacção entre a miosina e o decavanadato torna-se dificultada. Por este motivo, e devido à fraca solubilidade da miosina a baixas forças iónicas, decidiu-se prosseguir os estudos recorrendo à técnica de fluorescência extrínseca apenas com o subfragmento-1 de miosina.

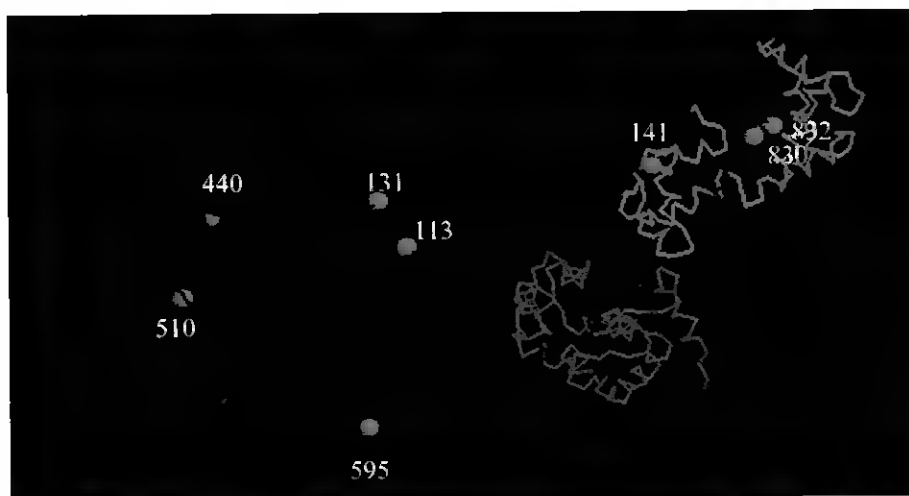


Figura V.4 – Estrutura tri-dimensional da cadeia lateral de subfragmento-1 de miosina de músculo esquelético de galinha com a cadeia pesada colorida a azul, a cadeia leve essencial (LC1) a vermelho, a cadeia leve regulatória (LC2) a verde e os triptofanos a vermelho.

V.3.3 – Efeito de decavanadato na fluorescência extrínseca de S1 modificado nos resíduos SH1 e SH2

O subfragmento-1 de miosina modificado com sondas fluorescentes nos resíduos SH1 (Cys-707) e SH2 (Cys-697) tem sido amplamente usado para monitorizar interacções de diferentes moduladores da ATPase da miosina [Cheung *et al.*, 1983; Aguirre *et al.*, 1986; Werber *et al.*, 1992; Phan *et al.*, 1997]. Nesse sentido, e uma vez que o V_{10} demonstrou ser um modulador da actividade ATPásica da miosina, decidiu-se verificar se esta metodologia se poderia usar de forma a obter um conhecimento mais aprofundado das interacções miosina-decavanadato. Assim, os resíduos SH1 e SH2 do subfragmento-1 foram marcados individualmente com as sondas fluorescentes IAEDANS e IAF de acordo com protocolos

estabelecidos, tal como se descreve na secção V.2.2 dos Materiais e Métodos. A especificidade de marcação em cada um dos resíduos, foi confirmada pela medição das actividades ATPásicas dependentes de Ca^{2+} e de K^+ do S1 modificado e pela localização dos fragmentos fluorescentes de S1 modificado parcialmente digerido com tripsina em geis de poliacrilamida. Em concordância com estudos anteriormente descritos [Cheung *et al.*, 1983; Titus *et al.*, 1989], a modificação covalente do resíduo SH1 com IAEDANS causou um aumento na actividade da Ca^{2+} -ATPase por um factor de 2,4-3 e uma inibição da actividade da K^+ /EDTA-ATPase de 90%. No caso da modificação do SH1 com IAF, a actividade da Ca^{2+} -ATPase foi estimulada por um factor de 1,4-1,6 e a actividade da K^+ /EDTA-ATPase inibida cerca de 45%. Do mesmo modo, as actividades ATPásicas dependentes de Ca^{2+} e de K^+ do S1 marcado no resíduo SH2 foram ambas inibidas em cerca de 30% e 50%, respectivamente. Os geis de poliacrilamida, revelaram uma única banda fluorescente localizada no segmento de 20-kDa na qual se encontram ambos os resíduos SH1 e SH2. Na Figura V.5, exemplifica-se a localização dos fragmentos fluorescentes para o caso do S1 (AEDANS, SH2).

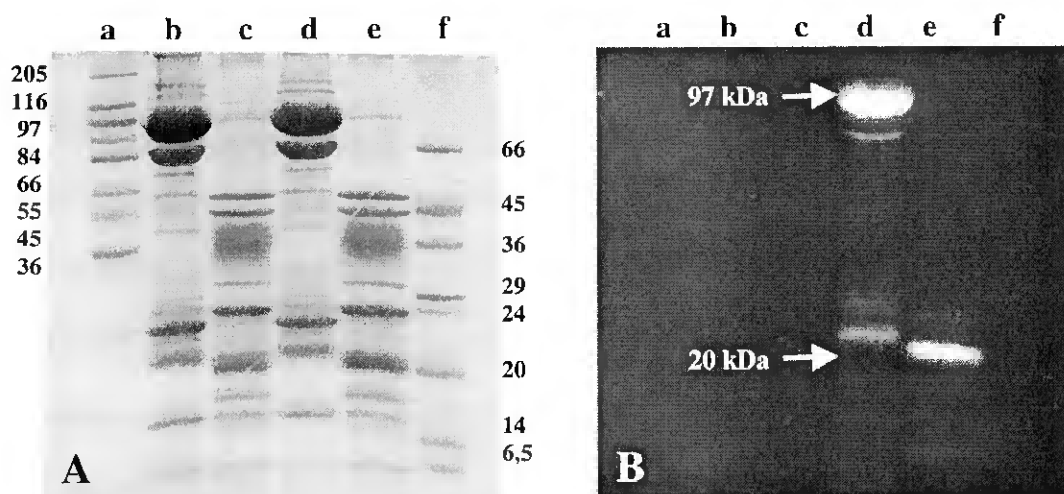


Figura V.5 – Localização do fragmento fluorescente de S1 (AEDANS, SH2) parcialmente digerido com tripsina. (A) Electroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de S1 e S1(AEDANS, SH2) não digerido (poços b e d, respectivamente) e parcialmente digerido por tripsina (poços c e e, respectivamente). Os números laterais referem-se às massas moleculares em kDa de proteínas padrão. (B) Visualização da fluorescência sob iluminação UV com indicação dos domínios de 97 (cadeia pesada do S1) e 20 kDa.

Após confirmação da especificidade de marcação do S1 nos resíduos SH1 e SH2, analisou-se a capacidade do V_{10} inibir a actividade ATPásica, do S1 modificado, estimulada por actina. Enquanto que a marcação na Cys-697 (SH2) não afectou o valor de IC_{50} do V_{10} para a inibição da enzima, a marcação da Cys-707 (SH1) provocou um aumento dos valores de IC_{50} relativamente ao obtido com o S1 não modificado ($0,7 \pm 0,1 \mu M$), nomeadamente $1,6 \pm 0,2 \mu M$ para o S1(AF, SH2) e $8,9 \pm 1,3 \mu M$ para o S1(AEDANS, SH2). Estes resultados sugerem uma possível interacção funcional entre o resíduo SH1 e o sítio de ligação do V_{10} .

Pela análise dos resultados da titulação com decavanadato de S1 modificado no resíduo SH1 e SH2 com as sondas fluorescentes IAEDANS e IAF (Figura V.6), verifica-se uma supressão parcial da fluorescência de S1(AEDANS, SH2), S1(SH1, AEDANS) e S1(SH1, AF) e um aumento da fluorescência de S1(AF, SH2) com curvas de saturação características da interacção de um ligando com uma proteína. Experiências controlo com Cys-AEDANS e Cys-AF demonstraram que o decavanadato não afecta directamente a fluorescência destas sondas (efeito $< 2\%$ para concentrações até $200 \mu M$ vanadato total).

A variação considerável da fluorescência que se observa para ambas as sondas em ambos os resíduos SH1 e SH2 nas condições de saturação sugere uma proximidade do local de ligação do V_{10} a estes dois resíduos localizados no domínio de 20 kDa perto do local activo e que distam 1,8 nm entre si na estrutura tri-dimensional da miosina [Rayment *et al.*, 1993]. A supressão da fluorescência produzida por V_{10} no S1(AEDANS, SH2) (30% para concentrações de saturação) é muito mais elevada do que a supressão produzida após ligação de outros ligandos ao S1(AEDANS, SH2) [Phan *et al.*, 1997]. Para além disso, o quenching produzido por V_{10} no S1(SH1, AEDANS) (35-40% para concentrações saturantes) é cerca de 15-20% superior ao produzido no S1(SH1, AF) (20-25% para concentrações de saturação), apesar das sondas terem sido incorporadas na mesma Cys-697 no subfragmento-1. Para explicar a elevada supressão da fluorescência por V_{10} observada

para o S1-AEDANS apontam-se duas hipóteses: (i) o V_{10} liga a um local muito próximo da sonda AEDANS covalentemente ligada ao S1 produzindo um quenching estático altamente eficiente (o que implica que ambos os sítios estão separados por 1,0 nm no máximo [London e Feigenson, 1981]); (ii) o V_{10} actua como um bom aceitante para a fluorescência do S1-AEDANS devido à absorção na gama de comprimentos de onda de emissão da sonda (sendo o valor do integral de sobreposição calculado de $J = 0,223 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ M}^{-1}$). Neste último caso, assumindo que o excesso de “quenching” produzido por V_{10} no S1(SH1, AEDANS) com respeito ao S1(SH1, AF) é devido à transferência de energia do AEDANS para o V_{10} , com o integral de sobreposição acima indicado e o rendimento quântico obtido para o AEDANS incorporado no S1 ($Q_D = 0,18 \pm 0,03$, calculado como se indica na secção V.2.7) obtém-se um valor de R_0 de $1,39 \pm 0,04$ nm para este par dador/aceitante. Usando a equação V.9, isto implica que o sítio de ligação do V_{10} terá apenas uma distância de 1,2-1,3 nm do AEDANS covalentemente ligado à Cys-697 no S1. A incerteza causada pelo facto de se ter assumido uma orientação aleatória entre o AEDANS e o V_{10} neste cálculo é baixa porque (i) a anisotropia de fluorescência do dador (AEDANS ligado ao S1) é 0,15, o que indica uma larga mobilidade rotacional do dador e (ii) a geometria do aceitante (V_{10}) é quase esférica.

De maneira a averiguar se a espécie monomérica de vanadato adicionada com a solução de decavanadato poderia ser responsável pelos efeitos na fluorescência mostrados na figura V.6-A e -B (pelos motivos já enunciados nos capítulos anteriores) efectuou-se uma titulação, com solução de metavanadato (contendo unicamente a espécie monomérica), da fluorescência de S1 modificado nos resíduos SH1 e SH2 com as duas sondas fluorescentes em estudo (Figura V.6-C). Os resultados mostram claramente que a espécie monomérica contaminante não justifica as alterações de fluorescência observadas confirmando que se trata de um efeito específico da espécie decamérica de vanadato.

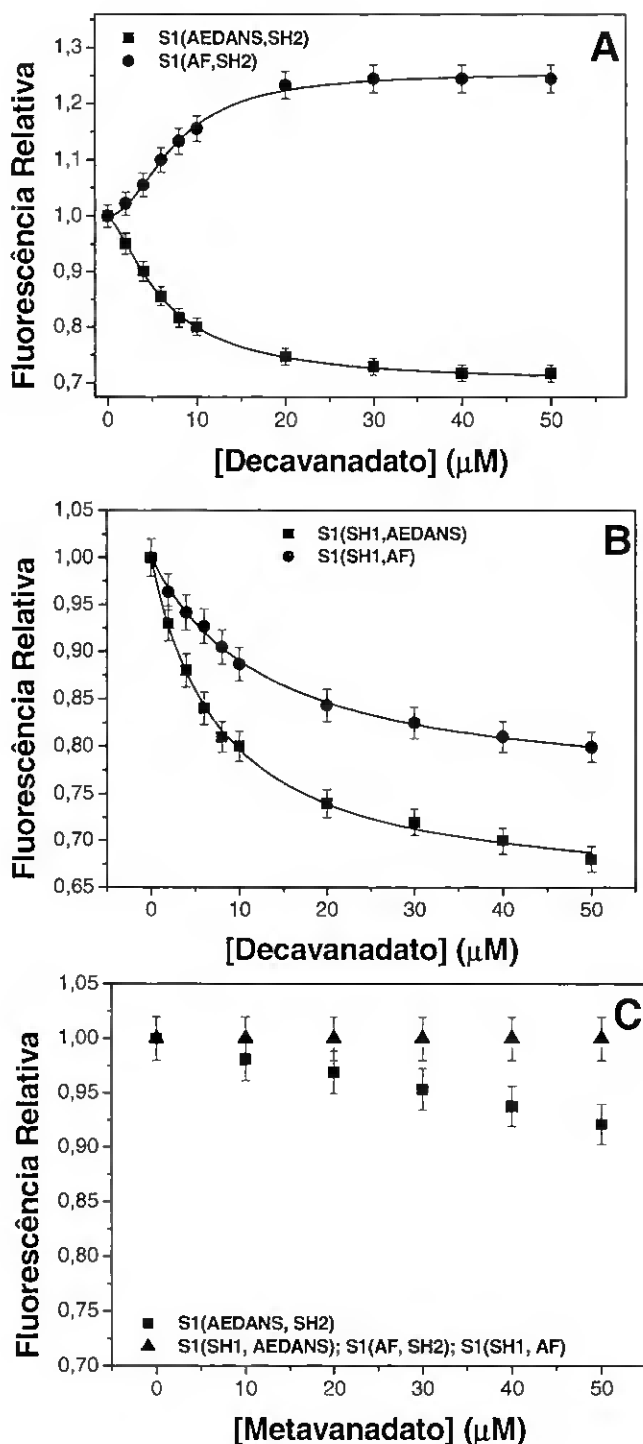


Figura V.6 – Dependência da fluorescência de S1 modificado com concentrações crescentes de decavanadato (A e B) e metavanadato (C). No eixo das ordenadas temos a fluorescência relativa à fluorescência na ausência de decavanadato ou metavanadato. A titulação foi efectuada com pequenas adições sucessivas de soluções de vanadato ao S1 modificado (0,45 μM) a partir de soluções stock de metavanadato e decavanadato de concentração 5 ou 50 mM (vanadato total). Nos painéis A (S1 modificado no resíduo SH1 – Cys707) e B (S1 modificado no resíduo SH2 – Cys697), os quadrados e os círculos representam a marcação com IAEDANS e IAF, respectivamente. No painel C, os quadrados representam a marcação com IAEDANS no resíduo SH1 e os triângulos a marcação com IAEDANS no resíduo SH2 e com IAF nos resíduos SH1 e SH2. As medições foram efectuadas a 25°C num meio contendo 25 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂ e 20 mM Hepes (pH 7,0). A fluorescência das sondas IAEDANS e IAF foram medidas com comprimentos de onda de emissão de 470 e 517 nm e de excitação de 336 e 490 nm, respectivamente.

A titulação com decavanadato de concentrações diferentes (0,1-0,9 μM) de S1 modificado demonstrou que a concentração de V_{10} necessária para produzir 50% de variação da fluorescência máxima ($K_{d\text{aparente}}$) pode ser ajustada a uma recta com um declive de $1,0 \pm 0,5 \mu\text{M } V_{10} / \mu\text{M S1}$ como se exemplifica para o S1(AEDANS, SH2) na

Figura V.7. Estes resultados confirmam assim, que a variação da fluorescência é o resultado da ligação do V_{10} a um único sítio por molécula de subfragmento-1 de miosina.

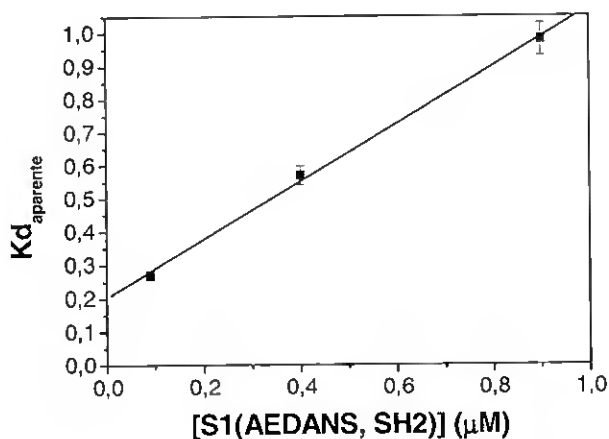


Figura V.7 – Dependência da concentração de V_{10} produzindo 50% de variação da fluorescência máxima (Kd_{aparente}) com a concentração de S1(AEDANS, SH2) (0,1; 0,4 e 0,9 μM). Os ensaios foram realizados como se descreve na Figura V.6 e os dados representam a média das experiências pelo menos em triplicado.

Uma vez que a variação da fluorescência ($\Delta F/\Delta F_{\text{max}}$) pode ser assumida como a fracção dos sítios de ligação do V_{10} ocupados, a concentração de V_{10} livre e ligado foi calculada a partir dos resultados de titulação com V_{10} da fluorescência de S1 modificado com um sítio de ligação por molécula de S1. A partir dos declives dos gráficos de Scatchard (Figura V.8) obtiveram-se as constantes de dissociação (Kd) para o V_{10} mostradas na Tabela V.4. Os valores da constante de dissociação (Kd) do V_{10} calculados para o S1(AEDANS, SH2) e S1(AF, SH2) são idênticos ao valor da constante de inibição (Ki) da actividade ATPásica estimulada por actina de S1 não modificado obtido a partir do gráfico de Hanes, $0,27 \pm 0,05 \mu\text{M}$ (ver secção IV.3.4). Desta forma, a ligação do V_{10} não é significativamente alterada pela modificação com IAEDANS e IAF na Cys-707 (SH1), sugerindo que o aumento do IC_{50} do V_{10} , observado para a inibição de S1(AEDANS, SH2) e S1(AF, SH2), poderá estar relacionado com uma alteração do ciclo catalítico devido à modificação da Cys-707.

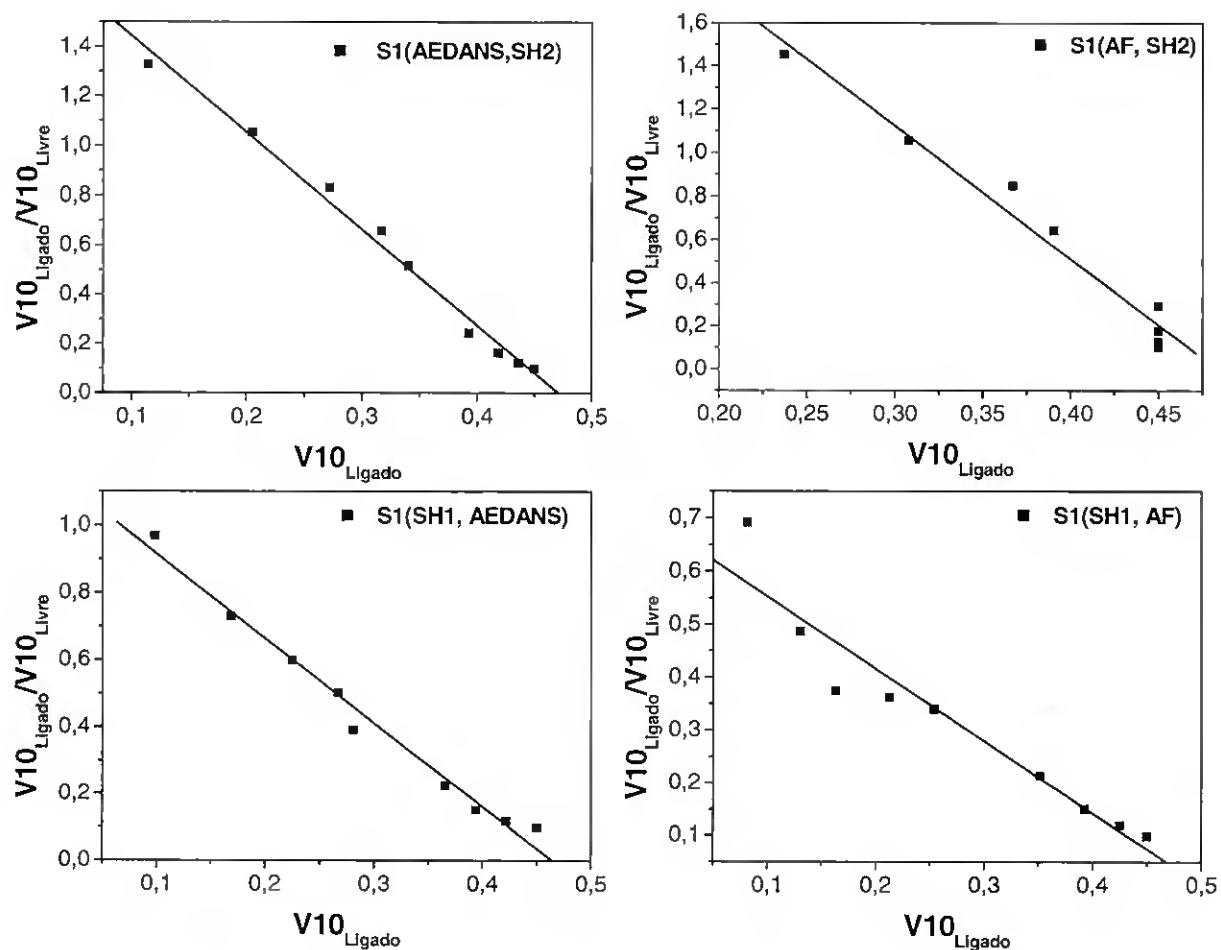


Figura V.8 – Gráficos de Scatchard obtidos a partir dos dados de titulação com V10 da fluorescência de S1(AEDANS, SH2), S1(AF, SH2), S1(SH2, AEDANS) e S1(SH2, AF) mostrados na Figura V.6.

No que diz respeito ao S1 modificado no resíduo SH2, os valores da constante de dissociação do V₁₀ são superiores em cerca de 1,5-2,6 vezes ao valor de K_i obtido pelo gráfico de Hanes. Pode-se concluir, portanto, que a modificação do resíduo SH2 com IAEDANS ou IAF diminuiu a energia livre de ligação do V₁₀ ao local inibitório em cerca de 0,6 kcal/mol (calculado a partir da equação da energia livre de Gibbs: $\Delta G = RT \ln[K_{d1}/K_{d2}]$) indicando apenas uma pequena distorção do sítio de ligação do V₁₀.

Tabela V.4 – Constantes de dissociação (K_d) do V_{10} obtidas a partir dos declives dos gráficos de Scatchard para o S1(AEDANS, SH2), S1(AF, SH2), S1(SH2, AEDANS) e S1(SH2, AF).

	K_d (μM)
S1(AEDANS, SH2)	$0,26 \pm 0,02$
S1(AF, SH2)	$0,16 \pm 0,05$
S1(SH1, AEDANS)	$0,40 \pm 0,02$
S1(SH1, AF)	$0,70 \pm 0,04$

Nota: As constantes de dissociação (K_d) foram determinadas a partir do declive da regressão linear dos dados experimentais de titulação à equação de Scatchard [Wilson e Walker, 1999]: $[RL]/[L] = [R_i]/K_d - ([RL]/K_d)$ em que RL corresponde ao V_{10} Ligado, [L] ao V_{10} Livre e R_i à concentração total de subfragmento-1 de miosina modificada. Assim, o gráfico de V_{10} Ligado / V_{10} Livre versus V_{10} Ligado irá originar uma recta (no caso de um único sítio de ligação sem cooperatividade) com um declive $-1/K_d$ e com a intercepção no eixo das abcissas igual à $[S1_i]$.

Foi ainda estudada a dependência da constante de dissociação do V_{10} com a força iónica, para o S1 modificado no resíduo SH1 com IAEDANS (Figura V.9). Como se pode observar, a afinidade do V_{10} para o sítio de ligação no Subfragmento-1 é fortemente dependente da concentração de KCl, mostrando a relevância das interacções electrostáticas para a ligação do V_{10} ao sítio de ligação do S1, ainda que a uma força iónica próxima da fisiológica (0,2 M KCl) a constante de dissociação do V_{10} seja inferior a 3 μM .

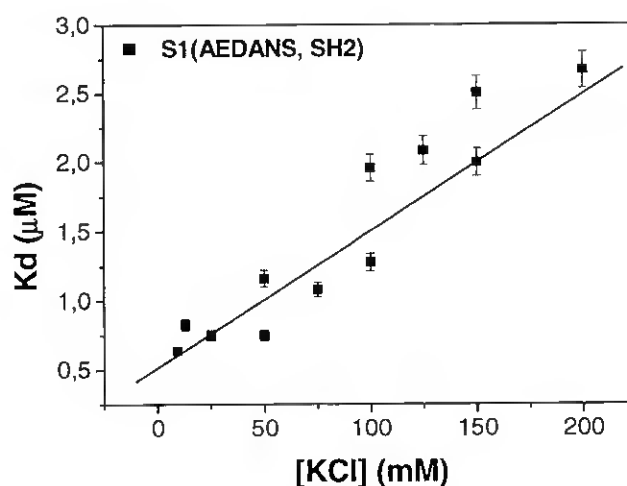


Figura V.9 – Dependência da constante de dissociação do V_{10} para o S1(AEDANS, SH2) com a força iónica. Os ensaios foram realizados nas condições experimentais que se descrevem na legenda da Figura V.6, com concentrações de KCl entre 10 e 200 mM. A linha resulta do ajuste linear dos dados experimentais que foram adquiridos pelo menos em triplicado.

V.3.4 – Efeito do V₁₀ na ligação de ATP ao subfragmento-1 de miosina

De forma a confirmar que o V₁₀ não compete para o mesmo sítio de ligação do substrato, estudou-se o efeito do decavanadato na ligação do ATP ao S1 monitorizando o aumento de anisotropia de um análogo do ATP fluorescente após ligação ao S1, como anteriormente descrito [Bauer *et al.*, 1997]. Para evitar a hidrólise de ATP durante os estudos de ligação, utilizou-se o análogo não hidrolisável mant-AMPPNP em vez do mant-ATP. Os resultados apresentam-se na Figura V.10-A e foram analisados através de gráficos de Scatchard usando o aumento fraccional da anisotropia de fluorescência $[(r-r_{\min})/r_{\max}-r_{\min}]$ como a fracção molar de mant-AMPPNP ligado (Figura V.10-B).

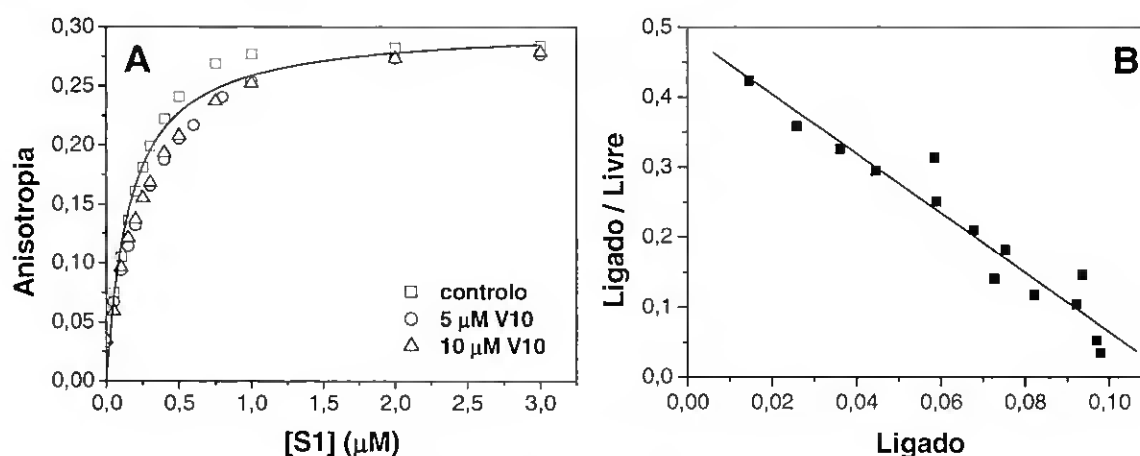


Figura V.10 – (A) Titulação da anisotropia de fluorescência de 0,1 μM mant-AMPPNP com concentrações de S1 de 0,05 a 3 μM, na ausência (quadrados) e presença de 5 μM (círculos) e 10 μM (triângulos) da espécie decamérica (50 e 100 μM vanadato total). As constantes de dissociação foram determinadas a partir dos declives dos gráficos de Scatchard (B). As medições de fluorescência com comprimentos de excitação e emissão de 357 e 447 nm, respectivamente, foram efectuadas a 25°C num meio contendo 25 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 20 mM HEPES (pH 7,0). Os dados representam a média das experiências pelo menos em triplicado com um erro associado inferior a 5%.

A partir dos declives dos gráficos de Scatchard obtiveram-se os valores das constantes de dissociação (K_d) para o mant-AMPPNP que se apresentam na Tabela V.5. Como se pode verificar, os valores das constantes de dissociação são idênticos na ausência

ou presença de decavanadato demonstrando inequivocamente que a ligação do V_{10} ao subfragmento-1 de miosina é não competitivo relativamente a ATP.

Tabela V.5 - Constantes de dissociação (Kd) do mant-AMPPNP obtidas a partir dos declives dos gráficos de Scatchard para o S1 na ausência e presença de decavanadato.

	Kd (μ M)
Controlo	0,23 \pm 0,02
5 μ M V_{10}	0,26 \pm 0,02
10 μ M V_{10}	0,23 \pm 0,02

V.3.5 – Efeito de diferentes moduladores da ATPase da miosina na interacção de V_{10} com o S1.

Tendo em conta que a inibição da actividade ATPásica de S1 estimulada por actina é inibida por decavanadato de uma forma não competitiva relativamente à actina ou ao ATP, equacionou-se a hipótese da afinidade do V_{10} ser diferente consoante os diferentes estados conformacionais do S1 que são adquiridos ao longo do ciclo catalítico de hidrólise do ATP [Eisenberg e Hill, 1985; Lin e Cheung, 1991; Xing e Cheung, 1995]. Para analisar essa possibilidade, foram preparados complexos de S1(AEDANS, SH2) e de S1(AF, SH2) com ADP· V_1 e ADP·AlF₄ de forma a mimetizar o estado intermediário S1**·ADP·P_i originado durante o ciclo de hidrólise de ATP pela miosina [Werber *et al.*, 1992; Peyser *et al.*, 1996; Smith e Rayment, 1996; Phan *et al.*, 1997]. Os resultados de titulação da fluorescência destes complexos com decavanadato apresentam-se na Figura V.11. Verifica-se que o quenching pelo V_{10} , da fluorescência do S1(AEDANS, SH2) na presença de ADP· V_1 e ADP·AlF₄ é ligeiramente superior ao encontrado na sua ausência. Isto pode dever-se ao facto destes análogos de ATP produzirem um quenching parcial da fluorescência do S1(AEDANS, SH2) (resultados não mostrados), em concordância com o reportado anteriormente [Phan *et al.*, 1997]). Apesar do ADP· V_1 e o ADP·AlF₄ produzirem um

quenching da fluorescência do S1(AF, SH2) de cerca de 20% (resultados não mostrados) para concentrações saturantes de V_{10} , o aumento da fluorescência de S1(AF, SH2) na presença destes análogos de ATP é cerca de 30% superior ao obtido na sua ausência. Estes resultados demonstram mais uma vez que o V_{10} não compete para o mesmo sítio de ligação do ATP porque (i) a extensão do quenching produzido pelo V_{10} não é afectado pela presença de $ADP \cdot V_1$ ou $ADP \cdot AlF_4$ e (ii) o efeito produzido pelo V_{10} na fluorescência do S1(AF, SH2), i.e, aumento da fluorescência, é oposto ao efeito do $ADP \cdot V_1$ e $ADP \cdot AlF_4$.

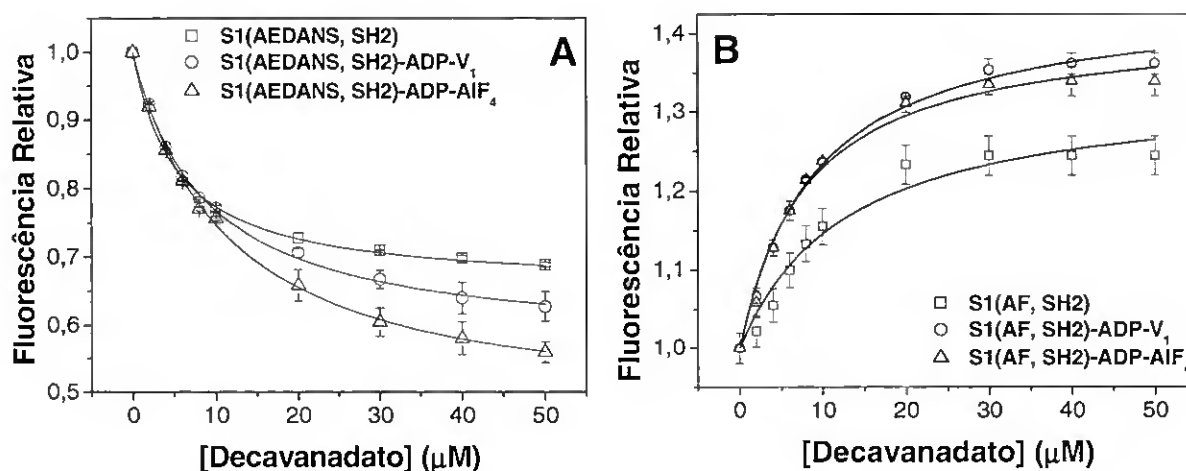


Figura V.11 - Dependência da fluorescência de S1(AEDANS, SH2) (A) e S1(AF, SH2) (B) na ausência (quadrados) e presença de $ADP \cdot V_1$ (círculos) e $ADP \cdot AlF_4$ (triângulos) com a concentração de decavanadato. Pequenos volumes de solução stock de decavanadato (5 ou 50 mM) foram sucessivamente adicionados a $0,45 \mu M$ de S1 modificado. As medições de fluorescência foram efectuadas a $25^\circ C$ num meio contendo 25 mM KCl, 2,5 mM $MgCl_2$, 20 mM Hepes (pH 7,0) e com comprimentos de onda de emissão/excitação de 470/336 nm para o IAEDANS e 517/490 nm para o IAF. Os dados representam a média das experiências pelo menos em triplicado.

Os resultados da titulação com decavanadato da fluorescência de S1(AEDANS, SH2) e S1(AF, SH2) na presença dos análogos de ATP foram analisados através de gráficos de Scatchard tal como se descreve na legenda da Tabela V.4. A partir dos declives dos gráficos de Scatchard obtiveram-se os valores da constante de dissociação (K_d) para o V_{10}

apresentados na Tabela V.6. A constante de dissociação do S1 para o V_{10} aumenta aproximadamente para o dobro e triplo na presença de $ADP \cdot V_1$ e $ADP \cdot AlF_4$, respectivamente, sugerindo que o V_{10} tem duas a três vezes menor afinidade para o estado conformacional $M^{**} \cdot ADP \cdot P_i$ do que para a miosina na ausência de nucleótido.

Tabela V.6 – Efeito de diferentes moduladores da ATPase da miosina na constante de dissociação entre o V_{10} e o S1(AEDANS, SH2) ou S1(AF, SH2).

Moduladores da ATPase	Kd (μ M)	
	S1-AEDANS	S1-AF
ADP·V ₁	0,45 ± 0,05	0,25 ± 0,03
ADP·AlF ₄	0,62 ± 0,07	0,46 ± 0,05

Um outro análogo do ATP que foi demonstrado ligar-se ao subfragmento-1 de miosina e complexo actomiosina em miofibrilas de uma forma que se estende desde o sítio de ligação do nucleótido no centro catalítico através do designado “phosphate tube” até à fenda do domínio de 50 kDa que conduz à “porta traseira” do local activo é a molécula P^1P^5 -diadenosina pentafosfato (AP_5A) [Pate *et al.*, 1997]. A hélice que liga as Cys-707 (SH1) e Cys-697 (SH2) localizam-se na base da fenda do domínio de 50 kDa e uma vez que os resultados acima mostrados sugerem uma proximidade entre o sítio de ligação do V_{10} e as sondas covalentemente ligadas a estas cisteínas, decidiu-se averiguar se a ligação do V_{10} compete com o AP_5A , através da ligação a um sítio próximo da “porta traseira” do centro catalítico. A titulação da fluorescência de S1(AF, SH2) com AP_5A permitiu monitorizar a ligação deste nucleótido na ausência e presença de 5 μ M V_{10} (Figura V.12-A). Através dos declives dos gráficos de Scatchard dos dados de titulação obtiveram-se os valores de Kd para o complexo $AP_5A/S1$ (Tabela V.7). Os valores de Kd para o complexo $V_{10}/S1$ (Tabela V.7) foram também obtidos na ausência e presença de AP_5A (200 μ M) através dos declives dos gráficos de Scatchard com os dados de titulação da fluorescência de S1(AF, SH2) com decavanadato (Figura V.12-B).

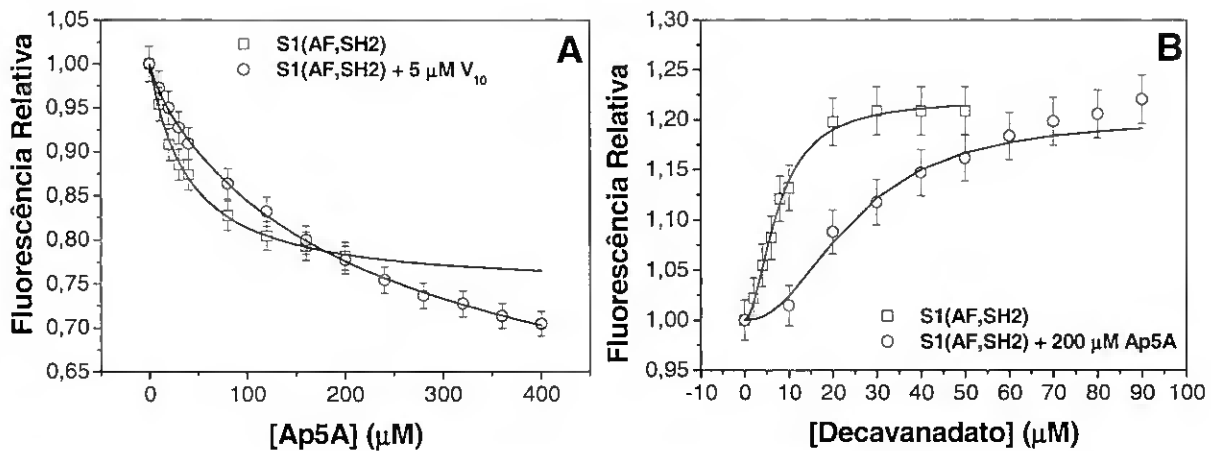


Figura V.12 – Dependência da fluorescência de S1(AF, SH2) com a concentração de AP₅A e decavanadato. A fluorescência do IAF foi medida com comprimentos de onda de excitação e emissão de 490 e 517 nm, respectivamente. Os ensaios foram realizados a 25°C, em 25 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂ e 20 mM Hepes (pH 7,0). Os dados representam a média das experiências pelo menos em triplicado. Painel **A**: Titulação com AP₅A da fluorescência de S1(AF, SH2) na ausência (quadrados) e presença (círculos) de 5 μM V₁₀ (50 μM vanadato total adicionado como decavanadato). Painel **B**: Titulação com decavanadato da fluorescência de S1(AF, SH2) na ausência (quadrados) ou presença (círculos) de 200 μM AP₅A.

Na presença de concentrações saturantes de AP₅A a constante de dissociação do V₁₀ para o S1 é cerca de 36 vezes superior do que na ausência deste análogo de ATP. Por outro lado, para concentrações saturantes de V₁₀ a constante de dissociação do AP₅A para o S1 aumenta quase 4 vezes. Pode-se concluir, portanto, que o V₁₀ e o AP₅A competem para a ligação ao S1, sugerindo que os seus locais de ligação se sobrepõem parcialmente ou que estão muito próximos na estrutura 3D da proteína.

Tabela V.7 - Constantes de dissociação (K_d) dos complexos AP₅A/S1 e V₁₀/S1 na ausência e presença de V₁₀ e AP₅A, respectivamente, obtidas a partir dos declives dos gráficos de Scatchard dos dados de titulação de S1(AF, SH2).

	K _d (μM)	
	AP ₅ A/S1	V ₁₀ /S1
Controlo	37 ± 2	0,16 ± 0,04
5 μM V ₁₀	133 ± 5	-
200 μM AP ₅ A	-	5,8 ± 0,2

V.3.6 – Modulação do complexo actomiosina por decavanadato

Os resultados de fluorescência apresentados até agora demonstraram a presença de um sítio de alta afinidade para o V_{10} no subfragmento-1 da miosina. Contudo, a possibilidade da inibição da actividade ATPásica do complexo actomiosina ser devida à ligação do V_{10} à actina ou a um enfraquecimento da interacção entre o S1 e a F-actina não foi ainda excluída.

A possibilidade de uma interacção directa do V_{10} com a F-actina pode ser descartada tendo em conta que o decavanadato (até uma concentração de 200 μM vanádio total): (i) não teve efeito na fluorescência intrínseca da F-actina ou na fluorescência da F-actina-eosina; (ii) não teve efeito na dispersão de luz da F-actina (implicando que não tem um efeito na despolimerização da F-actina); e (iii) não teve efeito na velocidade de polimerização da actina (medido por dispersão de luz como descrito por Cooper e Pollard [1982]) (resultados não mostrados).

O efeito do decavanadato na dissociação do complexo acto-S1 foi monitorizada pela técnica de transferência de energia por ressonância (TER) como anteriormente referido [Trayer e Trayer, 1983; Xing e Cheung, 1995; Smyczynski e Kasprzak, 1997]. Para isso modificou-se covalentemente o S1 no resíduo SH1 com IAF (como o dador fluorescente) e a F-actina com eosina iodoacetamida (actina-eosina). A ocorrência de transferência de energia na mistura S1(AF, SH2)/actina-eosina é revelada pelos dados apresentados na Figura V.13. Verificou-se que a espécie decamérica de vanadato produziu uma pequena diminuição da transferência de energia entre S1(AF, SH2) e actina-eosina de 20% para 15% na ausência e presença de 5 μM V_{10} (50 μM vanadato total), respectivamente, após correcção do efeito do V_{10} na fluorescência do S1(AF, SH2). Usando os valores do integral de sobreposição (J) entre o S1(AF, SH2)/actina-eosina e do rendimento quântico (Q_D) do dador (fluoresceína no S1(AF, SH2)) que foram determinados para as proteínas modificadas ($J = 5,52 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \cdot \text{M}^{-1}$ e $Q_D = 0,35 \pm 0,05$),

calculou-se um valor de R_0 para este par dador-aceitante de $3,9 \pm 0,1$ nm, aplicando a equação V.8 (secção V.1.6). A distância entre o dador (fluresceína) e o aceitante (eosina) localizados no S1 e na F-actina, respectivamente, foram calculados a partir dos valores da eficiência de transferência de energia e do R_0 através da equação V.9 (secção V.1.6) e os resultados apresentam-se na Tabela V.8.

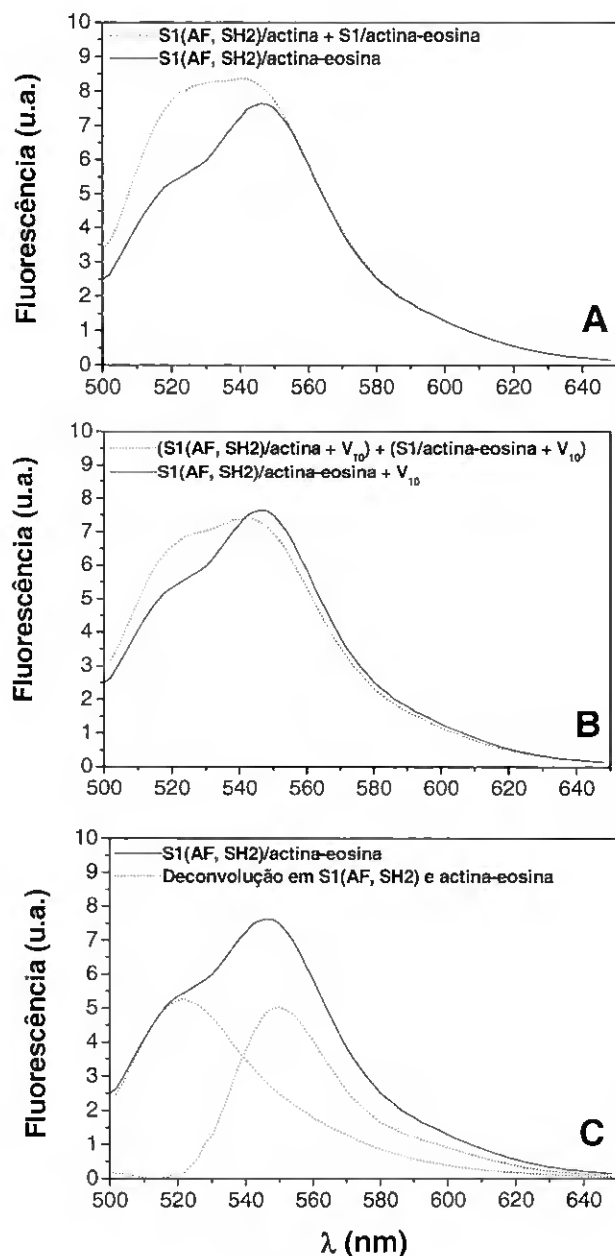


Figura V.13 – Efeito do decavanadato na transferência de energia na mistura S1(AF, SH2)/actina-eosina. (A) Linha: espectro de emissão da mistura S1(AF, SH2) (0,45 μ M)/actina-eosina (1 μ M); tracejado: somatório dos espectros de emissão de S1(AF, SH2) (0,45 μ M)/actina (1 μ M) e de S1 (0,45 μ M)/actina-eosina (1 μ M). (B) Linha: espectro de emissão da mistura S1(AF, SH2) (0,45 μ M)/actina-eosina (1 μ M) na presença de 5 μ M V_{10} (50 μ M vanadato total); tracejado: somatório dos espectros de emissão de S1(AF, SH2) (0,45 μ M)/actina (1 μ M) com 5 μ M V_{10} e de S1 (0,45 μ M)/actina-eosina (1 μ M) com 5 μ M V_{10} ; (C) Desconvolução do espectro de emissão da mistura S1(AF, SH2) (0,45 μ M)/actina-eosina (1 μ M) (linha no painel A) nas bandas fluorescentes correspondentes a S1(AF, SH2) e a actina-eosina (tracejado). A desconvolução foi feita através do software do fluorímetro SLM-4800C pelo ajuste do espectro de emissão total ao somatório dos espectros de emissão de S1(AF, SH2)/actina e S1/actina-eosina. Antes de se adquirirem os espectros de emissão as misturas S1/actina foram incubadas a 25°C durante 30 min no mesmo meio do ensaio: 2,5 mM $MgCl_2$ e 20 mM HEPES (pH 7,0)

Tabela V.8 – Efeito da espécie decamérica de vanadato na eficiência de transferência de energia por ressonância (TER) e distâncias entre S1(AF, SH2) e actina-eosina^a.

	Eficiência do FRET	Distância ^b (Å)	Alteração da distância (Å)
S1-actina	0,20 ± 0,02	49,1 ± 1,2	
S1-actina + 5 µM V ₁₀	0,15 ± 0,02	52,1 ± 1,2	3,0 ± 1,2

^a A eficiência de TER indicada foi calculada pela diminuição da fluorescência de S1(AF, SH2) após desconvolução do espectro de emissão total, como se explica na legenda da figura V.13. A eficiência de TER calculada pelo aumento da fluorescência da actina-eosina (obtida após desconvolução do espectro de emissão total) origina os mesmos resultados (± 2%).

^b Para estimar o efeito da mobilidade rotacional do dador e a incerteza na distância estimada, mediu-se a anisotropia do dador fluorescente (S1-AF) cujo valor foi de 0,17. Com o valor de anisotropia da fluoresceína em glicerol (0,395 ± 0,005) [Highsmith e Coehn, 1987] obtém-se um valor ca. 40° para o semiângulo θ do cone na qual este dador se pode assumir que está a rodar rapidamente, e com 80% de probabilidade a distância real entre o dador e o aceitador é entre 3,93 e 5,40 nm no complexo S1(AF, SH2)/actina-eosina.

A distância estimada entre o dador e o aceitante no complexo S1-actina (4,91 ± 0,12 nm) está de acordo com valores descritos na literatura (ver Tabela V.1) e os resultados confirmam que o V₁₀ não dissocia significativamente o complexo S1-actina nas condições experimentais que produzem uma larga inibição da actividade ATPásica de S1 estimulada por actina. A diminuição da transferência de energia produzida pelo V₁₀ no complexo S1(AF, SH2)/actina-eosina pode resultar de um aumento da distância entre o dador e o aceitante de 3,0 ± 1,2 Å ou de uma alteração na orientação relativa entre o par dador/aceitante de 25°. Esta alteração na distância encontra-se dentro da gama de alterações, induzidas por mudanças conformacionais, da distância entre sondas covalentemente ligadas a resíduos de Cys ou de Lys no S1 de miosina e uma segunda sonda ligada à F-actina ou ainda dentro da gama de flutuações estruturais dinâmicas da miosina entre a Cys-707 e Cys-697 (ver Tabela V.1).

Por fim estudou-se o efeito do decavanadato na associação do complexo acto-S1 durante a hidrólise de ATP através da técnica de dispersão de luz. O efeito do decavanadato na dispersão de luz do complexo acto-S1 apresenta-se na Figura V.14.

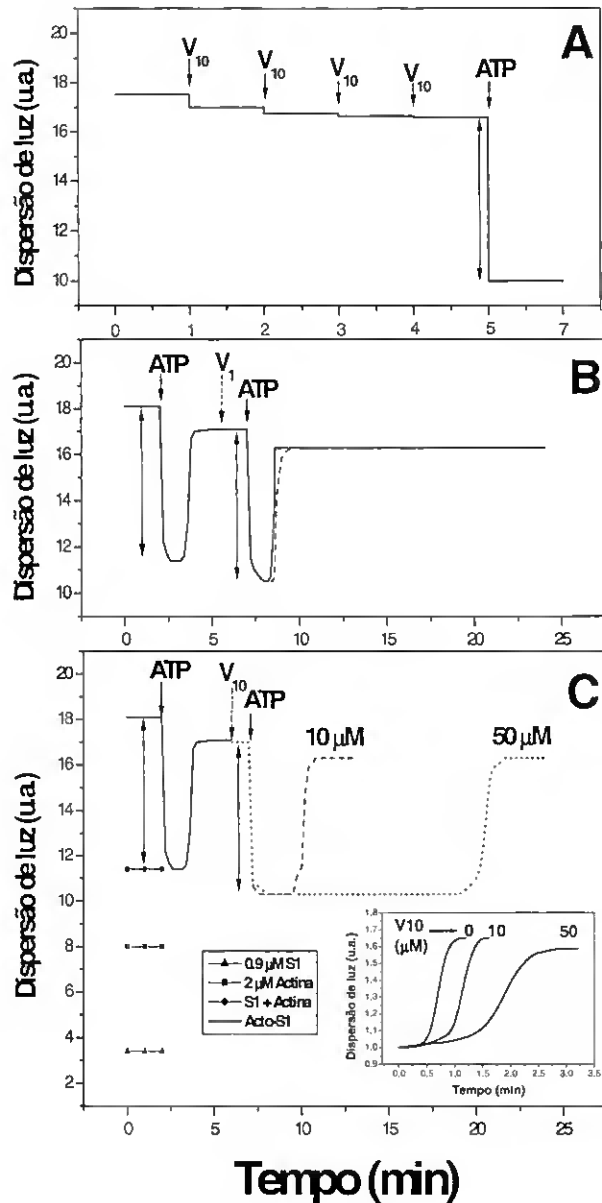


Figura V.14 – Efeito do V_{10} na dissociação/associação do complexo acto-S1. (A) Dispersão de luz do complexo acto-S1 (linha) em função de adições sequenciais de 5 μM V_{10} (50 μM vanádio total) e ATP 0,25 mM. (B) Dispersão de luz do complexo acto-S1 após adição de ATP (0,25 mM) na ausência (linha) ou presença de 50 μM de metavanadato (tracejado). (C) Dispersão de luz do complexo acto-S1 após adição de ATP (0,25 mM) na ausência (linha) ou presença de 1 μM ou 5 μM V_{10} , ou seja, 10 e 50 μM vanádio total adicionado como decavanadato (tracejado). A dispersão de luz a 90° com respeito à luz incidente foi medida com os monocromadores posicionados a 500 nm e é dada em unidades arbitrárias (u.a.). A linha com círculos representa o somatório da intensidade de luz dispersa do S1 (triângulos) com a actina (quadrados) e as duplas setas representam o decréscimo da dispersão de luz esperado para uma dissociação do complexo acto-S1 induzida por ATP. A recuperação da dispersão de luz monitoriza a re-associação do complexo acto-S1 na ausência, ou presença de 1 e 5 μM V_{10} (ver gráfico interno). As experiências foram realizadas a 25°C com 0,9 μM S1 e 2 μM F-actina num meio contendo 25 mM KCl, 2,5 mM MgCl_2 e 20 mM HEPES (pH 7,0).

Na ausência de ATP, verifica-se uma ligeira alteração da dispersão de luz do complexo acto-S1 (< 10% para 200 μM decavanadato) para concentrações de V_{10} que produzem mais de 80% de inibição da actividade ATPásica de S1 estimulada por actina (Figura V.14-A). Não existem, portanto, indicações de dissociação do complexo acto-S1 contrariamente ao que se observa após adição de ATP (que induz uma dissociação completa do complexo acto-S1). Estes resultados vão de encontro aos obtidos por TER que se traduzem em pequenas alterações conformacionais na miosina induzidas por V_{10} .

Já no que diz respeito à re-associação do complexo, o decavanadato, contrariamente ao metavanadato, produz um aumento considerável do tempo necessário para re-associar o S1 e a actina após o consumo do ATP adicionado (comparar Figuras V.14-B e -C) sendo este aumento dependente da concentração de V_{10} . Para além disso, verifica-se uma correlação entre o aumento do tempo necessário para o processo de re-associação completo na presença de V_{10} e a extensão de inibição da actividade ATPásica de S1 por V_{10} indicando que se trata do tempo necessário para que se atinja um nível de ATP suficientemente baixo na solução para permitir o processo de re-associação. Notavelmente, a cinética de re-associação entre o S1 e a actina torna-se mais lenta na presença de V_{10} (ver gráfico inserido na Figura V.14-C), sugerindo a formação de complexos não-productivos.

V.4 – Conclusões

Devido à extrema sensibilidade das propriedades fluorescentes a pequenas alterações conformacionais em proteínas, a espectroscopia de fluorescência revelou-se de grande utilidade na monitorização dos possíveis locais de interacção da espécie decamérica de vanadato (V_{10}) com a miosina. Numa análise preliminar, usando a fluorescência intrínseca da miosina, estudos de quenching revelaram a presença de sítio(s) de alta afinidade na miosina para a espécie decamérica de vanadato, que contrariamente ao vanadato monomérico, não necessita de MgADP para interagir com a proteína. Uma análise de Stern-Volmer do efeito do decavanadato na acessibilidade dos Trp da miosina ao supressor de fluorescência colisional KI revelou ainda que, a ligação do vanadato decamérico à miosina produz alterações conformacionais locais próximas dos Trp mais acessíveis ao solvente na estrutura 3D da proteína.

A ligação do V_{10} à miosina foi também monitorizada através de titulação do subfragmento-1 de miosina marcado nos resíduos SH1 e SH2 com sondas fluorescentes (IAEDANS e IAF) e mostraram a presença de apenas um único sítio de ligação do V_{10} por monómero com uma constante de dissociação de 0,16-0,7 μM . Estes valores da constante de dissociação do complexo $V_{10}/S1$ são idênticos ao valor da constante de inibição ($K_i = 0,27 \pm 0,05 \mu\text{M}$) obtida a partir de estudos cinéticos, indicando que o S1 derivatizado com estas sondas produz apenas uma pequena distorção do sítio de ligação do V_{10} . O efeito acentuado da força iónica na constante de dissociação do V_{10} para o S1 indica que as interacções electrostáticas têm um papel importante na interacção do V_{10} (um polianião) com a miosina.

A elevada supressão da fluorescência de S1-AEDANS produzida pela ligação do V_{10} sugere que o sítio de ligação será próximo da Cys-707 e Cys-697. A hélice que interliga estas duas Cys actua como um elemento de transdução de energia através da qual existe comunicação entre o sítio de ligação do ATP e da actina. De facto, esta região é

conhecida por alterar a sua conformação ao longo do ciclo de hidrólise de ATP justificando assim o facto do V_{10} ter 2-3 vezes menor afinidade para o S1 na presença de $ADP \cdot V_1$ e $ADP \cdot AlF_4$, que induzem um estado conformacional próximo do intermediário $S1^{**} \cdot ADP \cdot Pi$ gerado durante a actividade ATPásica da miosina. Diferentes afinidades do V_{10} para os diferentes estados conformacionais do S1 espera-se, portanto, que produza uma alteração da distribuição dos estados conformacionais durante a actividade catalítica do S1.

Os estudos de fluorescência demonstraram ainda que o local de ligação do V_{10} se sobrepõem parcialmente ou está muito próximo do local de ligação do AP_5A , uma molécula que se liga ao S1 desde o local de ligação do nucleótido através do “phosphate tube” até à fenda do domínio de 50 kDa que conduz à designada “porta traseira” da miosina por onde se pensa sair o fosfato resultante da hidrólise de ATP.

Por último, através de técnicas de transferência de energia por ressonância e de dispersão de luz verificou-se que o V_{10} produz uma pequena alteração conformacional local no subfragmento-1 sem, contudo, causar dissociação do complexo acto-S1 na ausência de ATP. A inibição por decavanadato da actividade ATPásica de miosina estimulada por actina parece ser antes acompanhada de uma re-associação mais lenta entre o S1 e a actina de acordo com os resultados obtidos por dispersão de luz da modulação do complexo acto-S1.

V.5 – Referências Bibliográficas

- Aguirre, R., F. Gonsoulin, et al. (1986). "Interaction of fluorescently labeled myosin subfragment 1 with nucleotides and actin." Biochemistry **25**(22): 6827-35.
- Aguirre, R., S. H. Lin, et al. (1989). "Characterization of the ethenoadenosine diphosphate binding site of myosin subfragment 1. Energetics of the equilibrium between two states of nucleotide.S1 and vanadate-induced global conformation changes detected by energy transfer." Biochemistry **28**(2): 799-807.
- Bagshaw, C. R., J. F. Eccleston, et al. (1974). "The magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase of myosin. Two-step processes of adenosine triphosphate association and adenosine diphosphate dissociation." Biochem J **141**(2): 351-64.
- Bauer, C. B., P. A. Kuhlman, et al. (1997). "X-ray crystal structure and solution fluorescence characterization of Mg₂'(3')-O-(N-methylanthraniloyl) nucleotides bound to the Dictyostelium discoideum myosin motor domain." J Mol Biol **274**(3): 394-407.
- Bertrand, R., J. Derancourt, et al. (1995). "Production and properties of skeletal myosin subfragment 1 selectively labeled with fluorescein at lysine-553 proximal to the strong actin-binding site." Biochemistry **34**(29): 9500-7.
- Bradford, M. M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Cantor, C. R. and P. R. Schimmel (1980). "Biophysical Chemistry: Part II: Techniques for the study of biological structure and function." W. H. Freeman and Company, New York, pp. 838-843.
- Centeno, F. and C. Gutierrez-Merino (1992). "Location of functional centers in the microsomal cytochrome P450 system." Biochemistry **31**(36): 8473-81.

- Cheung, H. C., F. Gonsoulin, et al. (1983). "Fluorescence energy transfer studies on the proximity of the two essential thiols of myosin subfragment-1." J Biol Chem **258**(9): 5775-86.
- Cooke, R. (1982). "Fluorescence as a probe of contractile systems." Methods Enzymol **85 Pt B**: 574-593.
- Cooper, J. A. and T. D. Pollard (1982). "Methods to measure actin polymerization." Methods Enzymol **85 Pt B**: 182-210.
- Eisenberg, E. and T. L. Hill (1985). "Muscle contraction and free energy transduction in biological systems." Science **227**(4690): 999-1006.
- Gutierrez-Merino, C., F. Munkonge, et al. (1987). "The position of the ATP binding site on the (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase." Biochim Biophys Acta **897**(2): 207-16.
- Highsmith, S., R. A. Mendelson, et al. (1976). "Affinity of myosin S-1 for F-actin, measured by time-resolved fluorescence anisotropy." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(1): 133-7.
- Highsmith, S. and J. A. Cohen (1987). "Spatial organization of CaATPase molecules in sarcoplasmic reticulum vesicles." Biochemistry **26**(1): 154-61.
- Johnson, K. A. and E. W. Taylor (1978). "Intermediate states of subfragment 1 and actosubfragment 1 ATPase: reevaluation of the mechanism." Biochemistry **17**(17): 3432-42.
- Lakowicz, J. R. (1999). "Principles of Fluorescence Spectroscopy." Plenum Press, New York.
- Lin, S. H. and H. C. Cheung (1991). "Two-state equilibria of myosin subfragment 1 and its complexes with ADP and actin." Biochemistry **30**(17): 4317-22.

- London, E. and G. W. Feigenson (1981). "Fluorescence quenching in model membranes. 1. Characterization of quenching caused by a spin-labeled phospholipid." Biochemistry **20**(7): 1932-8.
- Lowey, S., H. S. Slayter, et al. (1969). "Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation." J Mol Biol **42**(1): 1-29.
- Marsh, D. J. and S. Lowey (1980). "Fluorescence energy transfer in myosin subfragment-1." Biochemistry **19**(4): 774-84.
- Maruta, S., T. Aihara, et al. (2000). "Solution structure of myosin-ADP-MgFn ternary complex by fluorescent probes and small-angle synchrotron X-ray scattering." J Biochem (Tokyo) **128**(4): 687-94.
- Maruta, S. and K. Homma (2000). "Conformational changes in the unique loops bordering the ATP binding cleft of skeletal muscle myosin mediate energy transduction." J Biochem (Tokyo) **128**(4): 695-704.
- Miki, M. and K. Mihashi (1978). "Fluorescence energy transfer between epsilon-ATP at the nucleotide binding site and N-(4-dimethylamino-3,5-dinitrophenyl)-maleimide at Cys-373 of G-actin." Biochim Biophys Acta **533**(1): 163-72.
- Moss, D. J. and D. R. Trentham (1983). "Distance measurement between the active site and cysteine-177 of the alkali one light chain of subfragment 1 from rabbit skeletal muscle." Biochemistry **22**(23): 5261-70.
- Park, S. and T. P. Burghardt (2000). "Isolating and localizing ATP-sensitive tryptophan emission in skeletal myosin subfragment 1." Biochemistry **39**(38): 11732-41.
- Pate, E., N. Naber, et al. (1997). "Opening of the myosin nucleotide triphosphate binding domain during the ATPase cycle." Biochemistry **36**(40): 12155-66.

- Peyser, Y. M., M. Ben-Hur, et al. (1996). "Effect of divalent cations on the formation and stability of myosin subfragment 1-ADP-phosphate analog complexes." Biochemistry **35**(14): 4409-16.
- Phan, B. C., Y. M. Peyser, et al. (1997). "Effect of complexes of ADP and phosphate analogs on the conformation of the Cys707-Cys697 region of myosin subfragment 1." Eur J Biochem **243**(3): 636-42.
- Rayment, I., W. R. Rypniewski, et al. (1993). "Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor." Science **261**(5117): 50-8.
- Reisler, E. (1982). "Sulfhydryl modification and labeling of myosin." Methods Enzymol **85 Pt B**: 84-93.
- Smith, C. A. and I. Rayment (1996). "X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain to 1.9 Å resolution." Biochemistry **35**(17): 5404-17.
- Smyczynski, C. and A. A. Kasprzak (1997). "Effect of nucleotides and actin on the orientation of the light chain-binding domain in myosin subfragment 1." Biochemistry **36**(43): 13201-7.
- Stryer, L. (1978) "Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler." Annu Rev Biochem **47**: 819-46.
- Takashi, R. (1979). "Fluorescence energy transfer between subfragment-1 and actin points in the rigor complex of actosubfragment-1." Biochemistry **18**(23): 5164-9.
- Thomas, D. D. (1987). "Spectroscopic probes of muscle cross-bridge rotation." Annu Rev Physiol **49**: 691-709.
- Titus, M. A., G. Ashiba, et al. (1989). "SH-1 modification of rabbit myosin interferes with calcium regulation." J Muscle Res Cell Motil **10**(1): 25-33.

- Trayer, H. R. and I. P. Trayer (1983). "Fluorescence energy transfer between the myosin subfragment-1 isoenzymes and F-actin in the absence and presence of nucleotides." Eur J Biochem **135**(1): 47-59.
- Weber, G. (1966) "Fluorescence and Phosphorescence Analysis" (Hercules, D.M., Ed.), John Wiley and Sons, New York, pp 217-240.
- Wegner, A. and J. Engel (1975). "Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments." Biophys Chem **3**(3): 215-25.
- Werber, M. M., A. G. Szent-Gyorgyi, et al. (1972). "Fluorescence studies on heavy meromyosin-substrate interaction." Biochemistry **11**(15): 2872-83.
- Werber, M. M., Y. M. Peyser, et al. (1992). "Characterization of stable beryllium fluoride, aluminum fluoride, and vanadate containing myosin subfragment 1-nucleotide complexes." Biochemistry **31**(31): 7190-7.
- White, H. D. and E. W. Taylor (1976). "Energetics and mechanism of actomyosin adenosine triphosphatase." Biochemistry **15**(26): 5818-26.
- Wilson, K. and J. Walker (2000). "Principles and Techniques of Practical Biochemistry." Fifth edition, Cambridge University Press, pp. 407-410.
- Xing, J. and H. C. Cheung (1995). "Internal movement in myosin subfragment 1 detected by fluorescence resonance energy transfer." Biochemistry **34**(19): 6475-87.
- Zimm, B. H. (1948). "Apparatus and methods for measurement and interpretation of the angular variation of light scattering – preliminary results on polystyrene solutions." J. Chem. Phys. **16**: 1099-1116.

CAPÍTULO VI

INTERACÇÃO DE DECAVANADATO COM MIOSINA: ESTUDOS DE FOTOCLIVAGEM

VI.1 – Introdução

Para além das aplicações biológicas do vanadato como sonda cinética e espectroscópica no estudo do mecanismo enzimático de enzimas, uma área de grande interesse para a bioinorgânica é a fotoclivagem de proteínas induzida por vanadato. Contrariamente ao fosfato, o vanadato é, em termos fotoquímicos, uma espécie activa na medida em que a irradiação de complexos vanadato-proteína com luz ultra-violeta resulta muitas vezes em oxidações específicas de cadeias laterais proteicas e na clivagem do polipéptido [Gibbons e Mocz, 1991]. Com base em estudos de ressonância paramagnética electrónica (RPE) em que se verificou que a fotoclivagem é proporcional ao desenvolvimento de um sinal de EPR, foi sugerido que o processo envolve redução do vanádio +5 (vanadato) a vanádio +4 (ião vanadilo) [Cremona *et al.*, 1990].

A fotoclivagem mediada por vanadato parece ser um fenómeno reportado para, pelo menos, dez enzimas diferentes. A dineína [Lee-Eiford *et al.*, 1986; Gibbons e Mocz, 1991] e a miosina [Grammer *et al.*, 1988; Cremona *et al.*, 1988, 1989, 1990, 1991; Mocz, 1989; Mulhrad *et al.*, 1991; Ringel *et al.*, 1990] foram os sistemas mais extensivamente estudados e a identificação dos locais de clivagem pelo vanadato tem fornecido informação estrutural valiosa acerca dos possíveis sítios de ligação de fosfatos ou polianiónicos na presença ou ausência de nucleótidos. Outras enzimas fotoclivadas pela

irradiação de complexos com vanadato são, por exemplo: adenilato cinase [Cremo *et al.*, 1992], tubulina [Correia *et al.*, 1994], ribulose-bisfosfato carboxilase/oxigenase [Mogel e McFadden, 1989], fosfogluconato desidrogenase [Bergamini *et al.*, 1995], aldolase [Crans *et al.*, 1992], Ca²⁺-ATPase de retículo sarcoplasmático [Vegh *et al.*, 1990; Molnar *et al.*, 1991], fosfofructocinase [Signorini e Bergamini, 1990], glicogénio fosforilase [Bergamini e Signorini, 1991], e isocitrato liase [Ko *et al.*, 1992].

VI.1.1 – Fotoclivagem da miosina promovida por vanadato: importância funcional dos locais de clivagem

A irradiação por luz ultra-violeta na presença de vanadato resulta na clivagem da cadeia pesada da miosina (97 kDa) em três locais distintos localizados a 23, 31 e 74 kDa do N-terminal [Ringel *et al.*, 1990]. Enquanto que a presença de ATP parece inibir especificamente a clivagem de S1 nos locais de 23 e 31 kDa [Ringel *et al.*, 1990; Muhlrads *et al.*, 1991], a actina protege totalmente a clivagem no local de 74 kDa [Muhlrads *et al.*, 1991]. A posição dos sítios de clivagem de 23 e 31 kDa foram atribuídos à Ser-181 [Cremo *et al.*, 1988] e Ser-243 [Grammer *et al.*, 1996], respectivamente, localizadas em regiões conservadas no local activo da miosina de músculo esquelético de coelho. De acordo com a estrutura cristalográfica do complexo S1-MgADP-Vi com o subfragmento-1 truncado de *Dictyostellium*, as cadeias laterais da Ser-181 e da Ser-243 formam pontes de hidrogénio com os oxigénios do vanadato [Smith e Rayment, 1995]. A Ser-181 é localizada na sequência 178-185 (P-loop ou Walker-A) rica em glicinas que forma parte do local activo da miosina e é homóloga ao sítio de ligação do nucleótido de diversas enzimas [Walker *et al.*, 1982]. Esta sequência tem a forma geral G-X₁-X₂-X₃-X₄-G-K-G/T em que X₂ corresponde ao aminoácido clivado: uma alanina no caso da dineína e da β-ATP sintetase; uma serina na miosina; uma prolina na adenilato cinase; e uma arginina na α-ATP sintetase [Lee-Eiford *et al.*, 1986; Cremo *et al.*, 1988, 1989, 1992]. Curiosamente,

parece ser a localização do aminoácido que determina a clivagem e não a natureza do aminoácido.

O terceiro local de clivagem (74 kDa) situa-se na região de junção dos fragmentos proteolíticos de 50/20 kDa onde se encontra o Loop-2 (resíduos 627-646 de miosina de músculo esquelético de coelho) implicado na interface miosina/actina [Chaussepied e Morales, 1988; Rayment *et al.*, 1993], embora os aminoácidos envolvidos não tenham sido ainda identificados. O tetravanadato, foi sugerido como sendo a espécie de vanadato responsável pela clivagem no local de 74 kDa uma vez que se verificou que a clivagem ocorria somente para concentrações de vanadato superiores a 0,2 mM (concentração de vanadato em que começam a aparecer as espécies tetraméricas) [Ringel *et al.*, 1990].

VI.1.2 – Mecanismo de clivagem foto-oxidativa da miosina promovida por vanadato

Apesar do fenómeno de fotoclivagem mediado por vanadato ter sido reportado para inúmeras enzimas, a miosina é dos poucos sistemas em que o mecanismo das reacções envolvidas no processo se encontra bem descrito. Isto deve-se em parte ao facto do terminal amina resultante da clivagem ser resistente a sequenciação por degradação de Edman e consequentemente de difícil identificação. No caso da miosina de músculo esquelético, a fotoclivagem ocorre por um mecanismo em várias fases sequenciais cujos intermediários foram caracterizados. O mecanismo proposto por Grammer *et al.* [1996] encontra-se esquematizado na Figura VI.1.

A irradiação do complexo miosina·MgADP·Vi começa por modificar covalentemente a proteína através da oxidação do grupo hidroximetilo da cadeia lateral da Ser-181 a um aldeído de serina [Cremo *et al.*, 1988, 1989] (estrutura II da Figura VI.1). A miosina foto-modificada pode formar um novo complexo MgADP·Vi e por nova irradiação pode ser especificamente clivada no local activo. Um passo chave neste último processo, envolve a formação de um radical livre no carbono- α do aldeído de serina

(estrutura V) pela fotoredução do vanadato (V^V) a vanadilo (V^{IV}). Ao radical livre é adicionado oxigénio molecular e o carbono- β do aldeído migra então para o oxigénio que foi adicionado, com libertação simultânea do segundo oxigénio sob a forma de água (estrutura VIII). Reacções deste tipo são usualmente designadas de rearranjos de Criegee e são conhecidas como sendo catálises ácidas fracas. Foi sugerido que os resíduos Glu-179 ou o Glu-459, que se sabe encontrarem por perto na estrutura cristalográfica, poderiam actuar como catalisadores ácidos nesta reacção. A subsequente hidrólise do grupo formilo pode, por sua vez, ser facilitada através dos resíduos Glu-179 e Glu-459 actuando como bases de forma a induzir o ataque pela água do carbono do grupo formilo. O formato é libertado da proteína e o carbonilo que está perto do grupo amina é reversivelmente hidratado várias vezes (estruturas X e XI) antes de ocorrer a clivagem hidrolítica.

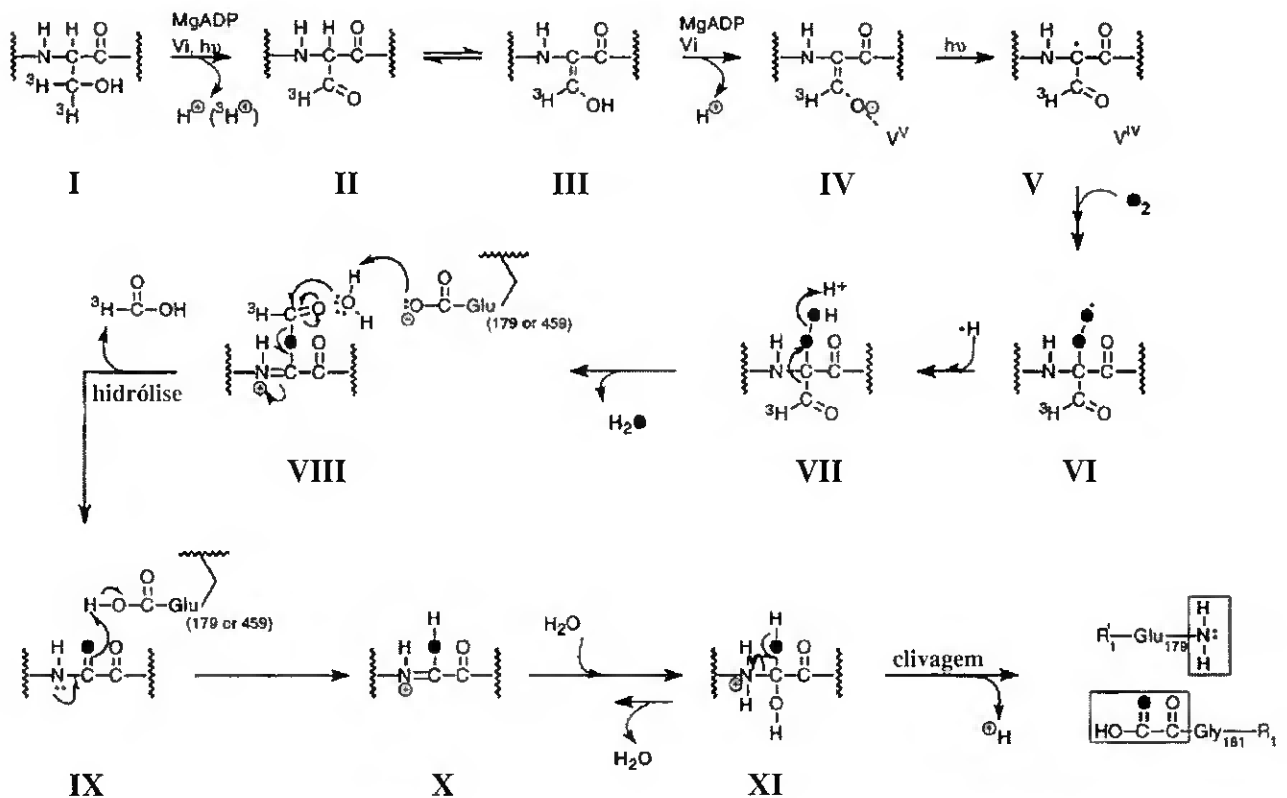


Figura VI.1 – Esquema do mecanismo de clivagem foto-oxidativa no local activo da miosina promovido por vanadato [adaptado de Grammer *et al.*, 1996].

Este mecanismo pode explicar também como é que a cadeia lateral da Ser-243 é oxidada a um aldeído durante o passo de fotocivagem. O radical peroxo da Ser-181 (estrutura VI) tem que ser reduzido por um átomo de hidrogénio. O H' pode vir do carbono- β (C-H) da Ser-243. A perda de um segundo electrão do carbono- β por via de outra molécula de O₂ poderia converter o radical álcool da Ser-243 num aldeído. Alternativamente, o radical Ser-243 encontra-se suficientemente próximo do local activo para que o vanádio no estado de oxidação +4 possa actuar como um redutor para completar a oxidação e retornar ao vanadato no estado de oxidação +5.

VI.1.3 – Aplicação da espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (RPE) ao estudo do ião vanadilo (VO²⁺) e seus complexos

A espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (RPE) é baseada em princípios físicos idênticos aos da espectroscopia de RMN e tem em conta o facto de um electrão desemparelhado também possuir um momento magnético de spin quando colocado sob a acção de um campo magnético externo. Contudo, o momento magnético de spin associado a um electrão desemparelhado é 10³ vezes superior ao do núcleo e como tal, enquanto que as experiências de RMN são medidas na gama de frequências dos MHz (na zona das radio-ondas do espectro electromagnético), o RPE requer frequências na gama dos GHz (na zona das micro-ondas) [Cantor e Schimmel, 1980].

Os sinais de um espectro de RPE de uma dada molécula com um electrão desemparelhado podem ser caracterizados por vários factores entre os quais o factor g e a interacção nuclear hiperfina. Para um electrão livre no vácuo, o factor g tem um valor de 2,0023. No entanto, pode ter vários valores para amostras paramagnéticas diferentes. Assim, valores experimentais de g podem ser usadas para identificar o grupo químico paramagnético. A interacção nuclear hiperfina de um electrão desemparelhado com um núcleo possuindo um n° quântico de spin I origina $2I + 1$ linhas no espectro de RPE

[Cantor e Shimmel, 1980]. O espaço entre as linhas relaciona-se com a força do acoplamento e designa-se de constante isotrópica hiperfina de acoplamento (A). Tanto o factor g como a constante de acoplamento, A , são sensíveis à orientação da molécula com respeito ao campo externo, à mobilidade molecular e à polaridade do ambiente local e como tal a análise dos sinais de RPE pode dar informação sobre a estrutura, mobilidade e polaridade da molécula em estudo [Cantor e Shimmel, 1980].

A espectroscopia de RPE é usualmente o método de escolha para caracterizar o ião vanadilo ($V^{IV}=O$)²⁺ e os seus complexos, nomeadamente em proteínas. O vanadilo é caracterizado por quatros ligandos equatoriais e um axial correspondente ao grupo oxo na posição trans, assumindo assim uma configuração octaédrica. Devido ao spin nuclear, $I = 7/2$ e à anisotropia da molécula, o electrão desemparelhado de VO^{2+} origina um espectro de RPE que consiste em duas séries de 8 transições correspondentes à fracção de moléculas com a ligação $V=O$ alinhada paralelamente e perpendicularmente ao campo magnético. O centro de cada série de 8 transições e o espaço entre elas é determinado pelos valores de g e A , respectivamente. A magnitude destes valores depende da força do acoplamento hiperfino entre o electrão desemparelhado e o núcleo de ^{51}V [Chasteen, 1981].

O acoplamento hiperfino de ^{51}V do ião vanadilo é sensível ao tipo de grupos coordenados nas posições equatoriais. Cada ligando contribui independentemente para o acoplamento hiperfino, permitindo a distinção perfeita dos quatro ligandos [Chasteen, 1981; Markham, 1984]. Com base na medição das constantes de acoplamento $A_{//}$ em estudos com complexos modelo, a constante hiperfina para um dado grupo de ligandos equatoriais pode ser calculado pela equação:

$$A_{//calc} = \sum n_i A_{//i} / 4 \quad [VI.1]$$

onde i corresponde aos tipos diferentes de grupos ligandos dadores equatoriais, n_i ($n_i = 1-4$) é o número de ligandos do tipo i , e $A_{//}$ é a constante de acoplamento medida para

o grupo dador equatorial do tipo i [Chasteen, 1981]. Podem ser descritas equações semelhantes para o g_{ij} , embora as diferenças no A_{ij} sejam maiores e mais facilmente discernidas. Existem cerca de 210 possibilidades de séries de ligandos equatoriais de vanadilo ligado a proteínas. Os ligandos observados em complexos de proteína-vanadilo incluem o grupo imidazol da histidina, os grupos carboxilato de ácido glutâmico e aspártico, os grupos fenolato da tirosina, água, carbonato e outros aniões, ribonucleótidos e ribonucleósidos [Chasteen, 1983].

VI.1.4 – Objectivos

Retirando vantagem da miosina ser um dos sistemas mais extensivamente estudados no que diz respeito à fotoclivagem mediada por vanadato tendo sido bem descritos os locais de clivagem para as espécies monomérica e tetramérica, aplicou-se esta técnica ao estudo da interacção da espécie decamérica com o subfragmento-1 de miosina. Para isso começou-se por averiguar a capacidade do decavanadato clivar o subfragmento-1 de miosina na presença ou ausência de ligandos naturais da enzima e identificaram-se os resíduos fotoclivados devido à presença do vanadato decamérico de forma a determinar inequivocamente os sítio(s) de ligação do V_{10} na miosina. Seguidamente, comparam-se os padrões electroforéticos bem como a extensão de clivagem entre a solução de decavanadato e soluções de metavanadato previamente estudados. Por último, combinando estudos por espectroscopia de UV/VIS e de RPE seguiu-se a eventual redução/decomposição do decavanadato e metavanadato com a concomitante formação de vanadilo (V^{IV}).

VI.2 – Materiais e Métodos

VI.2.1 – Estudos de fotocivagem

A fotoirradiação foi efectuada numa mistura de reacção contendo 4,5 μM de subfragmento-1 de miosina, 25 mM KCl, 2,5 mM MgCl_2 , 25 mM Hepes (pH 7,0), na presença ou ausência de 5-1000 μM de soluções de vanadato, 5 mM ATP e 10 μM actina. A mistura de reacção (2 ml) colocada numa célula de quartzo e arrefecida por um banho de água foi irradiada com uma lâmpada de mercúrio de média pressão de 400 W (Applied Photophysics) a uma distância média de 5 cm. A radiação abaixo de 300 nm foi removida (de forma a prevenir a degradação da proteína por irradiação UV) usando uma solução de CuSO_4 , com um pico de transmitância a 365 nm. Depois de irradiada, a amostra é então sujeita a uma análise electroforética num gel de poliacrilamida (12%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

VI.2.2 – Estudos de ressonância paramagnética nuclear (RPE)

Os espectros de RPE de amostras previamente sujeitas a irradiação foram adquiridos em tubos de quartzo de 4 mm (com 0,2 ml de amostra), a uma temperatura de 77 K, num espectrómetro Bruker EMX-300 X-band equipado com um crióstato Oxford (ESR900) com as seguintes condições: frequência de micro-onda, 9,65 GHz; potência de micro-onda, 0,63 mW; amplitude de modulação, 10 gauss, ganho do receptor, $2,0 \times 10^5$; Scans, 4.

VI.3 – Resultados e Discussão

VI.3.1 – Padrão electroforético de S1 fotoclivado na presença de decavanadato

No presente trabalho, foi conduzida uma série de experiências de fotoclivagem na presença de decavanadato com o intuito de se identificar claramente os sítio(s) de ligação do vanadato decamérico (V_{10}) na miosina. Para isso, os padrões electroforéticos do subfragmento-1 de miosina sujeito a irradiação na ausência ou presença de decavanadato em diferentes condições experimentais foram analisados e os resultados apresentam-se na Figura VI.2.

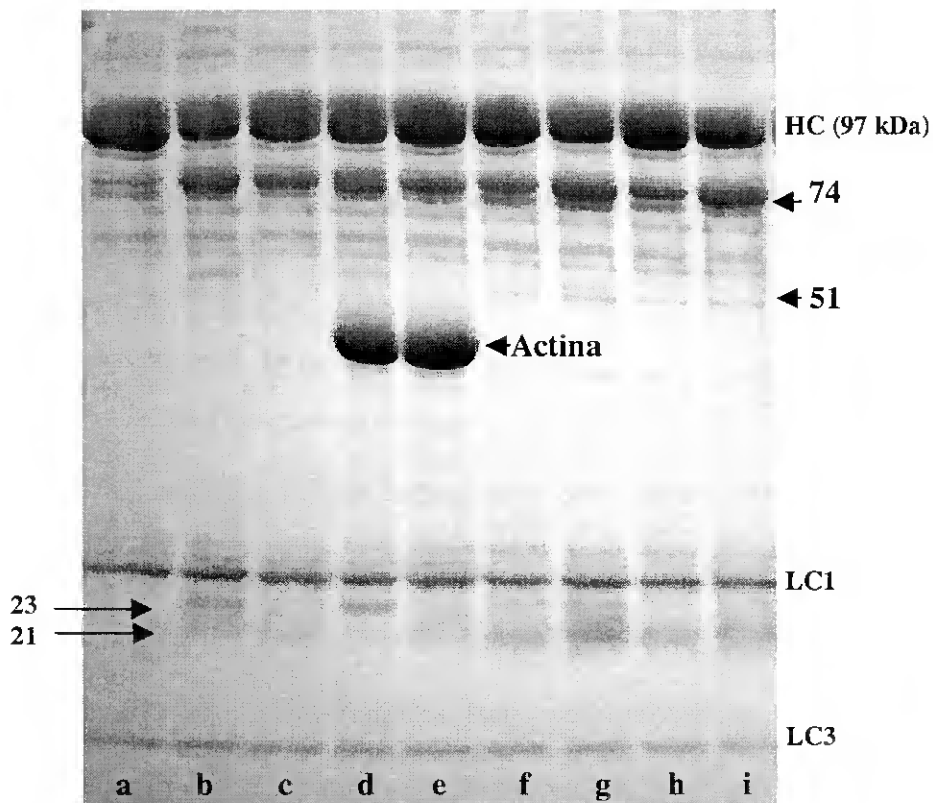


Figura VI.2 – Análise por SDS-PAGE (12%) das amostras de subfragmento-1 de miosina (4,5 μ M) irradiadas na ausência (a) e presença de 10 μ M V_{10} (100 μ M vanádio total adicionado como decavanadato) sem adições (b) ou com: 5 mM ATP (c); 10 μ M F-actina (d); e 5 mM ATP + 10 μ M F-actina (e). Os poços (f) a (i) contêm os complexo S1-ADP- V_1 e S1-ADP- AlF_4 (preparados como anteriormente descrito na secção V.2.4 do Capítulo V) na ausência (f) e (h) ou presença (g) e (i) de 10 μ M V_{10} , respectivamente. A fotoclivagem foi efectuada num meio contendo 25 mM KCl, 2,5 mM $MgCl_2$, 25 mM Hepes (pH 7,0), durante 20 minutos como se descreve na secção VI.2.1 dos Materiais e Métodos. HC, LC1 e LC3 referem-se respectivamente à cadeia pesada do S1, e às cadeias leves essenciais A1 e A2.

Verificou-se que a irradiação do subfragmento-1 de miosina (4,5 μM) durante 20 minutos, na presença de 100 μM de decavanadato (10 μM da espécie molecular V_{10}) induz a clivagem da cadeia pesada (97 kDa) nos sítios de 23 kDa, e numa menor extensão de 74 kDa do N-terminal, produzindo os produtos de clivagem de 23 e 21 kDa, respectivamente (Figura VI.2, poço b). É possível observar ainda um produto adicional de 51 kDa, provavelmente derivado da posterior clivagem do fragmento de 74 kDa. Na presença de 2 mM ATP, a clivagem no sítio de 23 kDa é inibida deixando apenas o sítio de 74 kDa disponível para fotoclivagem como se pode ver pelo aparecimento de uma banda ténue de 21 kDa (Figura VI.2, poço c). A mesma observação foi verificada na presença de $\text{S1}\cdot\text{ADP}\cdot\text{V}_1$ e $\text{S1}\cdot\text{ADP}\cdot\text{AlF}_4$ (Figura VI.2, poços g e -i), dois complexos conhecidos por mimetizar o estado intermediário miosina^{**} $\cdot\text{ADP}\cdot\text{Pi}$ originado durante o ciclo de hidrólise de ATP [Werber *et al.*, 1992; Peyser *et al.*, 1996; Smith e Rayment, 1996; Phan *et al.*, 1997]. Na presença de F-actina (10 μM), o local de 74 kDa foi totalmente protegido aumentando a clivagem no local que origina o fragmento de 23 kDa como se pode observar pela pelo aumento de intensidade da banda com esta massa molecular (Figura VI.2, poço d, indicado pela seta). No entanto, quando é adicionado ATP na presença de actina, o local de 23 kDa deixa de ser susceptível à fotoclivagem por decavanadato (Figura VI.2, poço e).

Com excepção do local de clivagem que origina o fragmento de 31 kDa, que aqui não se verificou, os padrões electroforéticos encontrados para a fotoclivagem de S1 mediada por decavanadato no presente trabalho são idênticos aos previamente reportados por Ringel *et al.* [1990] para a espécie tetramérica (na presença de concentrações de vanadato superiores a 0,2 mM) indicando dois possíveis locais de ligação: (i) Ser-181 (23 kDa) localizado no local activo; e (ii) loop-2 (74 kDa) localizado na junção dos fragmentos proteolíticos 50/20 kDa que participa na interface miosina/actina [Rayment *et al.*, 1993]. Para além disso, a clivagem parece ser igualmente modulada pelos ligandos

naturais da miosina, isto é, pelo ATP e pela actina. Estes resultados vão claramente de encontro aos obtidos anteriormente por espectroscopia de RMN (Capítulo III) em que se verificou que as espécies V_{10} e V_4 parecem competir para os mesmos sítios de ligação na miosina sendo a sua interacção modulada de uma forma semelhante pela actina e pelo ATP.

VI.3.2 – Decavanadato versus metavanadato na fotoclivagem de S1

De forma a averiguar se a espécie monomérica “contaminante”, isto é, adicionada com a solução de decavanadato, ou eventualmente formada durante a irradiação devido à decomposição da espécie decamérica, poderia justificar os padrões electroforéticos observados na Figura VI.2, efectuaram-se estudos de fotoclivagem com $4,5 \mu\text{M}$ de S1 para uma gama alargada de concentrações de meta- e decavanadato ($5\text{-}1000 \mu\text{M}$ vanádio total). A formação da banda de 74 kDa foi quantificada por densitometria e os resultados apresentam-se na Figura VI.3.

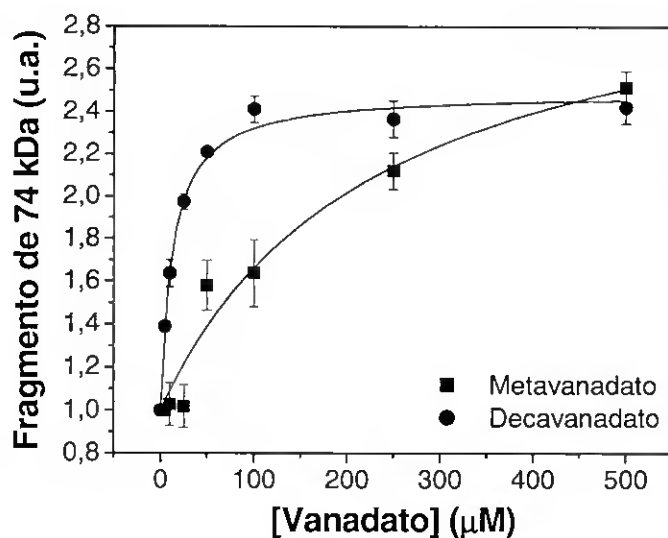


Figura VI.3 – Formação da banda de 74 kDa estimada por densitometria com o aumento da concentração de vanadato até $500 \mu\text{M}$ para soluções de metavanadato (quadrados) e decavanadato (círculos). A fotoclivagem foi efectuada com $4,5 \mu\text{M}$ de S1 num meio contendo 25 mM KCl , $2,5 \text{ mM MgCl}_2$, 25 mM Hepes ($\text{pH } 7,0$), durante 20 minutos como se descreve na secção VI.2.1 dos Materiais e Métodos. Os dados representam a média de três experiências de fotoclivagem diferentes.

Para a solução de decavanadato, a formação do fragmento de 74 kDa começa a observar-se para concentrações de vanadato de apenas 5 μM (0,5 μM da espécie molecular V_{10}) aumentando de uma forma acentuada até uma concentração de 50 μM (5 μM V_{10}) atingindo um máximo de 30 % de proteína clivada. Para a solução de metavanadato, a clivagem para concentrações inferiores a 100 μM (contendo essencialmente espécies monoméricas para as condições de reacção utilizadas) é fraca e, apenas para concentrações de vanadato (500 μM) favorecendo a formação de espécies oligoméricas, nomeadamente di- e tetravanadatos, é que a quantidade de fragmento clivado começa a ser comparável à observada para a solução de decavanadato. Este resultado exclui assim a possibilidade de contribuição da espécie monomérica na clivagem da proteína e indica os vanadatos oligoméricos como sendo as espécies fotoactivas.

Uma outra observação que se retirou deste estudo foi o da clivagem ocorrer apenas durante os primeiros minutos iniciais (até aos 20 minutos no máximo) envolvendo, mesmo após incubação prolongada e para concentrações de vanadato superiores (1 mM), um máximo de 30% e 45 % de moléculas S1 clivadas para a solução de decavanadato e metavanadato, respectivamente. Resultados idênticos foram observados para a Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático tem sido sugerido que se poderia dever à desnaturação da proteína após iluminação prolongada e que portanto a clivagem só ocorreria quando a ATPase possuísse a conformação nativa [Hua *et al.*, 2000]. Contudo, no presente caso é muito improvável que esta seja uma justificação plausível uma vez que a actividade ATPásica da miosina não mostrou ser afectada após irradiação na ausência de vanadatos. Este resultado levou-nos então a questionar as consequências da irradiação na estabilidade e composição das soluções de vanadato durante as experiências de fotoclivagem.

VI.3.3 – Decomposição de decavanadato após irradiação: análise por espectroscopia de UV/VIS.

De forma a examinar a estabilidade da espécie decamérica após irradiação monitorizaram-se, por espectroscopia de UV/VIS, as diferenças espectrais (240-700 nm) de soluções de decavanadato antes e após irradiação. Os resultados apresentam-se na Figura VI.4 como a diferença entre os espectros obtidos após e antes da irradiação, mostrando uma diminuição de uma banda de absorção centrada a 390 nm (característica da espécie decamérica, tal como se explica na secção III.3.2 do Capítulo III) que corresponde a um decréscimo da concentração do vanadato decamérico. Na presença de 4,5 μM de S1, após 1 minuto de irradiação, a banda de absorção a 390 nm da solução de decavanadato (250 μM vanádio total) diminui quase 38%, atingindo os 80% após 20 minutos (Figura VI.4-A). Para além disso, a diminuição desta banda ocorre apenas na presença de S1, com pequenas diferenças para concentrações de S1 entre 0,45 e 4,5 μM (Figura VI.4-B), e é acompanhado do aumento de uma banda larga de 650-700 nm indicativo da formação de espécies de vanadato reduzidas (vanadilo^{IV}). Foi demonstrado recentemente que o V^V da espécie decamérica (V₁₀) é mais facilmente reduzido que o das espécies metaméricas, nomeadamente o V₁, o V₂ e o V₄. A estrutura do V₁₀ em forma de gaiola confere-lhe uma rede interactiva de ligações V-O que estabilizam o oligómero, mas ao mesmo tempo facilitam a aceitação de electrões [Rao e Ramasarma, 2000]. Pode-se inferir daqui que a espécie decamérica se decompõe efectivamente no processo de fotoredução do vanadato (V^V) a vanadilo (V^{IV}) por intermédio da proteína apesar de ser relativamente independente da sua concentração. Isto poderia justificar em parte, o facto de se observar um máximo de 30% e 45 % de moléculas de S1 clivadas para a espécie decamérica e tetramérica, respectivamente.

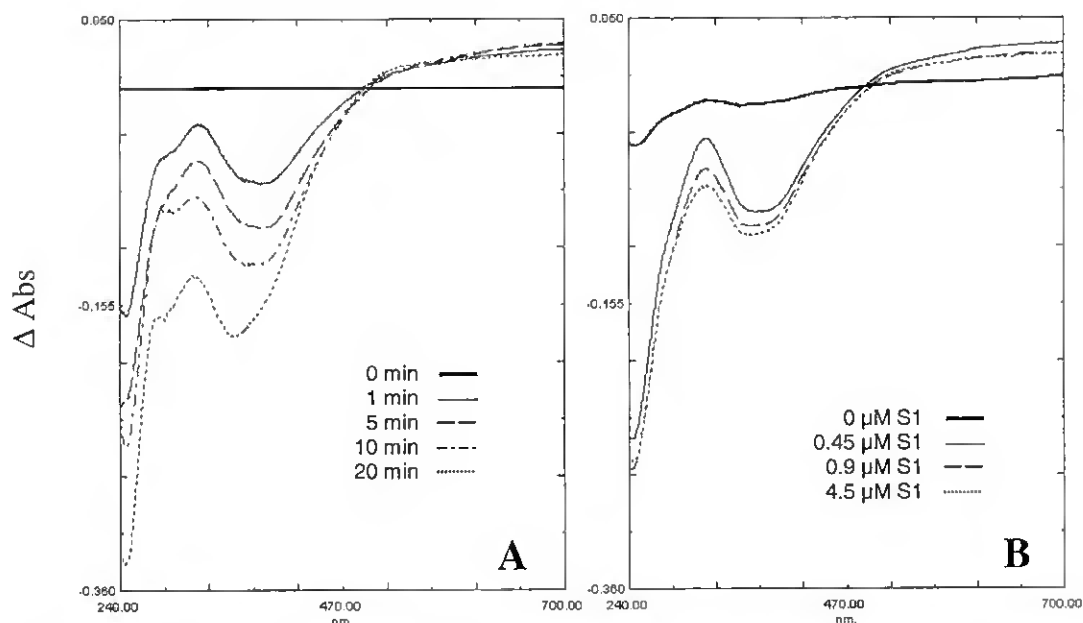


Figura VI.4 – Diferença espectral de 240-700 nm de soluções de decavanadato (250 μM vanádio total) num meio contendo 25 mM KCl, 2,5 mM MgCl_2 , 25 mM Hepes (pH 7,0): (A) após diferentes tempos de irradiação (0-20 min) na presença de 4,5 μM de S1; (B) na presença de diferentes concentrações de S1 (0; 0,45; 0,9 e 4,5 μM) a um tempo fixo de irradiação (10 min).

VI.3.4 – Formação de vanadilo (VO^{2+}) por redução de vanadato após irradiação: análise por espectroscopia de RPE.

A formação de oxovanádio (IV) proveniente da redução do decavanadato aquando da reacção de foto-oxidação de S1 (4,5 μM) na presença de solução de decavanadato (250 μM em vanádio total) foi monitorizada por espectroscopia de RPE e apresentam-se os resultados na Figura VI.5. Os produtos de redução do decavanadato na presença de subfragmento-1 de miosina (Figura VI.5-A) originaram espectros de RPE característicos do vanadilo (VO^{2+}). Por outro lado, na ausência de proteína não se observa qualquer sinal de RPE sugerindo uma das seguintes hipóteses: (i) o decavanadato na ausência de proteína e no meio de reacção utilizado não é reduzido por irradiação; (ii) o vanadilo eventualmente formado por redução do decavanadato não é estabilizado pela formação de um complexo que impeça a sua re-oxidação (os iões de vanadilo quelados são oxidados mais lentamente pelo oxigénio molecular que o vanadilo livre [Chasteen, 1981]). Tendo

em conta que não existem evidências de decomposição significativa de decavanadato quando irradiado na ausência de proteína (Figura VI.4) a primeira hipótese será a mais razoável. Este resultado indica ainda que o tampão Hepes, contrariamente ao que foi anteriormente sugerido para os tampões aminados em geral [Cremona *et al.*, 1990; Correia *et al.*, 1994], não actua como catalisador e/ou reagente na redução do vanadato.

A análise por espectroscopia de RPE foi também efectuada para soluções de decavanadato irradiadas na presença dos ligandos naturais da miosina, nomeadamente actina e MgATP. Ainda no painel A da Figura VI.5, podemos observar que a presença de F-actina (10 μM) aumenta ligeiramente a intensidade do sinal por um factor de aproximadamente 1,25 relativamente ao espectro de $\text{S1} + \text{V}_{10}$. Uma vez que a actina por si só, isto é, na ausência de S1, não promove o aparecimento de qualquer sinal de RPE (resultados não mostrados) pode-se depreender que a actina favorece a interacção do decavanadato com a proteína em concordância com todos os resultados experimentais até agora obtidos. Já no que diz respeito aos espectros de RPE obtidos para os estudos de irradiação com MgATP (5 mM), os resultados são mais ambíguos. Surpreendentemente, constatou-se que o decavanadato quando irradiado na presença de ATP (Figura VI.5-B) origina um sinal de RPE idêntico ao sinal do complexo vanadilo-ATP previamente caracterizado por Sakurai *et al.* [1982]. Por uma análise mais cuidada do espectro de $\text{V}_{10} + \text{ATP}$ é possível obter dois valores de A_{\parallel} (constante de acoplamento hiperfina) com base nos quais são propostas as estruturas que se apresentam na Figura VI.6, nomeadamente uma em que o vanadilo está coordenado com duas águas e dois fosfatos e outra em que está coordenado com duas águas e dois grupos hidroxilo nas posições equatoriais [Houseman *et al.*, 1995]. Uma vez que não existem evidências de redução do decavanadato na ausência de ATP e no meio de reacção utilizado, este resultado sugere que o nucleótido actua não só como reagente ao formar complexos com vanadilo, mas também como catalisador da própria reacção de redução sob iluminação UV.

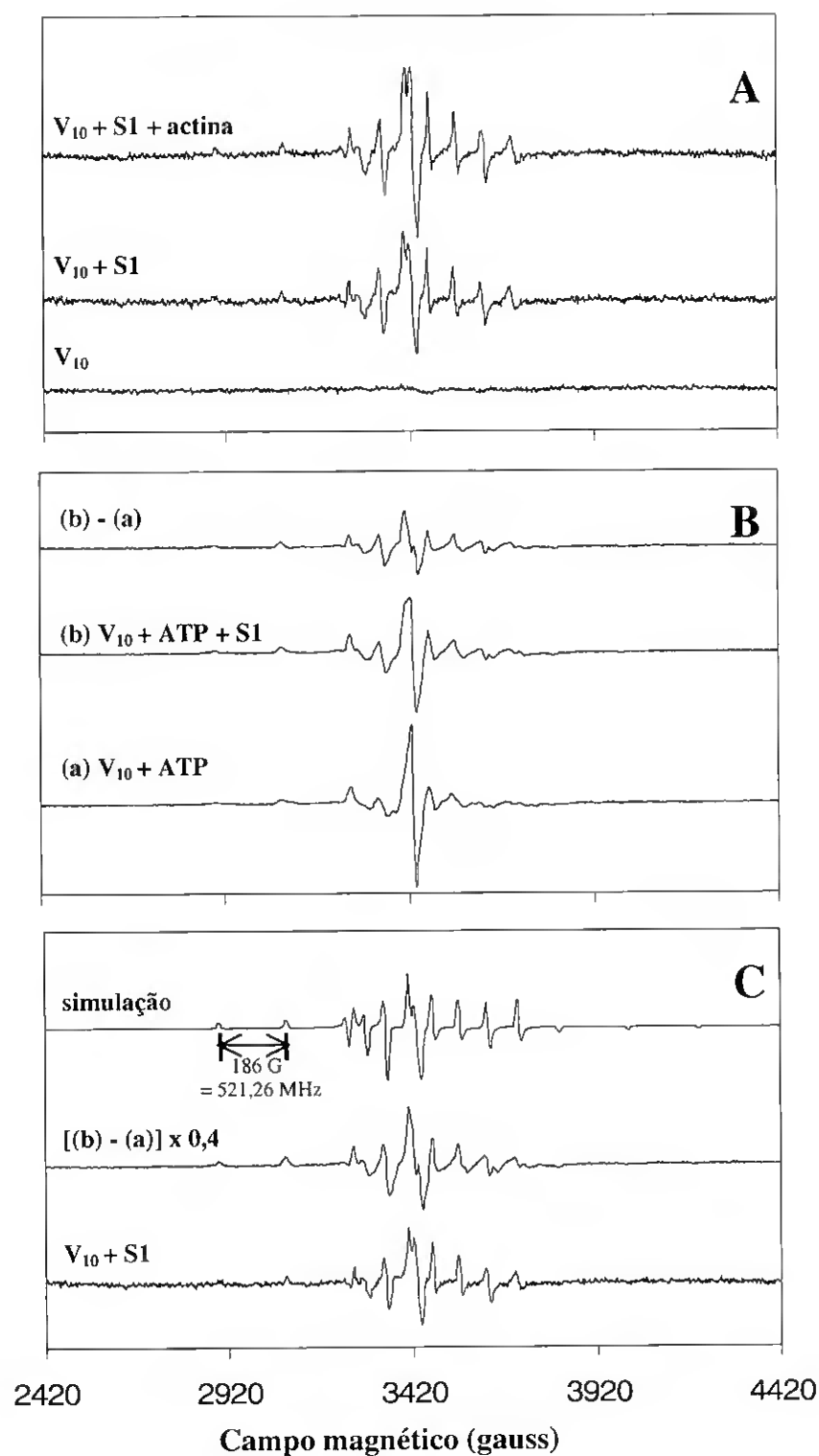


Figura VI.5 – (A) Espectros de RPE de soluções de decavanadato (250 μM vanádio total) após irradiação durante 20 minutos (tal como se descreve na secção VI.2.1 dos Materiais e Métodos) na ausência ou presença de S1 (4,5 μM) e F-actina (10 μM). (B) Efeito do ATP (2 mM) nos espectros de RPE de soluções de decavanadato irradiadas na ausência ou presença de S1 (4,5 μM). (C) Espectros de RPE normalizados de S1 + V_{10} na ausência e presença de ATP e respectiva simulação. Os parâmetros usados na simulação foram os seguintes: $g_{\perp} = 1,978$ e $g_{\parallel} = 1,944$; $A_{\perp} = 186,12$ MHz e $A_{\parallel} = 521,26$ MHz.

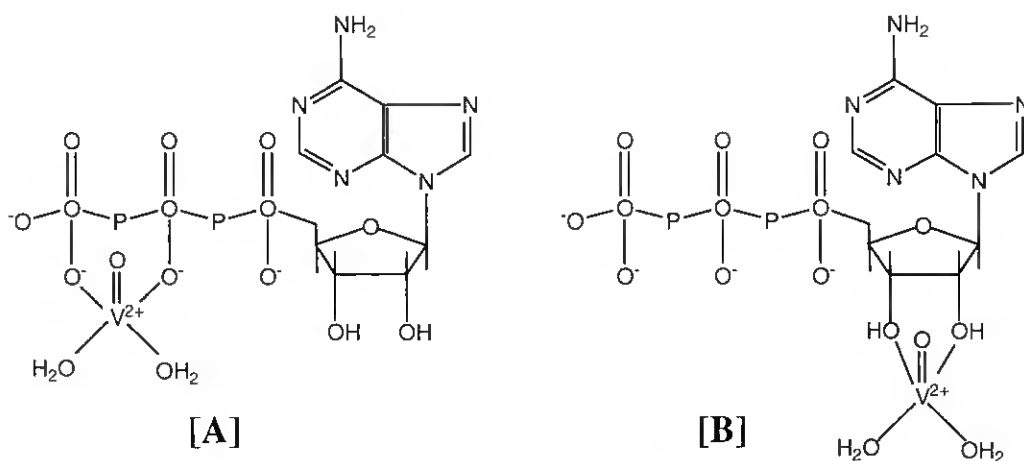


Figura VI.6 – Estruturas possíveis para os dois tipos de complexos ATP-vanadilo formados por irradiação da solução de decavanadato na presença de ATP. Através de simulação do espectro de RPE obtiveram-se dois valores de $A_{\parallel} = 163$ e 177 G, que indicam coordenação do vanadilo nas posições equatoriais com duas águas e dois grupos fosfatos [A] ou duas águas e dois grupos hidroxilo [B], respectivamente.

De forma a obter informação respeitante ao efeito de ATP na formação do complexo de vanadilo com a proteína procedeu-se à subtração dos espectros de RPE de soluções de decavanadato com ATP irradiadas na presença e ausência de subfragmento-1 de miosina (Figura VI.5-B). Verifica-se que o espectro obtido após subtração é idêntico ao espectro de S1 + V10, na ausência de ATP (Figura VI.5-A), mas com uma intensidade do sinal cerca de 2,5 vezes superior. Com base nestes resultados, podemos limitar a interpretação dos factos a três hipóteses: (i) o ATP ao ligar-se poderá estar a promover a interacção do decavanadato com a proteína num local que seja mais favorável à captação do electrão proveniente do radical peroxo da Ser-181 por parte do oligovanadato; (ii) o ATP poderá estar a induzir uma conformação na proteína de maior afinidade para o vanadilo; (iii) o ATP ao catalisar a redução do decavanadato poderá estar a aumentar a concentração de vanadilo disponível para formar um complexo com a proteína. Estas observações podem parecer, à primeira vista, estar em desacordo com os resultados de fotoclivagem previamente obtidos que indicaram que a clivagem de S1 por decavanadato é

inibida na presença do ATP. Contudo, não podemos descurar que o facto de haver formação de vanadilo por redução de decavanadato não implica necessariamente que ocorra clivagem da proteína. Por um lado, o ATP ao catalisar a redução do decavanadato e ao formar um complexo estável com o vanadilo pode estar a baixar a concentração de vanádio (V) quer na forma de vanadato decamérico quer noutras formas de vanadato à medida que a irradiação procede e conseqüentemente diminuir a clivagem. O facto do vanádio reduzido não ser competente para clivar a proteína não é surpreendente, uma vez que foi demonstrado que o primeiro passo na fotoclivagem de S1 no local activo é a oxidação da Ser-181 a um aldeído [Cremonesi *et al.*, 1988]. Assim, a fotoclivagem tem de envolver necessariamente oxidação por vanadato, o maior e mais potente estado de oxidação do vanádio. Por outro lado, a formação de um complexo de vanadilo com a própria proteína pode modificar grupos funcionais que sejam essenciais ao processo de foto-oxidação impedindo assim a clivagem.

Na Figura VI.5-C, podemos observar os espectros de RPE normalizados obtidos para a irradiação de $V_{10} + S1$ na ausência e presença de ATP bem como o espectro de simulação a partir do qual se obtiveram os valores de g e A para caracterização do complexo. Com base na constante de acoplamento $A_{//}$ de estudos com complexos modelo propõem-se que a coordenação do vanadilo se dê com dois oxigénios de duas moléculas de água, um nitrogénio equatorial de um grupo amina (provavelmente de uma lisina) e um oxigénio equatorial de um grupo carboxilato (que poderá provir de um aspartato ou de um glutamato) como se mostra na Figura VI.7. Este resultado é curioso na medida em que no modelo proposto por Grammer *et al.* [1996] foi sugerido que um resíduo glutamato (Glu-179 ou Glu-459) deveria actuar como catalisador ácido durante o processo de foto-oxidação do S1 (ver Figura VI.1). O vanadilo ao complexar eventualmente com um destes resíduos poderia impedir assim o processo de fotoclivagem.

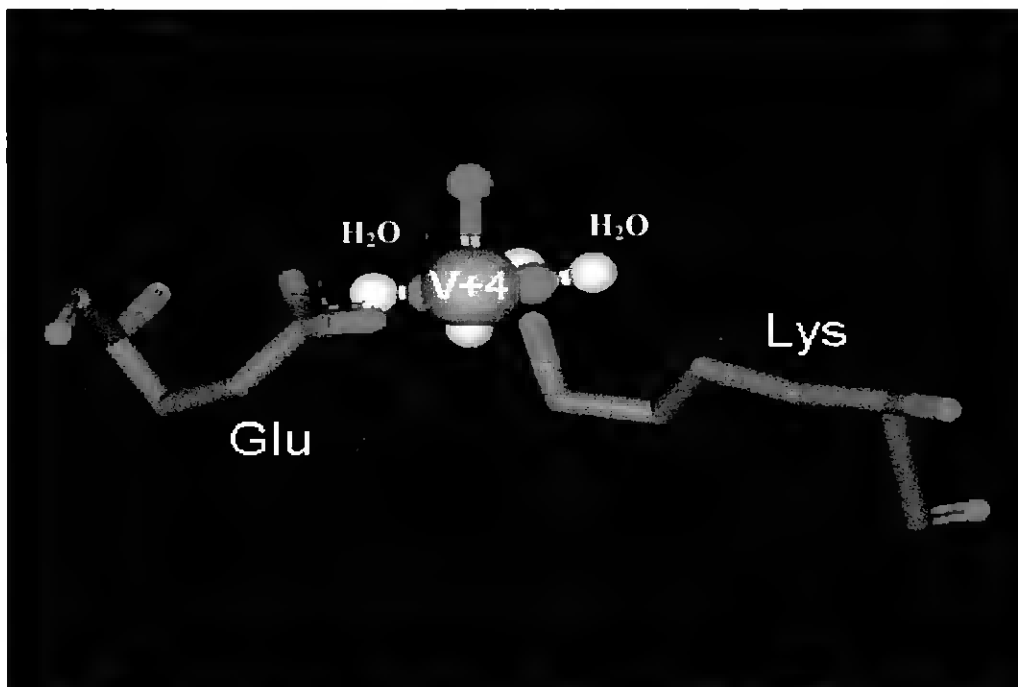


Figura VI.7 – Estrutura proposta para a coordenação do vanádio (VO^{2+}) com o subfragmento-1 de miosina com base no valor da constante de acoplamento hiperfina ($A_{\parallel} = 521,26 \text{ MHz}$) obtida através do gráfico de simulação que se mostra na Figura VI.6-C.

Como termo de comparação, os estudos de RPE foram igualmente conduzidos para soluções de metavanadato ($500 \mu\text{M}$) irradiadas durante 20 minutos na ausência ou presença de subfragmento-1 de miosina ($4,5 \mu\text{M}$) e seus ligandos naturais, actina ($10 \mu\text{M}$) e MgATP (5 mM). A concentração de $500 \mu\text{M}$ para a solução de metavanadato foi escolhida de forma a termos uma % de moléculas de S1 de miosina clivadas comparável à da solução de decavanadato. Assim, podemos verificar na Figura VI.8 que os sinais de RPE da solução de metavanadato obtidos com S1 na ausência e presença de actina são idênticos, em forma e em intensidade, aos obtidos para a solução de decavanadato nas mesmas condições experimentais. Do mesmo modo, verifica-se que o efeito do ATP nos espectros de RPE de metavanadato na ausência ou presença de S1 é semelhante ao que se verificou para o decavanadato, comprovando mais uma vez que, as espécies tetramérica e decamérica partilham os mesmos locais de ligação no subfragmento-1 de miosina.

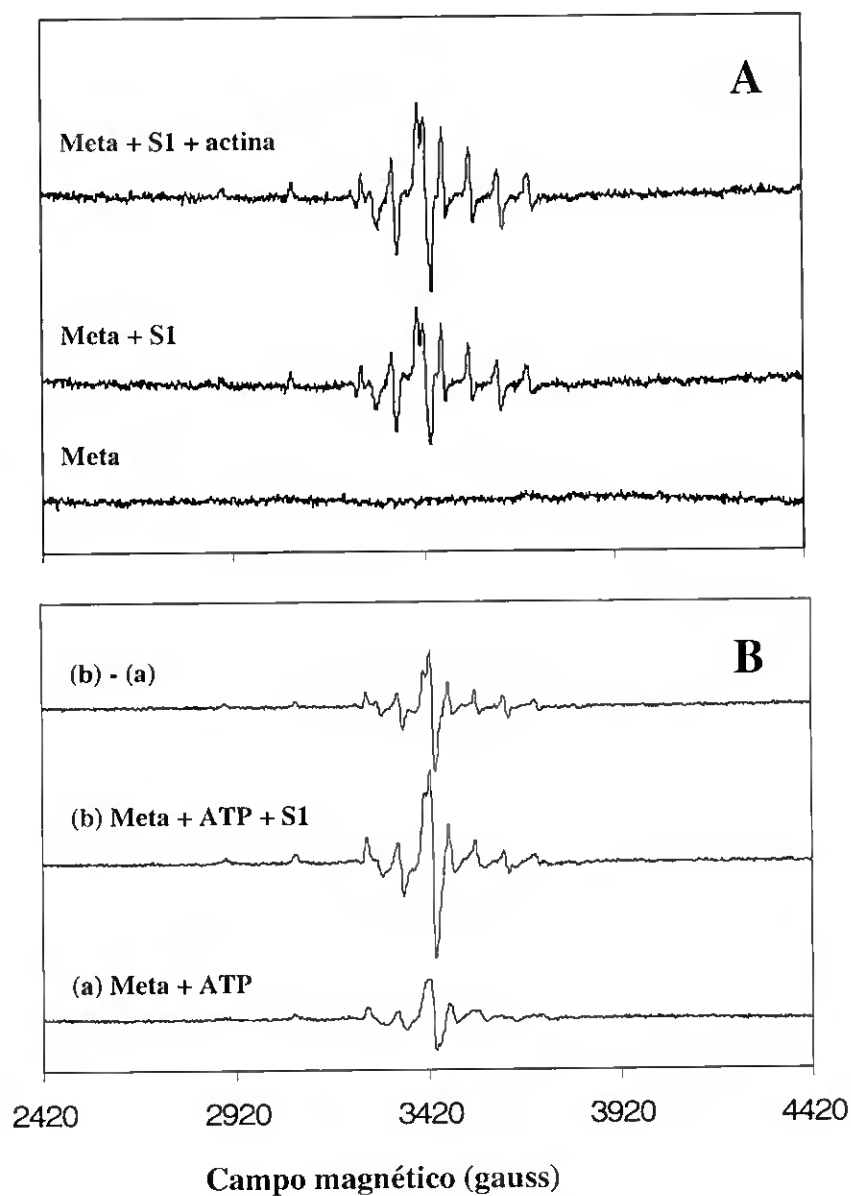


Figura VI.8 – (A) Espectros de RPE de soluções de metavanadato (500 μM) após irradiação durante 20 minutos (tal como se descreve na secção VI.2.1 dos Materiais e Métodos) na ausência ou presença de S1 (4,5 μM) e F-actina (10 μM). (B) Efeito do ATP (2 mM) nos espectros de RPE de soluções de metavanadato irradiadas na ausência ou presença de S1 (4,5 μM).

VI.4 - Conclusões

Os resultados apresentados no presente capítulo demonstraram que para além da espécie tetramérica (V_4), também a espécie decamérica (V_{10}) é foto-activa e aparentemente é melhor substrato para a reacção de fotoclivagem do subfragmento-1 de miosina apesar de se decompor muito rapidamente pela fotoredução de vanadato (V^V) a vanadilo (V^{IV}). Adicionalmente, os padrões de clivagem idênticos encontrados para as soluções de decavanadato e metavanadato sugerem que o V_{10} e o V_4 partilham os mesmos sítios de ligação na miosina, nomeadamente um de maior afinidade (23 kDa) localizado na sequência 178-185 (loop-P) que forma parte do local activo, e outro de menor afinidade (74 kDa) situado na sequência 627-646 (loop-2) que faz parte da interface miosina/actina. A clivagem é modulada pelos ligandos naturais da enzima da mesma forma para ambos os oligómeros, ou seja, o primeiro local de clivagem é inibido por ATP e o segundo por actina. Não obstante, verifica-se por espectroscopia de RPE que a presença destes ligandos não afecta o espectro de RPE relativamente à mesma amostra irradiada na ausência dos ligandos aumentando a coordenação do vanadilo com a proteína por um factor de 1,2 e 2,5 para a actina e o ATP, respectivamente. Enquanto que o aumento de coordenação obtido com actina está de acordo com os resultados experimentais anteriormente obtidos que indicavam um ligeiro aumento da afinidade de V_{10} para a miosina na presença deste ligando, o aumento de coordenação com ATP parece, à primeira vista, estar em desconformidade com resultados anteriormente apresentados. Contudo, o facto de haver formação de vanadilo por redução de decavanadato não implica que ocorra foto-oxidação ou clivagem da proteína.

VI.5 – Referências Bibliográficas

- Bergamini, C. M. and M. Signorini (1991). "Photocleavage of muscle glycogen phosphorylase by vanadate." Biochem Int **25**(1): 143-9.
- Bergamini, C. M., M. Signorini, et al. (1995). "Inactivation and cleavage of liver 6-P-gluconate dehydrogenase during irradiation in the presence of vanadate." Arch Biochem Biophys **321**(1): 1-5.
- Cantor, C. R. And P. R. Schimmel (1980). "Biophysical Chemistry. Part II: Techniques for the study of biological structure and function." W. H. Freeman and Company, New York, pp. 525-534.
- Chasteen, N. D. (1981). In: Biological Magnetic Resonance, (Berliner, L. and J. Reuben, eds.), Plenum Press, pp 53-119.
- Chasteen, N. D. (1983). "The biochemistry of vanadium." Struct. Bonding **53**: 105-138.
- Chaussepied, P. and M. F. Morales (1988). "Modifying preselected sites on proteins: the stretch of residues 633-642 of the myosin heavy chain is part of the actin-binding site." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(20): 7471-5.
- Correia, J. J., L. D. Lipscomb, et al. (1994). "Cleavage of tubulin by vanadate ion." Arch Biochem Biophys **309**(1): 94-104.
- Crans, D. C., K. Sudhakar, et al. (1992). "Interaction of rabbit muscle aldolase at high ionic strengths with vanadate and other oxoanions." Biochemistry **31**(29): 6812-21.
- Cremo, C. R., J. C. Grammer, et al. (1988). "UV-induced vanadate-dependent modification and cleavage of skeletal myosin subfragment 1 heavy chain. 2. Oxidation of serine in the 23-kDa NH₂-terminal tryptic peptide." Biochemistry **27**(22): 8415-20.

- Cremona, C. R., J. C. Grammer, et al. (1989). "Direct chemical evidence that serine 180 in the glycine-rich loop of myosin binds to ATP." J Biol Chem **264**(12): 6608-11.
- Cremona, C. R., G. T. Long, et al. (1990). "Photocleavage of myosin subfragment 1 by vanadate." Biochemistry **29**(34): 7982-90.
- Cremona, C. R., J. C. Grammer, et al. (1991). "Vanadate-mediated photocleavage of myosin." Methods Enzymol **196**: 442-9.
- Cremona, C. R., J. A. Loo, et al. (1992). "Vanadate catalyzes photocleavage of adenylate kinase at proline-17 in the phosphate-binding loop." Biochemistry **31**(2): 491-7.
- Gibbons, I. R. and G. Mocz (1991). "Photocatalytic cleavage of proteins with vanadate and other transition metal complexes." Methods Enzymol **196**: 428-42.
- Grammer, J. C., C. R. Cremona, et al. (1988). "UV-induced vanadate-dependent modification and cleavage of skeletal myosin subfragment 1 heavy chain. 1. Evidence for active site modification." Biochemistry **27**(22): 8408-15.
- Grammer, J. C., J. A. Loo, et al. (1996). "Chemistry and mechanism of vanadate-promoted photooxidative cleavage of myosin." Biochemistry **35**(48): 15582-92.
- Houseman, A. L., R. LoBrutto, et al. (1995) "Effects of nucleotides on the protein ligands to metals at the M2 and M3 metal-binding sites of the spinach chloroplast F1-ATPase." Biochemistry **34**: 3277-85.
- Ko, Y. H., C. R. Cremona, et al. (1992). "Vanadate-dependent photomodification of serine 319 and 321 in the active site of isocitrate lyase from Escherichia coli." J Biol Chem **267**(1): 91-5.
- Lee-Eiford, A., R. A. Ow, et al. (1986). "Specific cleavage of dynein heavy chains by ultraviolet irradiation in the presence of ATP and vanadate." J Biol Chem **261**(5): 2337-42.

- Markham, G. D. (1984). "Structure of the Divalent Metal-Ion Activator Binding-Site of S-Adenosylmethionine Synthetase Studied by Vanadyl(IV) Electron-Paramagnetic Resonance." Biochemistry **23**(3): 470-478.
- Mocz, G. (1989). "Vanadate-mediated photocleavage of rabbit skeletal myosin." Eur J Biochem **179**(2): 373-8.
- Mogel, S. N. and B. A. McFadden (1989). "Photomodification of a serine at the active site of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by vanadate." Biochemistry **28**(13): 5428-31.
- Molnar, E., S. Varga, et al. (1991). "Differences in the susceptibility of various cation transport ATPases to vanadate-catalyzed photocleavage." Biochim Biophys Acta **1068**(1): 17-26.
- Muhrad, A., Y. M. Peyser, et al. (1991). "Effect of actin, ATP, phosphates, and pH on vanadate-induced photocleavage of myosin subfragment 1." Biochemistry **30**(4): 958-65.
- Peyser, Y. M., M. Ben-Hur, et al. (1996). "Effect of divalent cations on the formation and stability of myosin subfragment 1-ADP-phosphate analog complexes." Biochemistry **35**(14): 4409-16.
- Phan, B. C., Y. M. Peyser, et al. (1997). "Effect of complexes of ADP and phosphate analogs on the conformation of the Cys707-Cys697 region of myosin subfragment 1." Eur J Biochem **243**(3): 636-42.
- Rao, A. V. and T. Ramasarma (2000). "NADH-dependent decavanadate reductase, an alternative activity of NADP-specific isocitrate dehydrogenase protein." Biochim Biophys Acta **1474**(3): 321-30.
- Rayment, I., H. M. Holden, et al. (1993). "Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction." Science **261**(5117): 58-65.

- Ringel, I., Y. M. Peyser, et al. (1990). "51V NMR study of vanadate binding to myosin and its subfragment 1." Biochemistry **29**(38): 9091-6.
- Signorini, M. and C. M. Bergamini (1990). "Vanadate promotes photooxidative cleavage and inactivation of muscle phosphofructokinase." Biochem Biophys Res Commun **172**(2): 919-24.
- Smith, C. A. and I. Rayment (1995). "X-ray structure of the magnesium(II)-pyrophosphate complex of the truncated head of Dictyostelium discoideum myosin to 2.7 Å resolution." Biochemistry **34**(28): 8973-81.
- Smith, C. A. and I. Rayment (1996). "X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain to 1.9 Å resolution." Biochemistry **35**(17): 5404-17.
- Tang, W. Y. and I. R. Gibbons (1987). "Photosensitized cleavage of dynein heavy chains. Cleavage at the V2 site by irradiation at 365 NM in the presence of oligovanadate." J Biol Chem **262**(36): 17728-34.
- Vegh, M., E. Molnar, et al. (1990). "Vanadate-catalyzed, conformationally specific photocleavage of the Ca²⁺(+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum." Biochim Biophys Acta **1023**(2): 168-83.
- Walker, J. E., M. Saraste, et al. (1982). "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold." Embo J **1**(8): 945-51.
- Werber, M. M., Y. M. Peyser, et al. (1992). "Characterization of stable beryllium fluoride, aluminum fluoride, and vanadate containing myosin subfragment 1-nucleotide complexes." Biochemistry **31**(31): 7190-7.

CAPÍTULO VII

ESTUDOS DE MODELAÇÃO MOLECULAR DA INTERACÇÃO DE DECAVANADATO COM MIOSINA

VII.1 – Introdução

Os métodos computacionais contemporâneos revolucionaram todos os aspectos da investigação científica relacionada com interacções ligando-proteína. São particularmente úteis quando aplicados em combinação com dados experimentais, quer para obter confirmação destes mesmos dados, quer no sentido de fornecer linhas de investigação para novas experiências. No contexto da modelação molecular de interacções ligando-proteína podem ser analisados vários aspectos. O ponto de partida é obviamente uma estrutura proteica com a qual começar. Esta estrutura pode ser obtida por determinação experimental, normalmente por cristalografia de raios-X ou por espectroscopia de RMN. Quando a estrutura não está disponível pode-se recorrer a técnicas de modelação para previsão da estrutura proteica. Com a estrutura da proteína definida, pode-se analisar então a estrutura para potenciais sítios de ligação e/ou as características desse local de interacção com o ligando. Em casos em que a estrutura da proteína está disponível, mas não a geometria do complexo, e quando as dimensões do ligando são suficientemente pequenas para ser realizável uma busca detalhada das suas possíveis conformações é possível elucidar os mecanismos de interacção do ligando através da aplicação de procedimentos computacionais que acomodem as duas moléculas (o ligando e a proteína) em conformações energeticamente favoráveis (“docking”).

VII.1.1 – Previsão da estrutura da proteína

A fonte principal de estruturas de proteínas determinadas experimentalmente é a base de dados PDB (“Protein Data Bank”, www.rcsb.org). Actualmente esta base de dados contém aproximadamente 30.000 estruturas de proteínas. Contudo, a estrutura da proteína de interesse nem sempre é conhecida e como tal pode haver necessidade de recorrer a técnicas de previsão de estrutura tridimensional de forma a obter as coordenadas da proteína alvo. Cada proteína no seu estado nativo funcional é “enrolada” de uma forma específica, mas o mecanismo pela qual um determinado enrolamento (“folding”) é adoptado ainda não é passível de ser mimetizado computacionalmente. A correlação entre a sequência primária da proteína e o “folding” é suficientemente fraca para que o mesmo padrão de “folding” possa ser adoptado por proteínas com sequências distintas. Assim, foi sugerido que algumas características gerais da sequência determinam pelo menos parte do processo de “folding” e que o número de padrões que podem surgir deste processo é muito inferior ao número de proteínas [Chothia, 1992].

Os métodos de previsão da estrutura de proteínas podem ser distinguidos em três categorias diferentes [Harding e Chowdhry, 2001]. Na categoria das previsões “*Ab initio*”, começa-se com a sequência primária e tenta-se prever a estrutura secundária ou terciária da proteína. Os métodos de previsão da estrutura secundária baseiam-se em análises estatísticas de estruturas conhecidas. Assim que as unidades da estrutura secundária são atribuídas tenta-se empacotá-las tri-dimensionalmente, usando vários critérios de avaliação para as diferentes estruturas geradas. A segunda categoria engloba técnicas que tentam averiguar se uma determinada sequência é compatível com uma das estruturas numa base de dados de “foldings” conhecidos. Têm em conta a possibilidade de duas proteínas poderem partilhar foldings semelhantes sem haver, contudo, uma relação entre as duas sequências. A terceira categoria consiste na modelação por homologia, que é normalmente o método de escolha quando existe uma clara relação ou homologia entre a sequência da

proteína alvo e a sequência de pelo menos uma estrutura conhecida. Esta técnica baseia-se na suposição de que as estruturas terciárias de duas proteínas serão semelhantes se as suas sequências forem homólogas e é normalmente o método que origina resultados mais exactos.

Primeiramente, as sequências das proteínas com estrutura conhecida devem ser identificadas através de uma procura numa base de dados de sequências. Seguidamente, procede-se ao alinhamento da sequência alvo com as de estrutura conhecida. Este procedimento é relativamente simples se a percentagem de identidade entre as sequências comparadas for superior a 45%. Por último, para a previsão da estrutura por modelação comparativa podem ser adoptados diferentes “softwares”, sendo o programa MODELLER um dos mais utilizados. Este programa foi desenvolvido por Sali e Blundell [1993] e baseia-se num tipo de modulação por restrições derivadas das estruturas de proteínas homólogas. Estas restrições podem incluir distâncias inter-atómicas, acessibilidade do solvente, estrutura secundária e ligações por hidrogénio.

VII.1.2 – Análise da estrutura proteica

Uma vez obtida a estrutura tridimensional da proteína de interesse, esta pode ser analisada usando diferentes técnicas computacionais. O propósito de tal análise pode ser o mais variado. Se o sítio de ligação do ligando não é conhecido poderá ser importante determinar sítios de ligação possíveis. Por exemplo, Jones e Thornton [1997] descobriram que as propriedades das interfaces dependem fortemente do tipo de ligandos envolvidos: moléculas que existem tanto em complexo como em estruturas independentes tendem a formar interfaces polares nos complexos. Moléculas pequenas ligam normalmente por “docking” a uma fenda do seu parceiro de ligação. Estas e outras características servem de base para a previsão de possíveis interfaces.

Outra técnica usualmente utilizada é calcular uma representação de superfície da proteína e mapear certas propriedades tais como hidrofobicidade ou potencial electrostático. A localização de grupos polares e carregados numa proteína pode ter uma influência significativa na forma do potencial.

VII.1.3 – “Docking” de ligandos a proteínas

O objectivo do “docking” molecular é o de encontrar o modo preferencial de ligação de um ligando num complexo proteína-ligando. Normalmente, o processo de “docking” engloba quatro passos: (i) identificação e preparação do sítio do receptor; (ii) preparação do ligando; (iii) “docking” do ligando; (iv) avaliação das posições obtidas pelo “docking”. Os critérios de diferenciação entre os vários métodos de “docking” incluem a forma como o sítio do receptor é descrito, o tipo de ligando (molécula pequena ou proteína), o algoritmo usado para realizar o “docking” e o procedimento de avaliação [Harding e Chowhry, 2001].

Uma vez seleccionada a estrutura da proteína para o processo de “docking”, que deverá ter uma resolução de pelo menos 2 Å (para estruturas de raios-X), deve ser determinada a região de interesse para a realização do “docking”. Nos casos em que não é conhecida a localização do sítio de ligação, pode ser identificada por inspecção gráfica ou através de um método automatizado. Muitos programas de “docking” não usam uma descrição atómica do sítio de ligação mas baseiam-se em representações alternativas. Por exemplo, o local de ligação de uma proteína pode ser representada por um conjunto de esferas. Outra representação possível do sítio de ligação é a utilização de uma grelha em que os nós da mesma contêm informação acerca das energias de interacção entre átomos sonda e o sítio de ligação. O ligando deve ser considerado seguidamente. Isto pode envolver o cálculo prévio dos diferentes conforméros, atribuição de ligações flexíveis, a

construção de uma grelha de representação da molécula ou a avaliação de cargas parciais para os átomos do ligando [Harding e Chowdhry, 2001].

Após preparação do receptor e do ligando, o processo de examinação do “docking” é iniciado. As técnicas reportadas para o “docking” automatizado caem em duas categorias: métodos de “matching” e métodos de simulação de “docking” [Morris *et al.*, 1998]. Os métodos de “matching” criam um modelo do sítio activo incluindo sítios onde ocorrem pontes de hidrogénio e sítios que são estericamente acessíveis, e seguidamente tentam “ancorar” o ligando no modelo como um corpo rígido através do ajuste da sua geometria à do local activo. A segunda classe de técnicas de “docking”, modela o ligando no receptor alvo com maior detalhe: o ligando parte aleatoriamente fora da proteína e vai explorando translações, orientações, e conformações até que é encontrado um sítio ideal. Estas técnicas são normalmente mais lentas que as técnicas de “matching”, mas permitem flexibilidade do ligando e podem utilizar uma descrição mais detalhada para calcular a energia do ligando no contexto do possível sítio de ligação. O programa AUTODOCK é um exemplo de um programa que utiliza este método [Morris *et al.*, 1998]. Este programa usa um algoritmo designado de “Monte Carlo simulated annealing” para a procura de configurações. Cada uma das configurações aleatórias é avaliada energeticamente. Se o movimento é energeticamente decrescente, é aceite. No caso da energia aumentar comparativamente à última configuração, o passo só é aceite após comparação com um factor de Boltzman. Para temperaturas suficientemente elevadas quase todos os passos são aceites. Para temperaturas mais baixas, são aceites menos estruturas de alta energia. A rápida avaliação da energia é conseguida através de um pré-cálculo dos potenciais de afinidade atómica para cada tipo de átomo na molécula de ligando.

VII.1.4 – Objectivos

O estudo que se apresenta neste capítulo teve como objectivo examinar por modelação molecular a interacção de decavanadato com miosina. Para isso, procedeu-se ao “docking” da molécula de decavanadato em estruturas 3D de miosina seleccionadas da seguinte forma: (i) pesquisa numa base de dados de estruturas de miosina do tipo II determinadas por difracção de raios-X; (ii) comparação das sequências de estrutura conhecida com a sequência de interesse (miosina do tipo II de músculo esquelético de coelho); (iii) modelação por homologia das estruturas de miosina de interesse onde se irá realizar o “docking”. Seguidamente, procurou-se fazer uma análise prévia dos possíveis locais de ligação na estrutura de miosina de coelho para se proceder então ao “docking” de decavanadato numa estrutura de miosina com melhor resolução e em diferentes estados conformacionais do ciclo catalítico. Por último, após uma análise da compatibilidade dos resultados teóricos alcançados pelo “docking” molecular no presente capítulo com os resultados experimentais obtidos anteriormente, propõe-se um mecanismo de modulação pelo decavanadato da actividade ATPásica da miosina estimulada por actina.

VII.2 – Materiais e Métodos

VII.2.1 – Obtenção das estruturas 3D de miosina e de decavanadato

A pesquisa de estruturas tridimensionais de miosina do tipo II foi realizada na base de dados “Protein Data Bank” (PDB) [<http://www.rcsb.org/pdb>]. O alinhamento múltiplo e global das sequências primárias de miosina do tipo II foi realizado usando o programa ClustalW [<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>] e Needle [<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>], respectivamente. O programa Modeller (versão 6.2) [Sali e Blundell, 1993] foi usado para a construção do modelo de miosina de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) a partir da estrutura de miosina de músculo esquelético de galinha (*Galus galus*) e para construção de alguns fragmentos de sequência (“loops”) não resolvidos na estrutura cristalográfica da miosina de galinha ou de *Dictyostelium discoideum*. Os modelos criados foram validados com o programa Procheck [Laskowski e tal., 1993]. As coordenadas atômicas da molécula de decavanadato ($V_{10}O_{28}^{6-}$) foram adquiridas a partir da base de dados “Cambridge data base” [<http://www.ccdc.cam.ac.uk>].

VII.2.2 – Estudos de modelação molecular da interacção de decavanadato com miosina

Toda a modelação molecular foi realizada num computador pentium IV com 2.4 Ghz e 1 Gb de Ram tendo sido usado o programa Pymol [DeLano, 2002] para visualização das imagens. O potencial electrostático de superfície do modelo de miosina de músculo esquelético de coelho foi calculado com o programa MEAD [Bashford e Karplus, 1990].

O “docking” molecular foi realizado com o programa AUTODOCK (versão 3.0) usando o algoritmo de “Monte Carlo Simulated Annealing” [Morris *et al.*, 1998]. Em todas as simulações a proteína e o ligando foram assumidas como corpos rígidos. Para a proteína, a falta de flexibilidade conformacional está já implicada no algoritmo usado pelo programa. Relativamente ao ligando, a molécula de decavanadato possui uma estrutura

compacta e suficientemente rígida uma vez que é um ião altamente coordenado. À semelhança dos autores Pezza *et al.* [2002], as forças de van der Waals e os parâmetros de solvatação usados para o vanádio na base de dados do AUTODOCK foram os mesmo do ferro. A atribuição das cargas parciais ao ião decavanadato foi baseada nos resultados de Kempf *et al.* [1992]. Estes autores, baseados em cálculos SCF, previram que os dois oxigénios interiores OA e OB deveriam estar próximos de um estado de ligação iónico, com uma carga de -2, enquanto que todos os outros oxigénios ligeiramente acima ou abaixo de -1. De acordo com a distribuição de densidade de carga, os átomos de vanádio deveriam carregar quantidades semelhantes de carga. Para as simulações de “docking” do presente trabalho, foi atribuída a carga de -2 a OA e OB, de -1 a todos os outros oxigénios e uma carga de +2,4 aos 10 átomos de vanádio de forma a produzir a carga formal de -6.

VII.3 – Resultados e Discussão

VII.3.1 – Obtenção das estruturas 3D de miosina para o “docking” de decavanadato

Idealmente, a estrutura de miosina a utilizar nos estudos de “docking” seria a de músculo esquelético de coelho uma vez que foi a proteína usada nos estudos experimentais reportados nos capítulos anteriores. Apesar da estrutura cristalográfica de miosina ter sido resolvida para diferentes organismos numa variedade de conformações, ainda não foi resolvida para o coelho. Nesse sentido, foi efectuada uma pesquisa de estruturas de miosina do tipo II disponíveis na base de dados PDB com o intuito de seleccionar estruturas modelo para utilização nos estudos de “docking”. Os parâmetros de selecção incluíram não só o grau de homologia entre as sequências de estrutura conhecida e a de interesse, como também a variedade de estados conformacionais resolvidos por cristalografia para a mesma proteína. Enquanto que o subfragmento-1 (S1) de miosina de músculo esquelético de galinha – *Galus galus* (código de acesso: 2MYS) [Rayment *et al.*, 1993a] foi a estrutura encontrada cuja sequência primária tem o maior grau de homologia com a de coelho, a “cabeça” truncada de miosina II de *Dictyostelium discoideum* (S1Dc) foi a miosina encontrada cuja estrutura foi determinada no maior número de estados conformacionais. O domínio catalítico de S1Dc, contrariamente à maioria de outras miosinas, cristaliza em formas apropriadas a uma análise estrutural de resolução elevada. A estrutura de S1Dc foi determinada com MgPP_i, MgADP, MgAD·BeF_x, MgADP·AlF₄, MgADP·VO₄, MgAMPPNP, MantATP e MgATP no local activo e na forma apo [Fisher *et al.*, 1995; Smith e Rayment, 1995, 1996; Bauer *et al.*, 1997; Gulick *et al.*, 1997; Gulick *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2000]. Estes complexos foram investigados porque diversos estudos bioquímicos e fisiológicos demonstraram que corresponderiam a vários estados conformacionais adoptados durante o ciclo de hidrólise de ATP que ocorre na contracção muscular.

Procedendo-se ao alinhamento das sequências de miosina de coelho, galinha e *D. discoideum* dos domínios correspondentes ao subfragmento-1 de miosina (Figura VII.1) determinaram-se as % de identidade e semelhança entre os pares de sequências alinhados (Tabela VII.1). Como se verifica, a % de identidade dos resíduos entre a sequência de miosina de coelho e a de galinha é superior a 90% com uma semelhança de 94,8% e apenas 0,5% de “gaps”, pelo que a estrutura de galinha constitui um excelente modelo de previsão da estrutura de miosina de coelho. No que se refere à sequência de *D. Discoideum*, embora esta partilhe uma identidade de apenas 43,3% com a sequência de coelho, a percentagem de semelhança dos resíduos é superior a 60% traduzindo-se em estruturas 3D consideravelmente semelhantes. Para além disso, existe uma conservação de 100% dos aminoácidos que constituem os domínios envolvidos na ligação de fosfatos no local activo, nomeadamente o “P-loop” (181-187), “Switch-I” (127, 241, 243-246) e “Switch-II” (464-469) (a numeração corresponde aos resíduos da sequência de coelho).

Dada a clara homologia entre a sequência da proteína alvo e a sequência da miosina de galinha de estrutura conhecida construiu-se então um modelo da estrutura de miosina de coelho por modulação comparativa usando o programa Modeller, tal como se descreve na secção de Materiais e Métodos. Por outro lado, no sentido de examinar a interacção de decavanadato com a miosina em diferentes estados conformacionais, foram seleccionadas três estruturas de miosina de *D. discoideum* que melhor representassem pontos distintos do ciclo de hidrólise de ATP nomeadamente o S1Dc na forma apo (código de acesso: 1FMV), na presença de MgATP (código de acesso: 1FMW) e MgADP·V_i (código de acesso: 1VOM) [Smith e Rayment, 1996; Bauer *et al.*, 2000]. Mais uma vez foi usado o programa Modeller de forma a prever a estrutura de alguns “loops” que não se encontravam resolvidos nestas estruturas.

MYH4-RABIT	MRK D A I M A F G E A A P Y L R K S E K E R I E A Q N K P F D A K S S V F V	40
MY52-DICDI	--M P I H D R T S Y H K L M K G S D L F L T V S D K I Y I W N	38
MY55-CHICK	A S P D A F M A A F G E A A P Y L R K S E K E R I E A Q N K P F D A K S S V F V	40
MYH4-RABIT	A D P K E -- S F V K A T Q S F E G G K V T A K T E A G A I T Y K E D Q V F	78
MY52-DICDI	P D P K E R D S I E C D E M S E T S D S F T K T V D G D D R Q V K H D D A N	78
MY55-CHICK	V H P K E -- S F V K G T I Q S F E G G K V T V K T E G D E T I T Y K E D Q V F	78
MYH4-RABIT	P M N P P K Y D K I E D M A M M T H L H E P A V L Y N L K E X Y A A W M I Y T Y	118
MY52-DICDI	Q R N P K F D G E D M S E S L N H E P A V F I N L R V R Y N Q D I Y T Y	118
MY55-CHICK	S M N P P K Y D K I E D M A M M T H L H E P A V L Y N L K E R Y A A W M I Y T Y	118
MYH4-RABIT	S G L F G V T V N P Y K W L P V Y N A E V V T A Y R G K K R D E A P P H I F S I	158
MY52-DICDI	S G L F L V A W N P F K R P I Y T Q E M V D I E G R R R N E V A P H I F A I	158
MY55-CHICK	S G L F G V T V N P Y K W L P V Y N P E V V I A Y R G K K R D E A P P H I F S I	158
MYH4-RABIT	S D N A Y D F M L T D R E N Q S I L I T G E S G A G K T V N T K R V I Q Y F A T	198
MY52-DICDI	S D V A Y R S M L D D R N Q S L I T G E S G A G K T E N T K R V I Q Y L A S	198
MY55-CHICK	S D N A Y D F M L T D R E N Q S I L I T G E S G A G K T V N T K R V I Q Y F A T	198
MYH4-RABIT	A V G D K K K E E A T S G K M Q G T L E D Q I I S A N P L L E A F A N A K T	238
MY52-DICDI	A G ----- P N P A N G S G V L E D Q I L S A N P L E A F G N A K T	230
MY55-CHICK	A A G F K K K E E Q S - G K M Q G T L E D Q I I S A N P L L E A F G N A K T	237
MYH4-RABIT	V R N D N S S R F G K F I R I H F G I F G K L A S A D I E T Y L L E K S R V T F	278
MY52-DICDI	T R N N N S S R F G K F I E D F N N A P F S G A S G S Y L L E K S R V V T	270
MY55-CHICK	V R N D N S S R F G K F I R I H F G A T G K L A S A D I E T Y L L E K S R V T F	277
MYH4-RABIT	Q L A E R S Y H I F Y Q I M S N K K P E L I E M L L I T T N P Y D Y A V S Q	318
MY52-DICDI	Q S I T E R N Y H I F Y Q L L A G A T A E E K A L H A G P E S F N L N Q S	310
MY55-CHICK	Q L P A E R S Y H I F Y Q I M S N K K P E L I E M L L I T T N P Y D Y A V S Q	317
MYH4-RABIT	G E I T V P S I D D Q E E L M A T D S A I D I L G F I N D E R S I Y K L T G A	358
MY52-DICDI	G Y D K G S D S E E F K I T R Q A H D I G F S D E Q M S I F K I L A G	350
MY55-CHICK	G E I T V P S I D D Q E E L M A T D S A I D I L G F S D E R I Y K L T G A	357
MYH4-RABIT	V M H Y G N L K F K Q K Q R E E Q A E P D G T E V A D K A A Y L S L N S K L L	398
MY52-DICDI	L H L D N I K F E S A G - E G A V L K D K T A L A A S C I F D N P V L	389
MY55-CHICK	V M H Y G N L K F K Q K Q R E E Q A E P D G T E V A D K A A Y L M G L N S A E L	397
MYH4-RABIT	L K A L C Y P R V K V G N E V T K G Q T V Q V I N V G A L A K A V Y E K M	438
MY52-DICDI	E K A L M E F R L A G R I L V A H L N V E S S S R D A L V K A L Y D I	429
MY55-CHICK	L K A L C Y P R V K V G N E F V T K G Q T V S D V H N S Y G A L A K A V Y E K M	437
MYH4-RABIT	F L W M V T R I N D Q L D T K Q P R D Y F I G V L D I A G F E I F D F N S L E Q	478
MY52-DICDI	F L W L V K I N N V L C D R E A Y F I G V L D I S G F E I F K V N S F E Q	468
MY55-CHICK	F L W M V R I N D Q L D T K Q P R D Y F I G V L D I A G F E I F D F N S S F E Q	477
MYH4-RABIT	L C I N F T N E K L Q Q F F N H H M F V L E Q E E Y K K E G I E W E F I D F G M	518
MY52-DICDI	L C I N T N E K L Q Q F F N H H M F K L E Q E E Y Q K E K N W F I D F G I	508
MY55-CHICK	L C I N F T N E K L Q Q F F N H H M F V L E Q E E Y K K E G I E W E F I D F G M	517
MYH4-RABIT	D L A A C I E L I E K -- P M G I F S I L E E E D M F P K A T D T S F K N K L Y	556
MY52-DICDI	D S Q A T Q L I D G R Q P P G I L L L E Q S F P N A T D N L I T K L F	548
MY55-CHICK	D L A A C I E L I E K -- P M G I F S I L E E E D M F P K A T D T S F K N K L Y	555

Continua na página seguinte...

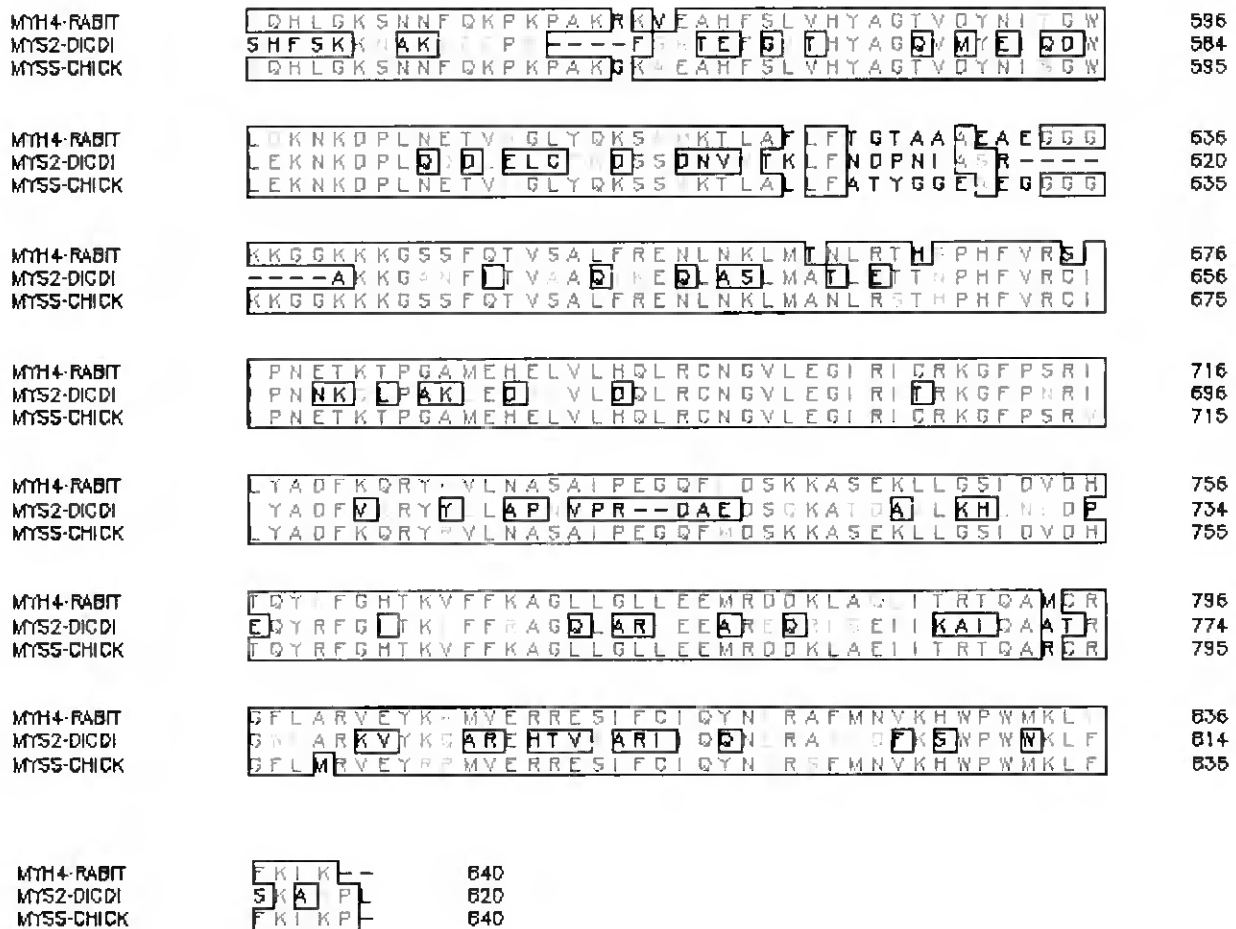


Figura VII.1 – Alinhamento múltiplo das seqüências do subfragmento-1 de miosina do tipo II de, de músculo esquelético de coelho (MYH4-RABIT), de *Dictyostelium discoideum* (MYS2-DICDI) e de músculo esquelético de galinha (MYSS-CHICK). O alinhamento foi realizado com o programa ClustalW como se descreve na secção de Materiais e Métodos. Os números referem-se aos últimos resíduos em cada linha. Os resíduos assinalados a vermelho, verde e preto correspondem a resíduos alinhados idênticos, semelhantes e diferentes, respectivamente.

Tabela VII.1 – Identidade, semelhança e “gaps” para os pares de seqüências de miosina do tipo II de músculo esquelético de coelho (MYH4-RABIT), de *Dictyostelium discoideum* (MYS2-DICDI) e de músculo esquelético de galinha (MYSS-CHICK) determinados por alinhamento global usando o programa Needle como se descreve na secção de Materiais e Métodos.

Pares de seqüências alinhadas	Identidade (%)	Semelhança (%)	Gaps (%)
MYH4-RABIT / MYS2-DICDI	43,3	61,3	9,4
MYH4-RABIT / MYSS-CHICK	90,5	94,8	0,5
MYS2-DICDI / MYSS-CHICK	44,6	62,4	8,8

VII.3.2 – “Docking” molecular de decavanadato no modelo de miosina de músculo esquelético de coelho

O “docking” da molécula de decavanadato foi simulado no modelo da estrutura de miosina de coelho criado a partir da estrutura de miosina de galinha, tal como anteriormente referido. Uma vez que a estrutura de galinha tem uma resolução relativamente pobre (2,8 Å) [Rayment *et al.*, 1993a], o “docking” realizado neste modelo dará uma aproximação dos potenciais locais de ligação de decavanadato à miosina e servirá como ponto de partida para os estudos de “docking” na estrutura de S1 de *D. discoideum* que foi determinada com uma melhor resolução.

O estudo foi iniciado utilizando a molécula inteira de subfragmento-1 de miosina. Para isso, a região do “docking” consistiu num cubo com 100,8 Å de lado e com um espaçamento entre os nós da grelha de 0,8 Å. Num total de 200 trajectórias simuladas (corridas), as 89 de menor energia, solucionaram uma localização do decavanadato no “loop-2” (resíduos 627-642) ou próximo deste “loop”. Na Figura VII.2, mostra-se a solução de menor energia obtida pelo docking para o complexo, onde é possível observar a molécula de decavanadato perfeitamente ajustada à cavidade formada pelo “loop”. Esta sequência rica em glicinas e lisinas forma, tal como foi anteriormente mencionado, uma das áreas de contacto entre a miosina e a actina [Rayment *et al.*, 1993b].

De maneira a melhorar o detalhe molecular do “docking”, a simulação seguinte foi efectuada numa caixa de tamanho mais reduzido (37,8 Å) possibilitando a utilização de uma grelha mais fina (0,3 Å de espaçamento entre os nós da grelha). Centrando a zona de “docking” no sítio catalítico foram obtidas, em 115 corridas de um total de 200, localizações do decavanadato situadas na entrada do local activo (Figura VII.3). Devido ao seu tamanho, a molécula de decavanadato não chega a penetrar no interior do local activo, formando uma interacção electrostática com o resíduo Arg-191 que parece ser importante na estabilização do íão na posição indicada.

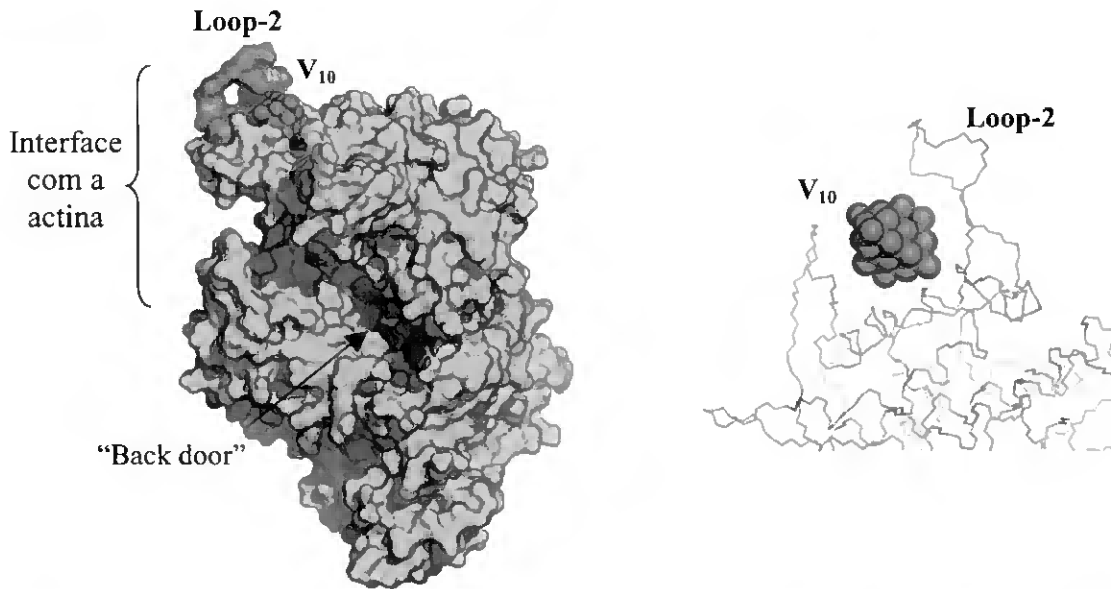


Figura VII.2 – Estrutura do complexo resultante do “docking” de decavanadato na molécula de subfragmento-1 de miosina de coelho. O “docking” foi realizado como se descreve na secção de Materiais e Métodos, utilizando um cubo de 100,8 Å de lado. À esquerda temos uma vista da superfície molecular da molécula de S1 e à direita temos uma vista em “close-up” da cadeia lateral, ambas mostrando o local de ligação do decavanadato (V_{10}) próximo do “loop-2” colorido a laranja.

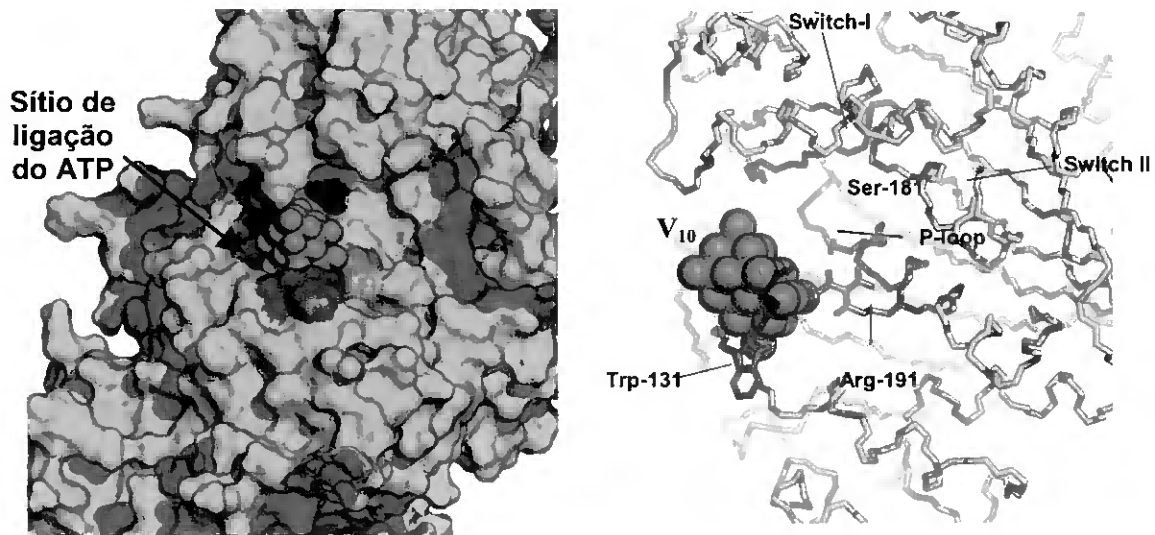


Figura VII.3 – Estrutura do complexo resultante do “docking” de decavanadato na molécula de subfragmento-1 de miosina de coelho. O “docking” foi realizada como se descreve na secção de Materiais e Métodos. A zona de “docking” foi um cubo de 37,8 Å de lado, centrado no local activo. À esquerda temos uma vista da superfície molecular da molécula de S1 e à direita temos uma vista em “close-up” da cadeia lateral, ambas mostrando o local de ligação do decavanadato (V_{10}) na entrada do local activo. Os resíduos Ser-181, Trp-131 e a Arg-191 estão coloridos a amarelo, azul e laranja, respectivamente. Os domínios “Pi-loop”, “Switch-I” e “Switch-II” estão representados a vermelho, violeta e azul claro, respectivamente.

Ainda nesta última simulação, foi encontrado um segundo conjunto de soluções indicando um local alternativo para a formação do complexo decavanadato-miosina. Este local situa-se na designada “back door”, isto é, na abertura traseira do “Pi-tube” localizada no ápice da fenda que separa os domínios superior e inferior do segmento de 50 kDa (Figura VII.4). Como se pode observar, esta localização na “back door” permite uma maior aproximação da molécula de decavanadato aos motivos conservados que formam o “Pi-tube” (domínio específico de coordenação dos fosfatos da molécula de ATP), nomeadamente o “P-loop”, “Switch-I” e “Switch-II”, do que a localização à entrada do local de ligação do ATP (Figura VII.3).

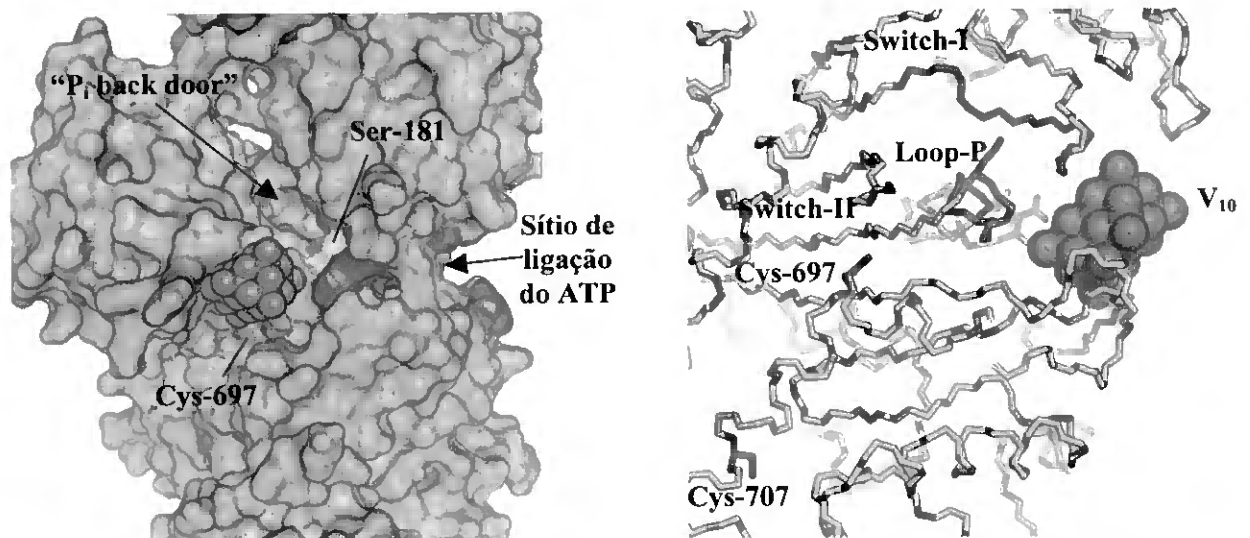


Figura VII.4 – Estrutura do complexo resultante do “docking” de decavanadato na molécula de subfragmento-1 de miosina de coelho. O “docking” foi realizado como se descreve na secção de Materiais e Métodos. A zona de “docking” foi um cubo de 37,8 Å de lado, centrado no local activo. À esquerda temos uma vista da superfície molecular do subfragmento-1 de miosina com indicação da “back door”, do local activo e com os resíduos de Ser-181 e Cys-697 assinalados a amarelo e laranja, respectivamente. À direita temos uma vista em “close-up” da cadeia lateral mostrando o local de ligação do decavanadato (V_{10}) na designada “back door”. As Cys-697 e -707 estão coloridos a vermelho e os motivos “P-loop”, “Switch-I” e “Switch-II” estão representados a vermelho, violeta e azul claro, respectivamente.

Uma análise do potencial electrostático de superfície do subfragmento-1 de miosina mostra, como seria de prever, a ligação preferencial do decavanadato para os locais especialmente catiónicos (Figura VII.5). A porção rica em lisinas e glicinas do “loop-2”, o caracter catiónico do local activo específico para ligação da molécula de ATP, e os domínios específicos de ligação dos fosfatos na imediação da “back door”, fornecem provavelmente interacções electrostáticas favoráveis para uma aproximação desta espécie polianiónica ($V_{10}O_{28}^{6-}$) à proteína.

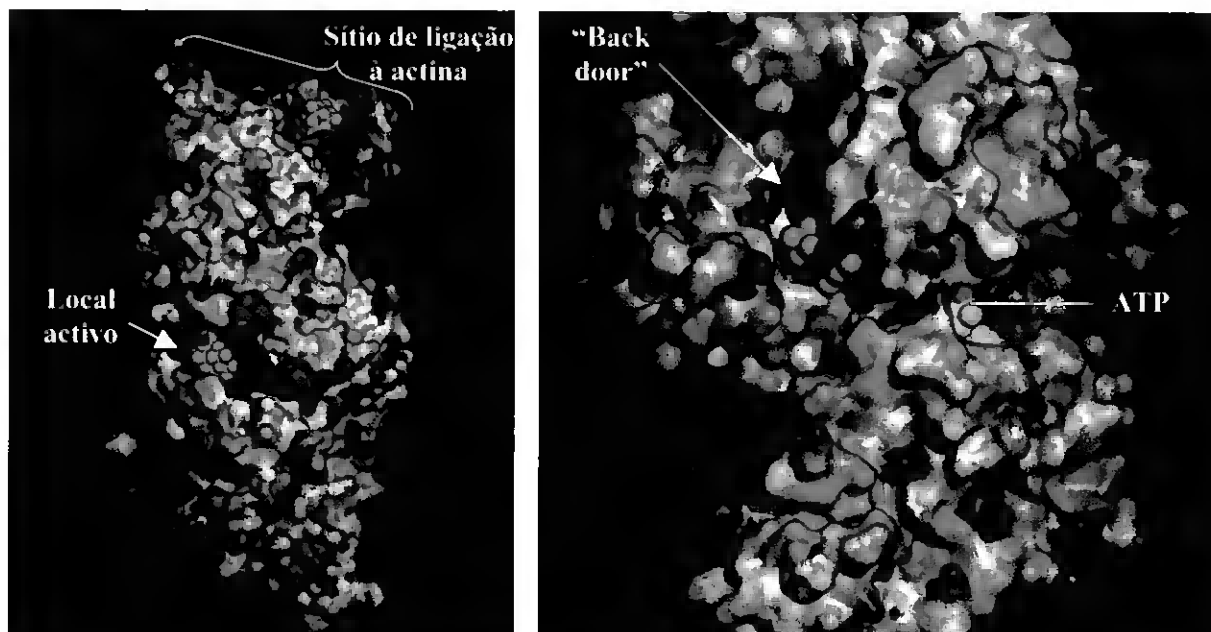


Figura VII.5 – Mapa do potencial electrostático de superfície do subfragmento-1 de miosina com a molécula de decavanadato ligada nas três posições indicadas pelo “docking”, isto é, “loop-2” que faz parte da interface miosina-actina, local activo e “back door”, que se encontram assinalados. A molécula de ATP colorida a verde foi colocada para indicar o local activo. O potencial de superfície positivo, neutro e negativo é representado pelas cores vermelha, branca e azul, respectivamente.

É curioso notar ainda que, para as três soluções obtidas pelo “docking”, e tal como previsto por Jones e Thornton [1997] para a ligação de moléculas pequenas a proteínas, a molécula de decavanadato, com uma geometria elipsoidal, tende a ligar-se a cavidades ajustando-se perfeitamente e onde é provavelmente estabilizada por resíduos envolventes.

VII.3.3 – “Docking” molecular de decavanadato no subfragmento-1 de miosina de *Dictyostelium discoideum*

Após uma análise prévia dos possíveis locais de ligação da molécula de decavanadato no modelo de miosina de músculo esquelético de coelho procedeu-se então a um estudo mais detalhado da interacção de V_{10} com miosina em diferentes estados conformacionais que ocorrem durante o ciclo de hidrólise de ATP. As estruturas seleccionadas para o presente estudo foram, como já mencionado, a cabeça truncada de miosina do tipo II de *Dictyostelium discoideum* (S1Dc) na forma apo, e na presença de MgATP ou de MgADP· V_i [Smith e Rayment, 1996; Bauer *et al.*, 2000]. A estrutura de S1Dc na forma apo é muito semelhante às estruturas obtidas por co-cristalização da proteína na presença de análogos de ATP não hidrolizáveis, nomeadamente na presença de ADP·BeF_x, e representa o estado inicial de pré-hidrólise após libertação da actina [Bauer *et al.*, 2000]. Foi também sugerido que esta estrutura se assemelha muito à de subfragmento-1 de miosina de músculo esquelético de galinha [Rayment *et al.*, 1993a] o que veio refutar a ideia previamente estabelecida de que a conformação obtida para a miosina de galinha pertenceria ao estado de rigor. A estrutura de S1Dc na presença de MgATP parece sofrer muito poucas alterações conformacionais relativamente à forma apo, o que está de acordo com a alta afinidade da miosina para o ATP [Bauer *et al.*, 2000]. Já no que diz respeito à estrutura de S1Dc na presença de MgADP· V_i , as alterações conformacionais parecem ser bem mais pronunciadas sendo representativa da conformação da miosina no estado meta-estável, isto é, no estado intermediário de transição da hidrólise de ATP ou no estado que antecede o designado “powerstroke”.

No sentido de esclarecer a forma de ligação do decavanadato em redor do local activo, mais especificamente a sua interacção com os domínios que formam o designado “Pi-tube” e de modo a obter um maior detalhe molecular, a zona de “docking” do

decavanadato nas diferentes formas de S1Dc, foi delimitada, mais uma vez, a um cubo centrado no local activo e com 36 Å de lado, conforme se ilustra na Figura VII.6.

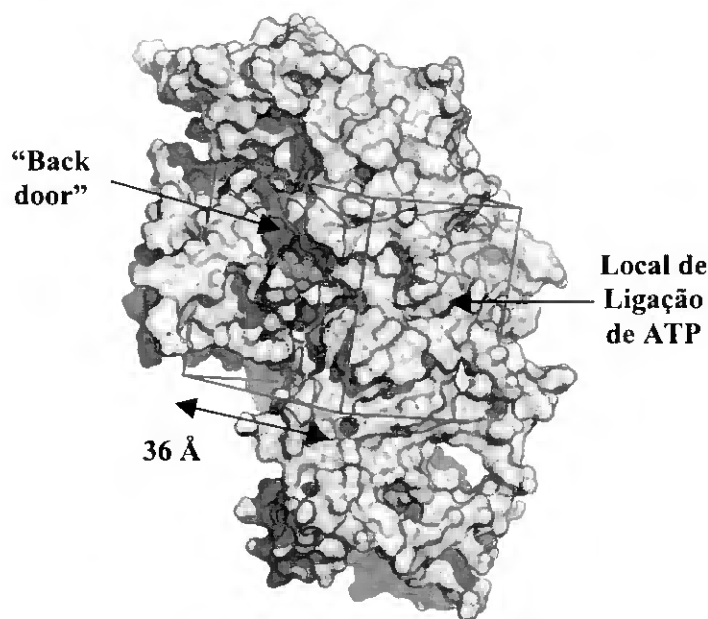


Figura VII.6 – Figura ilustrativa da região seleccionada para o “docking” da molécula de decavanadato (vermelho) no subfragmento-1 de miosina (castanho) de *D. discoideum*. O cubo representado a verde tem 36 Å de lado e está centrado no local activo.

Contrariamente ao que fora obtido com o modelo de miosina de coelho, o “docking” da molécula de decavanadato no subfragmento-1 de miosina de *D. discoideum* revela agora, como local preferencial de ligação, a “porta traseira” de saída do fosfato, quer na ausência (forma apo), quer na presença de ATP (Figura VII.7). Num total de 128 corridas, foram encontradas 79 e 62 soluções (as de energia mais baixa) localizadas na “back-door” da molécula de S1Dc, para a forma apo e complexada com MgATP, respectivamente. Estas soluções foram agrupadas em conjuntos (“clusters”) dentro dos quais o desvio quadrático médio (“Root Mean Square deviation”, RMS), comumente usado como forma de medir o grau de semelhança entre duas estruturas moleculares, é igual ou inferior a 1,0 Å. Pela análise dos valores relativos de energia livre de ligação estimados para cada “cluster”, pode-se inferir que o decavanadato tem uma maior afinidade com a proteína na ausência de nucleótido (Tabela VII.2). Esta diferença pode ser

justificada pela repulsão electrostática entre o fosfato- γ da molécula de ATP e o decavanadato, já que as estruturas não diferem muito entre si, nomeadamente no que diz respeito à “back-door” que se encontra num estado aberto para ambas as formas.

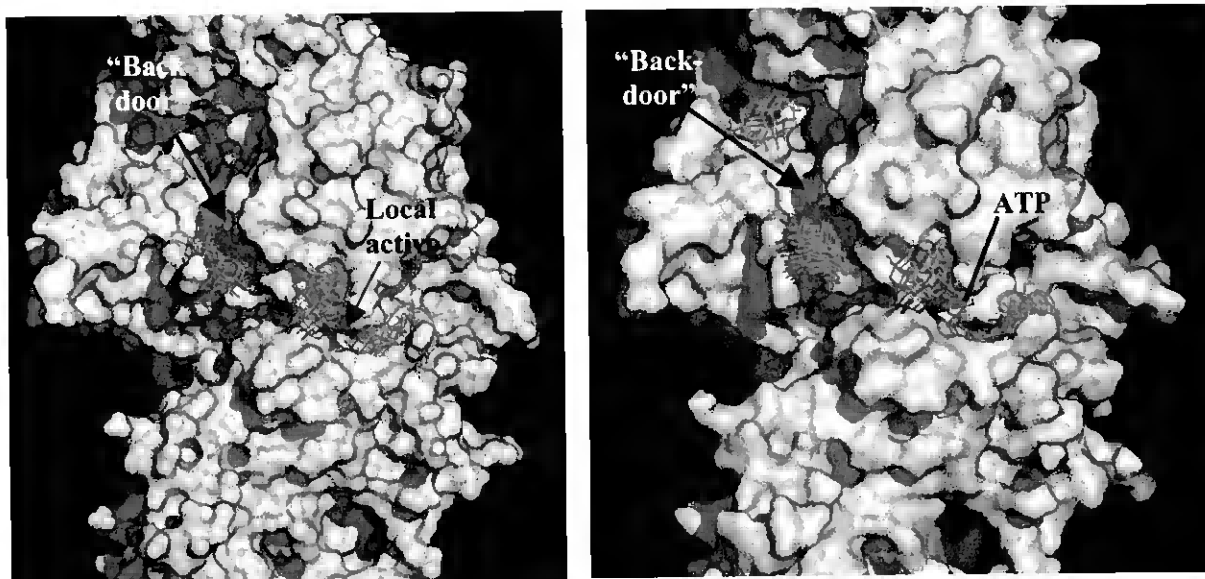


Figura VII.7 – Mapa das diferentes soluções encontradas para o “docking” de decavanadato no S1 de miosina de *D. discoideum* na forma apo (esquerda) e complexada com MgATP (direita).

Tabela VII.2 – Número de soluções e respectivas energias de ligação para cada “cluster” correspondente à ligação na “back-door” obtido pelo “docking” molecular de decavanadato no subfragmento-1 de miosina de *D. discoideum* na forma apo (ausência de ligando), com MgATP e com MgADP·Vi.

S1Dc (código PDB)	Nº soluções / “cluster”	Energia mais baixa (Kcal/mol)	Média das energias (Kcal/mol)
Apo (1FMV)	48	-3,20	-2,53
	22	-2,91	-2,34
	4	-2,51	-2,28
	5	-2,48	-2,20
MgATP (1FMW)	38	-2,02	1,51
	10	-2,01	-1,37
	12	-1,81	-1,38
	2	-1,69	-1,62

Nota: O “cluster” corresponde ao conjunto de soluções para o mesmo local cujo RMS é inferior a 1,0 Å. O RMS para duas moléculas A e B é calculado pela equação:

$$\text{RMS} = \sqrt{\sum_i^n (D_i)^2 / N} \quad [\text{VII.1}]$$

onde D_i corresponde à distância entre os átomos i das moléculas A e B, e N ao nº total de átomos.

Uma análise mais pormenorizada do complexo resultante do “docking” de decavanadato na molécula de S1Dc na ausência de nucleótido (Figura VII.8, esquerda), permite perceber que a molécula de decavanadato se encontra contígua à Ser-181 (assinalada a verde), um resíduo que se demonstrou anteriormente ser fotoclivado na presença de decavanadato. Por outro lado, o mesmo tipo de análise na molécula de S1Dc complexada com MgATP (Figura VII.8 – direita), mostra um ligeiro afastamento do decavanadato relativamente a este resíduo. Esta alteração de posição poderá justificar assim, a inibição parcial de fotoclivagem de miosina que se verificou na presença de nucleótido (ver secção VI.3.1 do Capítulo VI).

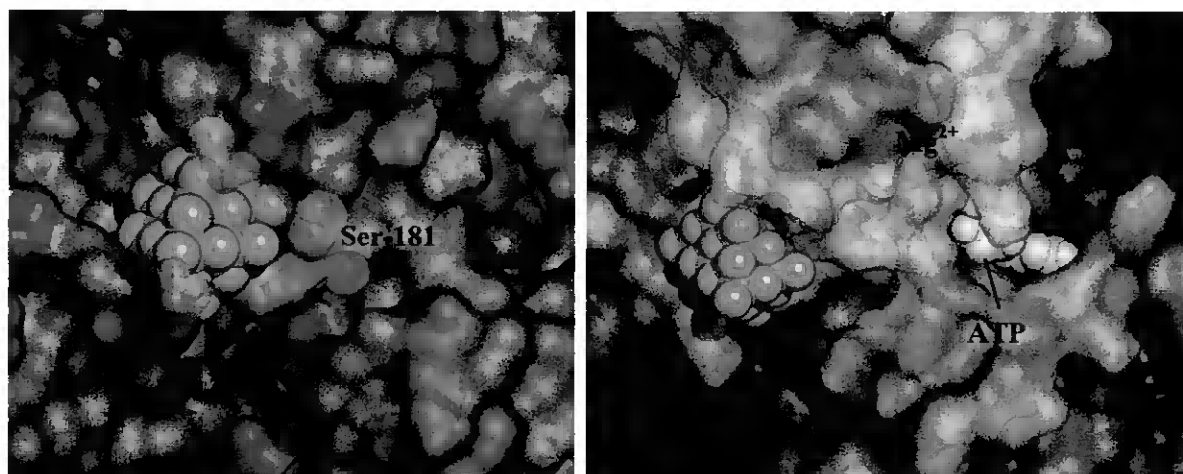


Figura VII.8 – Estruturas resultantes do “docking” de decavanadato no subfragmento-1 de miosina de *D. discoideum* na forma apo (esquerda) e complexada com MgATP (direita). Mostra-se a superfície molecular do S1Dc na região da “back-door” com o resíduo de Ser-181 assinalado a verde, e a molécula de ATP e Mg^{2+} assinalados a amarelo e roxo, respectivamente.

No que diz respeito à simulação com S1 de *D. discoideum* complexado com MgADP·Vi, os resultados do “docking” indicam nitidamente que a molécula de decavanadato deixa de ter qualquer afinidade para a “back door”, passando a ter como local preferencial a entrada do local activo como se mostra na Figura VII.9. Foram encontradas 79 soluções (de energia mais baixa) num total de 128, correspondentes aos 19 primeiros “clusters” com localização próxima da entrada do nucleótido. Na Tabela VII.3, é

possível visualizar os valores relativos de energia livre de ligação estimados para os primeiros quatro “clusters”. Este resultado não será surpreendente na medida em que esta estrutura é representativa do estado intermediário de transição da hidrólise de ATP em que a “back-door” se encontra num estado fechado. Como consequência, o ião decavanadato deixa de ter acesso aos domínios de ligação do fosfato, nomeadamente o P-loop (onde se localiza a Ser-181) que provavelmente o estabilizavam neste local. Esta observação pode explicar assim, o aumento de 2 a 3 vezes, da constante de dissociação verificada na presença de ADP·Vi ou de ADP·AlF₄ nos estudos de titulação de fluorescência com V₁₀.

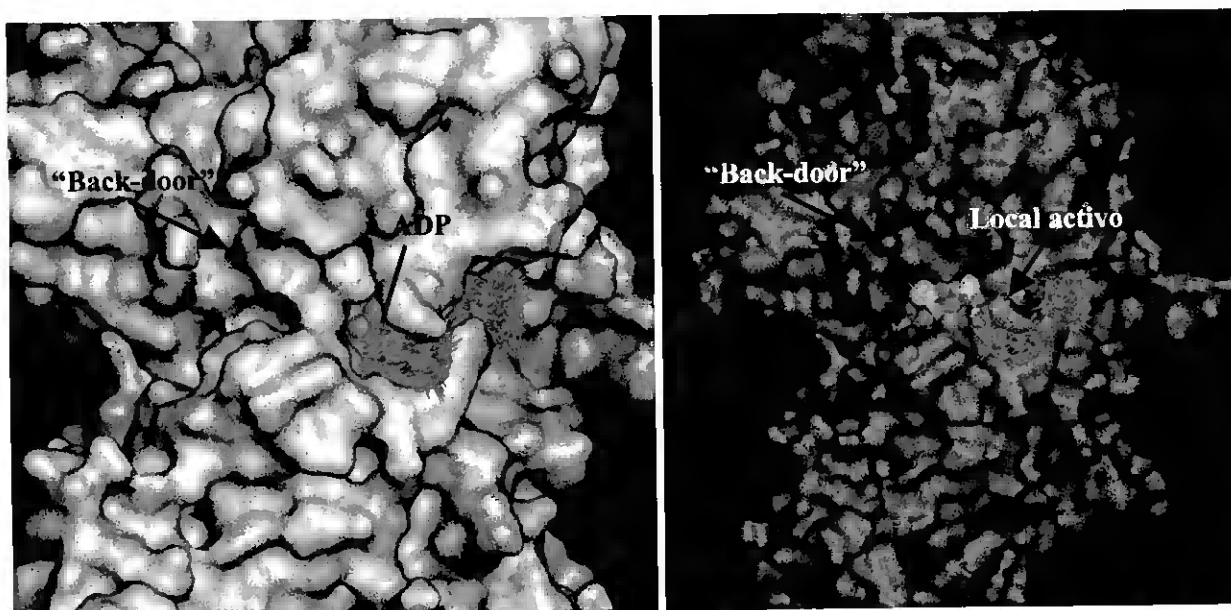


Figura VII.8 – Mapa das soluções encontradas para o “docking” de decavanadato no S1 de *D. discoideum* complexada com MgADP·Vi. À esquerda mostra-se a superfície molecular do S1Dc com o V₁₀ assinalado a vermelho e o ADP a laranja. À direita mostra-se adicionalmente o resíduo de Ser-181, o Mg²⁺ e o Vi assinalados a verde, azul e rosa, respectivamente.

Tabela VII.3 – Número de soluções e respectivas energias de ligação para os quatro primeiros “clusters” correspondentes à ligação na entrada do local activo obtido pelo “docking” molecular de decavanadato no subfragmento-1 de miosina de *D. discoideum* complexado com MgADP·Vi.

S1Dc (código PDB)	Nº soluções / “cluster”	Energia mais baixa (Kcal/mol)	Média das energias (Kcal/mol)
MgADP·Vi (1VOM)	14	-1,95	-1,57
	17	-1,92	-1,60
	5	-1,86	-1,65
	13	-1,78	-1,45

VII.3.4 – Modelo estrutural para a interação de decavanadato com miosina na “back door”: estudos experimentais *versus* estudos teóricos

Um dos locais previstos pelos estudos de modelação molecular para a ligação de decavanadato ao subfragmento-1 de miosina, situa-se numa área de contacto da miosina com a actina. Este local coincide com o “Loop-2” (resíduos 627-646), um domínio que foi demonstrado ser fotoclivado na presença de decavanadato. Apesar de haver indicações da possibilidade de ligação do V_{10} a este local, é muito improvável que o sítio de ligação de alta afinidade que se pretende monitorizar, isto é, o responsável pela inibição da actividade ATPásica da miosina estimulada por actina, seja localizado nesta região na medida em que os estudos experimentais demonstraram que: (i) a inibição pelo V_{10} da actividade ATPásica da miosina estimulada por actina é não competitiva relativamente à actina; (ii) a ligação de V_{10} ao subfragmento-1 de miosina não é afectada pela actina; e (iii) a ligação de V_{10} não dissocia o complexo actomiosina.

Um local alternativo indicado pelos estudos de modelação molecular para a formação do complexo com o V_{10} é situado à entrada do local activo da miosina. Embora se trate de um local com um forte carácter catiónico próprio para a ligação de moléculas aniónicas é, mais uma vez, uma possibilidade que está em desconformidade com os resultados experimentais, especificamente: (i) a inibição por V_{10} da actividade ATPásica da miosina estimulada por actina é não competitiva em relação ao ATP; (ii) a ligação de V_{10} ao subfragmento-1 de miosina não é significativamente afectada pelo ATP; (iii) a ligação de V_{10} não perturba a ligação do ATP ao local activo.

Finalmente, através dos estudos de modelação molecular foi encontrado um terceiro local de ligação do V_{10} situado na “back door”, um domínio funcional da proteína que não compete para os locais de ligação da actina e do ATP. Assim, esta possibilidade de ligação é, sem dúvida, a que melhor exprime os resultados experimentais até então obtidos, resumidamente: (i) a inibição não competitiva em relação ao ATP e à actina da actividade

ATPásica da miosina estimulada por actina; (ii) a elevada supressão de fluorescência da sonda IAEDANS ligada à Cys-697 localizada perto da “back door” (ver figura VII.4); (iii) a competição de V_{10} para o mesmo local de ligação de AP_5A , uma molécula que foi sugerido ligar-se à miosina desde o local de ligação do nucleótido passando pelo domínio de ligação dos fosfatos até à fenda que conduz à “back door”; e (iv) a fotoclivagem pelo decavanadato da miosina na Ser-181 localizado na sequência 178-185 que forma o “Pi-loop”. Este motivo, também designado de “Walker A”, é comum a muitas proteínas que ligam nucleótidos, nomeadamente as ABC ATPases [Walker *et al.*, 1982], e foi demonstrado recentemente ser um local de alta afinidade para o V_{10} [Pezza *et al.*, 2002]. A questão permanecia contudo, na forma como o V_{10} acederia ao “Pi-loop”, já que através do local de ligação do nucleótido, como se pode observar na Figura VII.3, a molécula de decavanadato com aproximadamente 10 Å de diâmetro muito dificilmente conseguiria penetrar no interior do sítio catalítico permitindo-lhe aceder ao “Pi-loop”. Surpreendentemente, constatou-se que através da “back door” a molécula de decavanadato facilmente contacta com o “Pi-loop” e mais especificamente com o resíduo de Ser-181.

VII.3.5 – Importância da “back door” no mecanismo de transdução de energia pelo complexo actomiosina

O mecanismo mais comum de libertação dos produtos nas enzimas é a saída dos mesmos do sítio catalítico por via da entrada original do substrato. Contudo, as estruturas de raios-X da miosina sugerem a existência de uma entrada/saída secundária a qual se denominou de “back door” [Yount *et al.*, 1995]. A evidência de que o fosfato inorgânico (Pi) proveniente da hidrólise de ATP poderia deixar o local activo através desta via alternativa é resultante da combinação de estudos cinéticos e de modelação molecular. Por um lado, estudos bioquímicos sugeriram que o Pi podia entrar e sair do local activo enquanto o ADP permanecia ligado [Webb *et al.*, 1978; Wells e Yount, 1979; Sleep e Hutton, 1980]. Por

outro, a modelação de nucleótidos ou análogos na zona do local activo em estruturas cristalográficas de raios-X de miosina indicavam como muito improvável a saída do Pi através da porta de entrada do nucleótido sem a prévia dissociação do ADP. Isto porque em todas as estruturas de raios-X de miosina, o designado “Pi-tube” circunda os fosfatos $-\alpha$ e $-\beta$ com numerosas interacções com a cadeia lateral. Assim, haveria fortes constrangimentos estéricos à passagem do Pi pela porta da frente na presença de ADP.

Por modelação molecular do ATP na estrutura cristalográfica de S1 de galinha, Yount *et al.* [1995] sugeriram uma ligação vectorial do ATP em que a adenosina se projecta para fora da proteína por via da porta da frente enquanto que a porção dos três fosfatos se liga fortemente numa estrutura em forma de tubo, o “Pi-tube”. Esta estrutura aponta para o interior da proteína e é formada por três motivos altamente conservados, o “Pi-loop”, o “Switch-I” e o “Switch-II”, encontrados em todos os membros da superfamília das proteínas-G [Smith e Rayment, 1996; Vale, 1996; Kull *et al.*, 1998]. A abertura traseira do “Pi-tube”, a “back door”, localiza-se no ápice da fenda que separa os domínios superior e inferior do segmento de 50 kDa. Deste modo, a “back door” parece ser simultaneamente uma via para o ataque da molécula de água no fosfato- γ durante a hidrólise e uma saída possível do fosfato- γ clivado após hidrólise.

A existência do “Pi-tube” e a sua abertura na fenda do segmento de 50 kDa foi posteriormente confirmada na estrutura cristalográfica de miosina II de *Dictyostelium discoideum* onde a posição do fosfato- γ é claramente visível ao olhar através da larga fenda que separa os domínios inferior e superior do segmento de 50 kDa e que se estende até ao “Pi-tube” (Figura VII.9 - esquerda). Contudo, na estrutura de S1Dc complexada com MgADP·V_i a abertura do “Pi-tube” está bloqueada pelo fecho da fenda de 50 kDa não sendo, por isso, possível observar o fosfato- γ (Figura VII.9 - direita). Com base nestas estruturas foi proposto um novo mecanismo de “back door” para a libertação do fosfato

[Pate *et al.*, 1997]. Inicialmente, a ligação de MgATP ocorre numa conformação da miosina na qual o “Switch-I” retrocedeu e o “Pi-tube” se encontra aberto. Quando determinadas forças colocam os três fosfatos na posição espacial correcta de forma a maximizar a coordenação proteína-metal-ligando o “Switch-I” move-se fechando o “Pi-tube”. A hidrólise prossegue e a quebra de ligações fosfodiéster torna o sistema ADP·Pi extremamente instável devido à repulsão electrostática entre cargas negativas. O Pi agora enclausurado não tem forma de escapar excepto pela “back-door” cuja abertura é induzida pela ligação da miosina ao filamento de actina iniciando-se o próximo passo no ciclo de hidrólise de ATP.

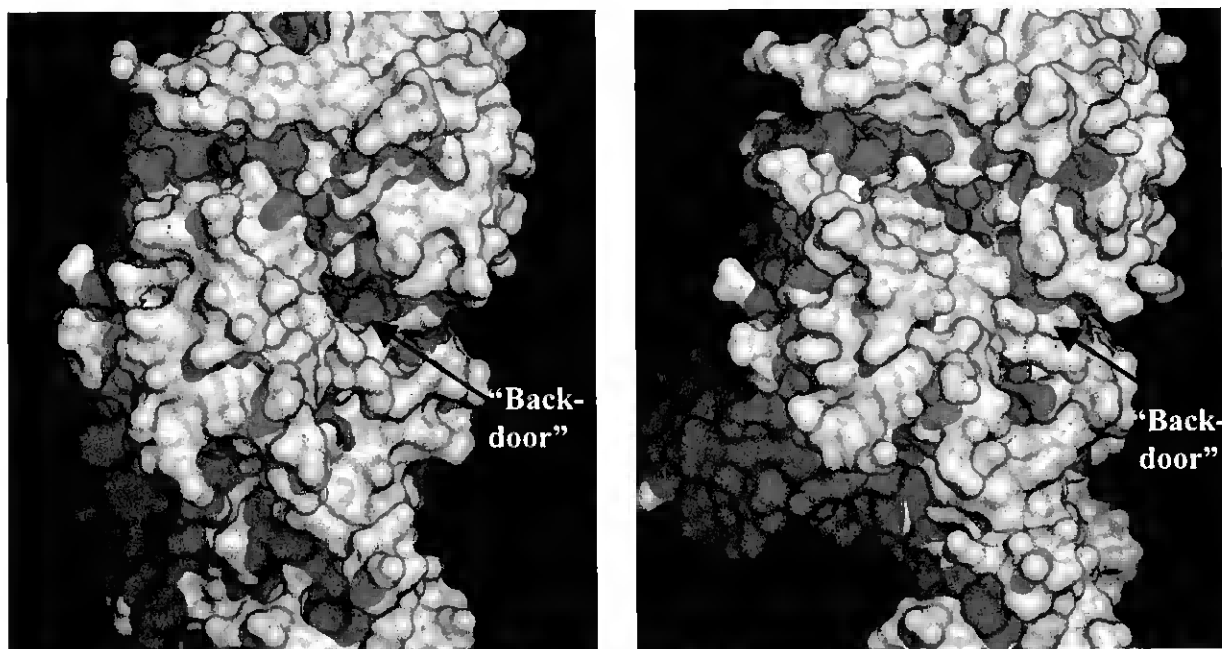


Figura VII.9 – Comparação dos estados relativos da “back-door” na estrutura cristalográfica do subfragmento-1 de miosina de *D. discoideum* complexado com MgATP (esquerda) ou com MgADP·Vi (direita). A posição do fosfato- γ é claramente visível na estrutura de S1Dc·MgATP contrariamente ao que acontece na estrutura de S1Dc·MgADP·V_i em que a abertura do “Pi-tube” está bloqueada pelo fecho da fenda de 50 kDa.

VII.3.6 – Modo de acção do decavanadato via “back door” no mecanismo de transdução de energia pelo complexo actomiosina

O modelo de libertação do fosfato pela “back-door” foi previamente usado por Yount *et al.* [1995] para explicar os “intrigantes” resultados obtidos por Dantzig e Goldman [1985] que demonstraram que o vanadato só forma um complexo estável com o ADP e a miosina, em fibras musculares, se for adicionado com ATP, ou seja, a adição de MgADP com vanadato não tem qualquer efeito no relaxamento das fibras. Assim, foi proposto que na presença de vanadato em “excesso”, este poderia entrar no local activo via “back-door” para formar o complexo estável miosina·MgADP·V_i de forma a relaxar as fibras. Salientaram ainda que desde que estivesse presente vanadato em “excesso”, o complexo miosina·MgADP·V_i seria favorecido ainda que sob a influência “perturbadora” da actina. Trivialmente, estes autores consideraram apenas a espécie monomérica como a espécie inibitória efectiva sem acautelarem a possível contribuição das diversas espécies oligoméricas como se pressupõem ao serem empregues quantidades de vanadato em excesso.

De facto, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a forma mais plausível do vanadato inibir o ciclo de hidrólise de ATP pelo complexo actomiosina será através da ligação à designada “back-door”. Mas, contrariamente ao que foi proposto, esta inibição não passa pela capacidade do vanadato assumir o estado de transição para a hidrólise do fosfato- γ . Parece depender antes do tamanho/carga da espécie oligomérica de vanadato sendo que quanto maior for esta espécie maior será a sua afinidade para este local inibitório, de acordo com os resultados experimentais obtidos.

Visando esclarecer o modo de acção do vanadato através da “back-door” foi simulado o “docking” de decavanadato em três estruturas de miosina representativas de diferentes estados conformacionais do ciclo de hidrólise de ATP. Os resultados de modelação molecular indicam que o decavanadato se liga ao “Pi-tube” via “back-door”, apenas nas estruturas em que esta se encontra num estado aberto, como é o caso da

estrutura de S1Dc na forma apo (ausência de nucleótido) ou na presença de MgATP, ainda que nesta última a afinidade seja ligeiramente inferior provavelmente devido à repulsão electrostática entre o fosfato- γ localizado no ápice do “Pi-tube” e o decavanadato localizado à entrada do mesmo. Quando a abertura do “Pi-tube” está bloqueada pelo fecho da fenda de 50 kDa, o decavanadato perde total afinidade para a “back-door”, como acontece no caso da estrutura de S1Dc na presença de MgADP·Vi. Nesse sentido, a interacção de decavanadato apenas deverá ocorrer num estado intermediário onde já se tenha dado a hidrólise e libertação do Pi. Uma possibilidade seria a ligação do decavanadato no estado intermediário que ocorre antes do “power stroke” (Figura VII.10-D) logo após ligação da actina e libertação do Pi com formação do complexo actomiosina·MgADP·V₁₀. Contudo, os estudos de dispersão de luz (secção V.3.6) indicam, tal como foi verificado anteriormente por Dantzig e Goldman [1985] para o vanadato, que a formação deste complexo não tem qualquer efeito na dissociação da actomiosina. Neste mesmo Capítulo, verificou-se ainda uma correlação entre o aumento do tempo necessário para o processo de re-associação na presença de V₁₀ e a extensão de inibição da actividade ATPásica de S1 por V₁₀, pelo que a ligação desta espécie inibitória deverá ocorrer num estado intermediário em que o complexo se encontre dissociado, e que esta ligação, por sua vez, impeça uma re-associação da miosina com a actina. Sendo assim, o modelo que melhor se ajusta a esta possibilidade é a ligação de decavanadato ao estado intermediário que ocorre antes da hidrólise, com MgATP ligado (Figura VII.10-B). A ligação de V₁₀ neste passo poderia impedir assim o fecho do “Pi-tube”, isto é, a alteração conformacional que promove o ataque nucleofílico de uma molécula de água ao fosfato- γ do ATP, indispensável ao processo de hidrólise (Figura VII.10-C). Este modo de acção explicaria, por um lado, o facto da molécula de decavanadato não dissociar o complexo acto-miosina na ausência de ATP, e por outro, o facto da inibição por decavanadato ser não competitiva relativamente aos ligandos naturais da enzima, isto é, actina e ATP.

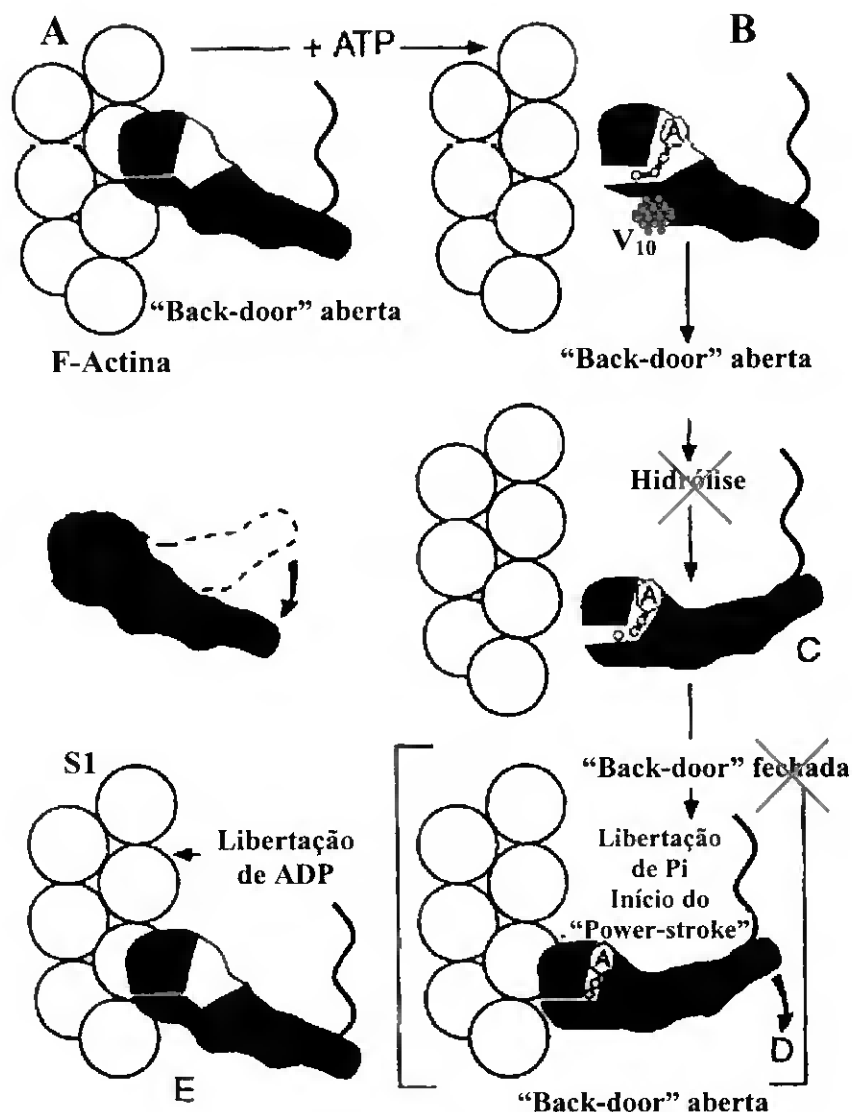


Figura VII.10 – Modelo do ciclo de hidrólise de ATP pelo complexo acto-miosina representando os diferentes estados conformacionais do subfragmento-1 de miosina (S1) e a sua relação com cada passo do ciclo, e o modo de acção do decavanadato (V_{10}) na inibição da hidrólise de ATP pelo complexo actomiosina. A actina é representada sob a forma de esferas. A ligação de ATP ao S1 no estado de rigor (A) promove a abertura da fenda do domínio de 50 kDa rompendo as interações estereoespecíficas entre a miosina e a actina (B). Na ausência de V_{10} , o fecho do local activo em redor da base, mais especificamente do "Pi-tube" em torno dos fosfatos, causa uma flexão da molécula que é mais pronunciada com a hidrólise do nucleótido a ADP·Pi (C). O restabelecimento da ligação à actina promove a abertura da "back-door", localizada no ápice da fenda de 50 kDa, permitindo a saída do fosfato (D) e dando início ao "power stroke" (E) com consequente libertação de ADP. Na presença de V_{10} , o fecho do "Pi-tube" é travado (C) impedindo a formação do estado meta-estável M·ADP·Pi [esquema adaptado de Rayment *et al.*, 1993b].

VII.4 – Referências Bibliográficas

- Bauer, C. B., P. A. Kuhlman, et al. (1997). "X-ray crystal structure and solution fluorescence characterization of Mg₂'(3')-O-(N-methylanthraniloyl) nucleotides bound to the Dictyostelium discoideum myosin motor domain." J Mol Biol **274**(3): 394-407.
- Bauer, C. B., H. M. Holden, et al. (2000). "X-ray structures of the apo and MgATP-bound states of Dictyostelium discoideum myosin motor domain." J Biol Chem **275**(49): 38494-9.
- Bashford, D. and M. Karplus (1990). "Pkas of Ionizable Groups in Proteins - Atomic Detail from a Continuum Electrostatic Model." Biochemistry **29**(44): 10219-10225.
- Chothia, C. (1992). "Proteins - 1000 Families for the Molecular Biologist." Nature **357**(6379): 543-544.
- Dantzig, J. A. and Y. E. Goldman (1985). "Suppression of muscle contraction by vanadate. Mechanical and ligand binding studies on glycerol-extracted rabbit fibers." J Gen Physiol **86**(3): 305-27.
- DeLano, W. L. (2002). "The PyMol molecular graphic system", DeLano Scientific, S. Carlos, California.
- Fisher, A. J., C. A. Smith, et al. (1995). "Structural studies of myosin:nucleotide complexes: a revised model for the molecular basis of muscle contraction." Biophys J **68**(4 Suppl): 19S-26S; discussion 27S-28S.
- Gulick, A. M., C. B. Bauer, et al. (1997). "X-ray structures of the MgADP, MgATP γ S, and MgAMPPNP complexes of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain." Biochemistry **36**(39): 11619-28.
- Gulick, A. M., C. B. Bauer, et al. (2000). "X-ray structures of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain with six non-nucleotide analogs." J Biol Chem **275**(1): 398-408.

- Harding, S. E. and B. Z. Chowdhry (2001). "Protein-Ligand Interactions: structure and spectroscopy." Oxford University Press, pp. 99-121.
- Jones, S. and J. M. Thornton (1997). "Analysis of protein-protein interaction sites using surface patches." Journal of Molecular Biology **272**(1): 121-132.
- Kempf, J. Y., M. M. Rohmer, et al. (1992) "Relative Basicities of the Oxygen Sites in $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ - an Analysis of the Abinitio Determined Distributions of the Electrostatic Potential and of the Laplacian of Charge-Density." Journal of the American Chemical Society **114**(4): 1136-1146
- Kull, F. J., R. D. Vale, et al. (1998). "The case for a common ancestor: kinesin and myosin motor proteins and G proteins." J Muscle Res Cell Motil **19**(8): 877-86.
- Laskowski, R. A., M. W. Macarthur, et al. (1993). "Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures." Journal of Applied Crystallography **26**: 283-291.
- Pate, E., N. Naber, et al. (1997). "Opening of the myosin nucleotide triphosphate binding domain during the ATPase cycle." Biochemistry **36**(40): 12155-66.
- Pezza, R. J., M. A. Villarreal, et al. (2002). "Vanadate inhibits the ATPase activity and DNA binding capability of bacterial MutS. A structural model for the vanadate-MutS interaction at the Walker A motif." Nucleic Acids Res **30**(21): 4700-8.
- Rayment, I., W. R. Rypniewski, et al. (1993a). "Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor." Science **261**(5117): 50-8.
- Rayment, I., H. M. Holden, et al. (1993b). "Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction." Science **261**(5117): 58-65.
- Sali, A. and T. L. Blundell (1993). "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints." J Mol Biol **234**(3): 779-815.

- Sleep, J. A. and R. L. Hutton (1980). "Exchange between inorganic phosphate and adenosine 5'-triphosphate in the medium by actomyosin subfragment 1." Biochemistry **19**(7): 1276-83.
- Smith, C. A. and I. Rayment (1995). "X-ray structure of the magnesium(II)-pyrophosphate complex of the truncated head of Dictyostelium discoideum myosin to 2.7 Å resolution." Biochemistry **34**(28): 8973-81.
- Smith, C. A. and I. Rayment (1996). "X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain to 1.9 Å resolution." Biochemistry **35**(17): 5404-17.
- Vale, R. D. (1996). "Switches, latches, and amplifiers: common themes of G proteins and molecular motors." J Cell Biol **135**(2): 291-302.
- Walker, J. E., M. Saraste, et al. (1982). "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold." Embo J **1**(8): 945-51.
- Webb, M. R., G. G. McDonald, et al. (1978). "Kinetics of oxygen-18 exchange between inorganic phosphate and water catalyzed by myosin subfragment 1, using the 18O shift in 31P NMR." J Biol Chem **253**(9): 2908-11.
- Wells, J. A. and R. G. Yount (1979). "Active site trapping of nucleotides by crosslinking two sulfhydryls in myosin subfragment 1." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(10): 4966-70.
- Yount, R. G., D. Lawson, et al. (1995). "Is myosin a "back door" enzyme?" Biophys J **68**(4 Suppl): 44S-47S; discussion 47S-49S.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSÃO GERAL

VIII.1 – Passados quase trinta anos após a descoberta de vanadato no músculo...

Apesar de terem passado quase trinta anos, após a descoberta de que o inibidor da Na^+ , K^+ -ATPase presente no ATP isolado de músculo esquelético de cavalo, distribuído pela empresa Sigma, era o vanádio no seu estado de oxidação +5 (vanadato) [Josephson e Cantley, 1977], a função deste elemento nas células musculares continua incompreendida. Na verdade, a química excepcionalmente complexa que este metal de transição apresenta em solução, nomeadamente no que diz respeito à possibilidade de ocorrência de reacções redox e de oligomerização, constitui, à partida, um obstáculo para a compreensão do vanádio nos organismos vivos. Desta forma, é de particular importância caracterizar a química deste metal antes de se tentar compreender a sua interacção com o sistema em estudo.

Uma análise por espectroscopia de ^{51}V -RMN e de UV-visível de soluções de vanadato diluídas nos meios de reacção enzimáticos usados no presente estudo mostrou claramente que, contrariamente às espécies orto e metaméricas (V_1 , V_2 , V_4 e V_5) que se interconvertem muito rapidamente, a espécie decamérica (V_{10}) nas condições experimentais seleccionadas (25 mM KCl, 25 mM Hepes, pH 7,0) possui um tempo de vida suficientemente longo para que se possa determinar o seu efeito no sistema em estudo. Por outro lado, esta análise mostrou ainda que após diluição das soluções de decavanadato no meio de reacção coexistem as espécies monomérica e decamérica de vanadato, pelo que

os efeitos putativos da primeira deverão ser deduzidos, sempre que se pretenda monitorizar os efeitos da segunda.

No músculo esquelético, o vanádio inibe as enzimas que catalizam reacções de fosfo-transferência, nomeadamente a ATPase da miosina [Goodno, 1979], facto atribuído a uma analogia estrutural com o fosfato. Por vezes, nos estudos em que se utiliza o vanádio (V) como inibidor de enzimas, a contribuição das várias espécies oligoméricas não se determina, nem se acautela. Trivialmente, considera-se a espécie monomérica como a espécie inibitória efectiva, como por exemplo, na inibição da actividade ATPásica da actomiosina [Goodno e Taylor, 1982]. No presente estudo, facilmente se constatou por espectroscopia de ^{51}V -RMN que para além da espécie monomérica, outros oligómeros de vanadato interactuam com a miosina, sendo o decâmérico o que se liga com maior afinidade. Esta interacção envolve forças electrostáticas e é modulada pelos ligandos naturais da enzima, isto é, a sua interacção é afectada na presença de nucleótido e favorecida na presença de F-actina. Estudos de cinética enzimática vieram confirmar depois a hipótese inicial de que a inibição da actividade ATPásica da miosina estimulada por actina se deve efectivamente à presença de espécies oligoméricas, nomeadamente à espécie decamérica que actua por um mecanismo de inibição não competitivo relativamente à actina e ao ATP com uma constante de inibição na ordem dos micromolar ($K_i = 0,27 \pm 0,05 \mu\text{M}$).

VIII.2 – Ligação de decavanadato na “back door” da miosina inibe a actividade ATPásica do complexo actomiosina

A espécie decamérica de vanadato é seguramente, de entre as formas de vanádio no estado livre ou complexado, um dos inibidores mais potentes. As enzimas inibidas por decavanadato parecem ter como factor comum a capacidade de ligar grupos fosfato, mas sendo estruturalmente diferente da espécie monomérica, o V_{10} não imita concerteza o ortofosfato na sua interacção com as enzimas. Para além disso, a inibição por decavanadato

não é de forma alguma, uma propriedade geral de todas as enzimas que ligam grupos fosfato, e como tal deverão ser importantes as características estruturais e conformacionais das enzimas. Apesar da evidente importância da interacção da espécie decamérica com diversas enzimas, pouco se sabe acerca do processo molecular de interacção.

O trabalho aqui apresentado constituiu pois, uma oportunidade de se conhecerem melhor os requisitos estruturais básicos para a alta afinidade da espécie decamérica, e eventualmente de outros oligómeros de vanadato, com determinadas proteínas. Colectivamente, os resultados obtidos são consistentes com a ligação da molécula de V_{10} a um motivo altamente conservado entre proteínas da superfamília das ABC (“ATP Binding Cassetes”) ATPases [Walker *et al.*, 1982], correspondente à sequência GESGAGKT (P-loop) na miosina e que forma parte do “Pi-tube”, um domínio específico de coordenação dos fosfatos do nucleótido. Surpreendentemente, a ligação do V_{10} a este motivo parece não se fazer através do local de ligação do nucleótido, como fora anteriormente sugerido para outras ABC ATPases [Pezza *et al.*, 2002], mas por via da designada “back-door”, isto é, a abertura traseira do “Pi-tube” localizada no ápice da fenda que separa os domínios superior e inferior do segmento de 50 kDa, no lado oposto da entrada do local activo na miosina. Este local, não competindo para os sítios de ligação dos ligandos naturais da miosina, isto é, actina e ATP, fundamenta o mecanismo de inibição não competitivo pelo decavanadato observado para a actividade ATPásica da miosina estimulada por actina.

VIII.3 – Contribuição do decavanadato para a elucidação da regulação da contracção muscular

A miosina é uma enzima invulgar na medida em que o passo químico de hidrólise do fosfato ocorre num ponto diferente, no ciclo contráctil, do passo de transdução de energia. Isto acontece porque a miosina forma um estado meta-estável (ADP·Pi) após hidrólise. A

estrutura do complexo miosina·ADP·Vi fornece uma explicação para este estado uma vez que há uma reduzida acessibilidade do solvente ao fosfato- γ causado pelo fecho parcial da fenda que separa os domínios superior e inferior do segmento de 50 kDa. Uma vez que esta alteração conformacional é essencial para a hidrólise, foi sugerido que o fosfato fica aprisionado nesta fenda [Rayment, 1996]. Por um lado, estudos cinéticos indicaram que o fosfato é libertado antes do ADP [Trentham *et al.*, 1976; Goldman, 1987]. Por outro, estudos por modelação molecular demonstram que o fosfato não pode sair pela mesma via de entrada do substrato. De facto, as estruturas cristalográficas de raios-X sugerem que o fosfato poderá sair por uma via alternativa localizada na base do local activo da miosina via “back-door” [Yount *et al.*, 1995]. Estas estruturas implicam que a libertação do fosfato, deverá ser acompanhada de uma segunda alteração conformacional, que foi proposta ocorrer aquando do restabelecimento da ligação da miosina à actina e que será, em última análise, responsável pelo processo de transdução de energia [Fisher *et al.*, 1995].

A hipótese apresentada é substanciada pelo modo de acção do decavanadato via “back door” proposto no presente estudo, que constitui, provavelmente, a primeira evidência experimental da importância da alteração conformacional inicial que ocorre no processo de hidrólise de ATP no mecanismo da contracção muscular. De acordo com o modelo agora proposto, a interacção de decavanadato via “back-door” deverá coincidir com o estado intermediário que ocorre antes do passo de hidrólise. A formação do complexo miosina·MgATP·V₁₀ pode impedir assim a alteração conformacional que induz o fecho do “Pi-tube” e conseqüentemente o ataque nucleofílico da água ao fosfato- γ do ATP, indispensável ao processo de hidrólise, interrompendo desta forma a continuidade do ciclo. Este modelo vem ainda refutar a hipótese previamente apresentada por Yount *et al.* [1995] de que o relaxamento das fibras musculares na presença de “excesso” de vanadato, se deva à formação de um complexo “estável” miosina·MgADP·Vi.

VIII.4 – Perspectivas futuras

Nos últimos anos, a base estrutural do ciclo contráctil tem sido definida num detalhe crescente através da cristalografia de raios-X. Apesar das estruturas cristalinas do subfragmento-1 de miosina terem sido obtidas para diferentes estados conformacionais com diversos nucleótidos ligados, nomeadamente com MgADP·Vi [Smith e Rayment, 1996], a natureza do estado de rigor, ligado à actina, ou de estados que antecedem a hidrólise de ATP, ainda não foram observados directamente. A visualização directa destes estados é evidentemente necessária para determinar a magnitude das alterações conformacionais e factores responsáveis pela actividade enzimática da miosina que conduzem à produção de movimento. Os estudos apresentados na presente dissertação dão indicações de que o decavanadato poderá estar a bloquear o estado intermediário que antecede a hidrólise de ATP, e como tal, a obtenção de uma estrutura cristalina de subfragmento-1 de miosina complexada com decavanadato talvez constitua uma possibilidade de visualização de um destes estados transitórios.

Independentemente da controvérsia relativa à possibilidade de existência de decavanadato em condições fisiológicas, um ponto de interesse desta espécie reside na possibilidade de ser utilizado como sonda de análise em muitos mecanismos enzimáticos visto apresentar importantes características físico-químicas passíveis de serem analisadas por diversos métodos, com a vantagem de ser um oxovanadato menos lábil. Nesse sentido, o estudo da interacção de decavanadato poderia ser futuramente estendido a outras proteínas, nomeadamente a ABC ATPases que se demonstrou terem um domínio comum de alta afinidade para esta espécie molecular. O decavanadato poderia tornar-se assim um novo elemento de classificação funcional de membros desta superfamília. Particularmente interessante, seria o estudo da interacção de decavanadato com alguns transportadores membranares (MDR), membros da superfamília das ABC ATPases, que são responsáveis pela resistência intrínseca ou adquirida das células cancerígenas à quimioterapia. Existem

já algumas evidências de que o vanadato pode sensibilizar estas células cancerígenas multi-resistentes aos efeitos citotóxicos de vários agentes antineoplásicos ao inibirem a actividade ATPásica e consequentemente reduzindo o efluxo de drogas [Evangelou, 2002]. Assim, a compreensão da natureza das interações de proteínas que medeiam as células MDR com decavanadato, um forte inibidor deste tipo de ATPases, poderia ser importante para o desenvolvimento de novas drogas baseadas em complexos de vanadato ou noutros polioxianíões.

VIII.5 – Referências Bibliográficas

- Evangelou, A. M. (2002). "Vanadium in cancer treatment." Crit Rev Oncol Hematol **42**(3): 249-65.
- Fisher, A. J., C. A. Smith, et al. (1995). "Structural studies of myosin:nucleotide complexes: a revised model for the molecular basis of muscle contraction." Biophys J **68**(4 Suppl): 19S-26S; discussion 27S-28S.
- Goldman, Y. E. (1987). "Kinetics of the actomyosin ATPase in muscle fibers." Annu Rev Physiol **49**: 637-54.
- Goodno, C. C. (1979). "Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(6): 2620-4.
- Goodno, C. C. and E. W. Taylor (1982). "Inhibition of actomyosin ATPase by vanadate." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(1): 21-5.
- Josephson, L. and L. C. Cantley, Jr. (1977). "Isolation of a potent (Na-K)ATPase inhibitor from striated muscle." Biochemistry **16**(21): 4572-8.
- Pezza, R. J., M. A. Villarreal, et al. (2002). "Vanadate inhibits the ATPase activity and DNA binding capability of bacterial MutS. A structural model for the vanadate-MutS interaction at the Walker A motif." Nucleic Acids Res **30**(21): 4700-8.
- Rayment, I. (1996). "The structural basis of the myosin ATPase activity." J Biol Chem **271**(27): 15850-3.
- Smith, C. A. and I. Rayment (1996). "X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain to 1.9 Å resolution." Biochemistry **35**(17): 5404-17.
- Trentham, D. R., J. F. Eccleston, et al. (1976). "Kinetic analysis of ATPase mechanisms." Q Rev Biophys **9**(2): 217-81.

- Walker, J. E., M. Saraste, et al. (1982). "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold." Embo J **1**(8): 945-51.
- Yount, R. G., D. Lawson, et al. (1995). "Is myosin a "back door" enzyme?" Biophys J **68**(4 Suppl): 44S-47S; discussion 47S-49S.

