



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CARLA CRISTINA POLO

**“CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DOMÍNIOS
FUNCIONAIS DE MIOSINAS DE *DROSOPHILA
MELANOGASTER*”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Carla Cristina Polo
Mário T. Murakami
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador Prof. Dr. Mário Tyago Murakami

CAMPINAS
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

P766c Polo, Carla Cristina, 1987-
Caracterização molecular de domínios funcionais de miosinas de *Drosophila melanogaster* / Carla Cristina Polo. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Mário Tyago Murakami.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Drosophila melanogaster*. 2. Modelos biológicos. 3. Miosina tipo V. 4. Cauda globular. 5. Miosina tipo XV. 6. Domínio FERM. I. Murakami, Mário Tyago. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Molecular characterization of *Drosophila melanogaster* myosins functional domains

Palavras-chave em Inglês:

Drosophila melanogaster

Biological models

Myosin type V

Globular tail

Myosin type XV

FERM domain

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Mário Tyago Murakami [Orientador]

Adriana Franco Paes Leme

Ana Carolina Migliorini Figueira

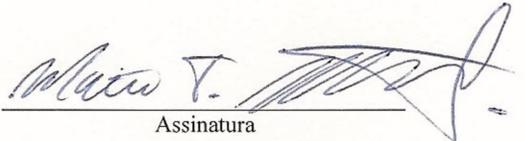
Data da defesa: 18-04-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

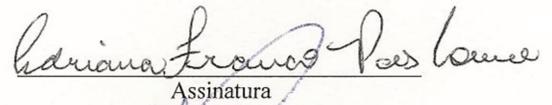
Campinas, 18 de abril de 2012

BANCA EXAMINADORA

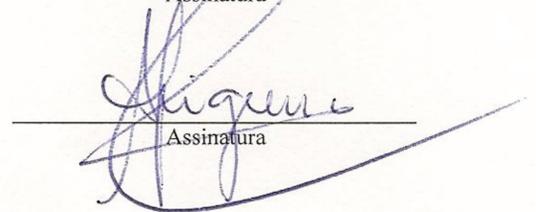
Prof. Dr. Mário Tyago Murakami (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Adriana Franco Paes Leme


Assinatura

Profa. Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira


Assinatura

Prof. Dr. Roberto Ruller

Assinatura

Profa. Dra. Andréa Balan Fernandes

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito ao Dr. Mário Murakami, pela oportunidade e orientação desde a iniciação científica e por me incluir em uma linha de pesquisa desafiadora, recém-começada, como a das miosinas.

Ao Dr. Daniel Trindade, já que tudo que aprendi de biologia molecular eu devo a ele, obrigada pela co-orientação, dedicação, paciência, carinho e acima de tudo a amizade.

Aos meus amigos inseparáveis, tanto de laboratório como da vida, Joice Paiva, Aline Sampaio e Andrey Nascimento; MUITO OBRIGADA pela companhia na alegria, na tristeza e pelos ensinamentos. Os dias no laboratório são muito melhores quando eles estão presentes.

À Dra. Tatiana Brasil, Dra. Camila dos Santos e Dra. Priscila Giuseppe, pesquisadoras do grupo; que de uma maneira ou de outra, estão sempre dispostas a nos ajudar a resolver problemas.

Aos meus amigos do LNBio Cristiane Tambascia, Germana Righetto, Fernanda Basei, Kelven Severiano, Gustavo Mercaldi, Leandro de Assis, Mariana Moraes, Bruna, Renata Rocha, Caroline Bondarik; pelas conversas, conselhos e risadas.

Às técnicas de laboratório; Andréia Navarro, Givanil Garrido, Celisa Tonoli (BBE) e Jackeline Zanella (LPP) por sempre estarem dispostas a ajudar.

Aos membros das bancas examinadoras oficial e suplente, tanto da defesa, como da qualificação; que contribuíram enormemente para a melhora da dissertação e se dispuseram a ler tudo tão atentamente.

À CAPES, CNPq e FAPESP; pelo suporte financeiro para desenvolvimento de todo este trabalho juntamente à pós-graduação da BFM/IB-UNICAMP, especialmente a Andréia Vigilato.

Aos meus pais Pedro e Vilma, pelo amor, dedicação, confiança e apoio a vida inteira e, principalmente agora, me incentivando a continuar.

Ao Daniel Tavares; obrigada pelo amor, carinho, amizade e paciência.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

<i>I- Introdução</i>	1
1. Miosinas não-convencionais	1
2. Miosinas de <i>Drosophila melanogaster</i>	4
3. Miosinas alvo	6
3.1 Classe III	7
3.2 Classe V	9
3.3 Classe XV	13
<i>II- Objetivos</i>	17
1. Objetivos gerais	17
2. Objetivos específicos	17
<i>III- Material e Métodos</i>	19
1. Análise <i>in silico</i> para a seleção de alvos	19
2. Clonagem	20
2.1 Construção de oligonucleotídeos iniciadores	20
2.2 Extração de RNA de <i>Drosophila melanogaster</i>	22
2.3 Síntese da fita complementar de DNA (cDNA)	22
2.4 Amplificação dos fragmentos de gene a partir do cDNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	23
2.5 Clonagem em pGEM T-easy	24
2.6 Clonagem em vetores de expressão pET28a e pET28aSUMO	27
3. Expressão de proteínas recombinantes	29
3.1 Testes de expressão	29
3.2 Expressão em larga escala	33
3.3 Lise celular	33
4. Cromatografia líquida	34
4.1 Afinidade a metal imobilizado (IMAC)	34
4.2 Exclusão molecular (SEC)	34

5. Dosagem das amostras	35
6. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	36
7. Dicroísmo Circular (CD).....	36
7.1 Espectro.....	36
7.2 Desnaturação térmica	37
8. Desnaturação térmica monitorada por fluorescência de sonda extrínseca (DSF) 38	
9. Proteólise limitada	39
9.1 Teste de clivagem.....	39
9.2 Proteólise.....	39
10. Cromatografia analítica de exclusão molecular	39
11. Espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS).....	40
12. Ensaio de Cristalização.....	41
<i>IV- Resultados e Discussão.....</i>	<i>43</i>
1. Análises <i>in silico</i>	43
1.1 Domínio quinase da Miosina III (Isoforma C)	43
1.2 Cauda globular da miosina V (Isoforma C).....	45
1.3 Domínio FERM da miosina XV (Isoforma C)	47
2. Clonagem.....	49
3. Teste de expressão de proteínas recombinantes.....	52
4. FERM-f (Miosina XV).....	54
4.1 Expressão em larga escala e lise celular	54
4.2 Cromatografia líquida de Afinidade a metal (IMAC)	55
4.3 Cromatografia líquida de exclusão molecular (SEC)	56
4.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	57
4.5 Dicroísmo Circular (CD).....	58
5. Cauda globular (Miosina V)	59
5.1 Construção C- terminal da cauda globular (GLOB_2/SUMO)	59
5.2 Cauda globular inteira (GT-f/6xhis).....	63
5.3 Conclusões parciais	85
<i>V- Conclusão</i>	<i>87</i>
<i>VI- Perspectivas.....</i>	<i>89</i>
<i>VII- Referências Bibliográficas.....</i>	<i>91</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Domínios funcionais característicos das miosinas. **2**
- Figura 2.** Classes de miosinas. **3**
- Figura 3.** As diferentes classes de miosinas encontradas em *Drosophila melanogaster*. **4**
- Figura 4.** Principais processos que envolvem a miosina III (174p) em *D. melanogaster*. **8**
- Figura 5.** Alinhamento entre os domínios quinase da miosina III de inseto e humano. **9**
- Figura 6.** Descrição molecular das miosinas de classe V. **11**
- Figura 7.** Alinhamento entre as caudas globulares de inseto (DmGTMyoV), levedura (ScGTMyoVa) e humano (HsGTMyoVa). **12**
- Figura 8.** Domínios MyTH4-FERM-SH3 da miosina VIIa. **15**
- Figura 9.** Alinhamento entre os domínios FERM das miosinas XV humana, camundongo, e de inseto junto ao primeiro domínio FERM da classe VIIa. **16**
- Figura 10.** Localização de cada um dos domínios alvos em relação às miosinas inteiras . **20**
- Figura 11.** Diagrama de fases para a cristalização de proteínas. **42**
- Figura 12.** Análises *in silico* do domínio quinase da miosina III (KIN-f) de *D. melanogaster*. **45**
- Figura 13.** Consenso da predição de ordem/desordem da cauda globular da miosina V de *D. melanogaster*. **46**
- Figura 14.** Construções desenhadas para o domínio cauda globular da miosina V de *D. melanogaster*. **47**
- Figura 15.** Análises *in silico* do domínio FERM (FERM-f) da miosina XV de *D. melanogaster*. **49**
- Figura 16.** Amplicons de pupa e adulto a partir de cDNA total de *D. melanogaster* em gel de agarose a 1%. **50**
- Figura 17.** Confirmação dos clones de cada construção por PCR em gel de agarose a 1%. **51**
- Figura 18.** SDS-PAGE a 13% de testes de expressão positivos. **53**
- Figura 19.** Cromatografia por afinidade a metal do domínio FERM (FERM-f) fusionado a 6xhis. **56**
- Figura 20.** Cromatografia por exclusão molecular do domínio FERM (FERM-f) fusionado a 6xhis. **57**
- Figura 21.** Espectro de dicroísmo circular do domínio FERM (FERM-f) em ultravioleta (UV) visível (195 a 260nm). **59**
- Figura 22.** Cromatografia por afinidade a metal da porção C-terminal da cauda globular (GLOB_2) da fusionada a SUMO. **61**

Figura 23. Cromatografia por exclusão molecular da porção C-terminal da cauda globular (GLOB_2) fusionada a SUMO. **62**

Figura 24. Cromatografia por afinidade a metal da cauda globular inteira (GT-f) fusionada a 6xhis. **65**

Figura 25. Cromatografia por exclusão molecular da cauda globular inteira (GT-f) fusionada a 6xhis. **66**

Figura 26. Espectro de dicroísmo circular para a cauda globular inteira (GT-f) na faixa UV-visível (195 a 260 nm). **68**

Figura 27. Curva de desnaturação térmica da cauda globular inteira (GT-f) monitorada por dicroísmo circular a 222 nm. **69**

Figura 28. Desnaturação térmica da cauda globular inteira (GT-f) monitorada por fluorescência com aditivos. **71**

Figura 29. Desnaturação térmica da cauda globular inteira (GT-f), monitorada por fluorescência em diferentes pHs. **72**

Figura 30. Desnaturação térmica da cauda globular inteira (GT-f) monitorada por fluorescência em diferentes concentrações de cloreto de sódio. **72**

Figura 31. SDS-PAGE 13% da proteólise limitada por tripsina ($10\mu\text{g mL}^{-1}$) da cauda globular inteira (GT-f). **74**

Figura 32. Modelagem molecular da cauda globular inteira (GT-f) destacando possível loop exposto clivado por tripsina. **75**

Figura 33. Perfil cromatográfico de exclusão molecular analítica (ASEC) da cauda globular inteira (GT-f) e clivada (cGT-f). **77**

Figura 34. Determinação do massa molecular da cauda globular inteira (GT-f) e clivada (cGT-f). **78**

Figura 35. Determinação do raio hidrodinâmico da cauda globular inteira (GT-f) e clivada (cGT-f) por cromatografia de exclusão molecular analítica (aSEC). **79**

Figura 36. Curva de espalhamento da cauda globular inteira (GT-f). **81**

Figura 37. Gráfico de Kratky da curva de espalhamento de SAXS para a cauda globular inteira (GT-f). **82**

Figura 38. Gráfico de Guinier calculado a partir da curva de espalhamento da cauda globular (GT-f) pelo programa PRIMUS. **82**

Figura 39. Curva de distribuição de distâncias $P(r)$ calculada pelo programa GNOM a partir dos dados experimentais de SAXS com exposição de 30seg da amostra contendo a cauda globular inteira (GT-f). **83**

Figura 40. Sobreposição do modelo atômico da cauda globular inteira (GT-f) calculado pelo servidor I-TASSER ao envelope a baixa resolução calculado a partir dos dados de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS). **84**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores construídos para cada alvo. **21**

Tabela 2. Condições testadas em expressão analítica dos domínios alvo. **32**

Tabela 3. Concentrações dos produtos de PCR extraídos de gel de agarose a 1%. **49**

Tabela 4. Condições de expressão para obtenção de alvos solúveis. **52**

Tabela 5. Soluções utilizadas para experimentos com FERM (FERM-f) fusionado a 6xhis. **55**

Tabela 6. Determinação de raio hidrodinâmico (Rh) e dispersidade do domínio FERM (FERM-f). **58**

Tabela 7. Soluções utilizadas para os experimentos com a construção C-terminal da cauda globular (GLOB_2) fusionada a SUMO. **60**

Tabela 8. Soluções utilizadas em experimentos com a cauda globular inteira (GT-f) fusionada a 6xhis. **64**

Tabela 9. Média dos principais parâmetros extraídos do experimento de espalhamento dinâmico de luz (DLS) para a cauda globular inteira (GT-f). **67**

Tabela 10. Conteúdo de estrutura secundária da cauda globular inteira (GT-f). **68**

Tabela 11. Determinação de parâmetros moleculares da cauda globular inteira (GT-f) e clivada (cGT-f) por cromatografia de exclusão molecular analítica (aSEC). **77**

Tabela 12. Comparação entre parâmetros moleculares para a cauda globular inteira (GT-f) e clivada (cGT-f) determinados por diferentes técnicas. **79**

Tabela 13. Comparação dos raios calculados para a cauda globular inteira (GT-f). **83**

LISTA DE ABREVIÇÕES

Arg: arginina

aSEC: *analytical size exclusion chromatography* (cromatografia por exclusão molecular analítica)

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

CD: *circular dichroism* (dicroísmo circular)

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

C-terminal: carboxi terminal

DLS: *dynamic light scattering* (espalhamento dinâmico de luz)

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxinucleotídeo fosfatado

ddNTP: didesoxinucleotídeo fosfatado

DSF: *differential scanning fluorescence*

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

FERM-f: construção inteira do domínio FERM da miosina XV

FPLC: *fast performance liquid chromatography*

GLOB_1: construção N-terminal da cauda globular da miosina V

GLOB_2: construção C-terminal da cauda globular da miosina V

GST: glutathione S-transferase.

GT-f: construção inteira da cauda globular da miosina V

IMAC: *immobilized metal ion affinity chromatography* (cromatografia por afinidade a ion metálico imobilizado)

IPTG: isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

KIN-f: construção do domínio quinase inteiro da miosina III

LB: Luria Bertani

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

N-terminal: amino-terminal

PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

RNA: ácido ribonucleico

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

SEC: *size exclusion chromatography* (cromatografia por exclusão molecular)

TFS: tampão fosfato salino

Tm: temperatura de transição / *melting temperature*

Rh: raio hidrodinâmico

Rg: raio de giro

X-gal: 5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosídeo

RESUMO

As miosinas pertencem a uma família de proteínas motoras que através da hidrólise de ATP são capazes de se movimentarem pelas fibras de actina. Sua estrutura é dividida em três domínios principais: motor, responsável pela hidrólise do ATP; regulador, envolvido na ligação de cadeias leves de calmodulina e a cauda, que tem papel essencial na mediação de interações com cargas celulares, como organelas, ácidos nucleicos e outras proteínas. O organismo modelo para insetos, *Drosophila melanogaster*, possui 11 miosinas pertencentes a 8 classes sendo que informações funcionais e bioquímicas são escassas, e estruturais, inexistentes. Apesar dos grandes avanços obtidos nos estudos de miosinas humanas, as miosinas de inseto ainda são pouco caracterizadas não havendo estudos comparativos, como por exemplo, para a determinação de conservação de parceiros moleculares entre os diferentes filós da classificação de Lineu. Neste contexto, foram selecionados os seguintes domínios de inseto para caracterização molecular: quinase da miosina III, cauda globular da miosina V e FERM da miosina XV. A partir do cDNA da pupa e adulto do inseto foram amplificados os fragmentos de genes de interesse e clonados em vetor de clonagem, pGEM *T-easy*, e posteriormente de expressão, pET28a e pET28aSUMO. Após testes em diversas condições no sistema bacteriano, as construções cauda globular da miosina V (GLOB_2 e GT-f) e domínio FERM-f da miosina XV foram obtidos na fração solúvel e com rendimento suficiente para estudos estruturais. O protocolo de expressão em larga escala assim como de purificação foram estabelecidos para cada uma dessas construções. Estudos biofísicos por aSEC, DLS, CD e SAXS foram realizados para a proteína GT-f da miosina V, mostrando a proteína monomérica com alto conteúdo de hélices-alfa corroborando as análises *in silico* e com as caudas globulares de miosinas ortólogas já descritas. Além disso, sua termoestabilidade foi avaliada com T_m de 46 °C e que sua estabilidade é alterada pela adição de alguns ligantes, mas não pela força iônica como verificado para a cauda globular da miosina Va humana. A estrutura a baixa resolução da GT-f foi determinada pelos experimentos de SAXS, mostrou uma proteína monomérica com forma alongada (D_{max} =100 Å). Para a construção FERM-f, apesar do sucesso alcançado no protocolo de expressão e purificação, a amostra permaneceu polidispersa e com uma estrutura *random coil*, inviabilizando futuros experimentos. Acredita-se que a ausência do domínio MyTH4, gerou a perda de estabilidade do domínio FERM-f e será necessária a clonagem dos dois domínios fusionados para garantir a estabilidade estrutural e funcional.

Palavras-chave: miosina V, cauda globular, domínio FERM, *Drosophila melanogaster*.

ABSTRACT

Myosins belong to a motor protein superfamily that uses the ATP hydrolysis to move along actin filaments. Its structural architecture comprises three main domains: motor, responsible for ATP hydrolysis; regulator, which binds calmodulin light chains; and tail, responsible for cellular cargoes binding. *Drosophila melanogaster*, an insect model, has 11 myosins belonging to 8 different myosin classes; however functional and biochemical data are scanty, and, structural, absent. Although the great advances on investigating human and yeast myosins with the elucidation of molecular partners and molecular mechanisms involved in signaling, there are no comparative studies among different phyla. Therefore, in order to gain insights into insect myosins, *in silico* analysis were performed and some domains like kinase (myosin III), globular tail (myosin V), and FERM (myosin XV) were selected for biophysical and structural studies. From pupa and adult cDNAs, the target genes were amplified and cloned into pGEM- T-*easy*, pET28a and pET28aSUMO vectors. After expressions tests, the myosin V globular tail constructs, GLOB_2 and GT-f, and myosin XV FERM-f were obtained in soluble fraction and in sufficient amounts for structural studies. aSEC, DLS, CD e SAXS biophysical studies were performed to myosin V GT-f, showing that the protein is monomeric with predominance of alpha-helix in accordance with *the in silico* atomic model. The stability of GT-f was assessed with a T_m of 46 °C and some molecules are able to increase the stability, while the ionic strength has no difference like was observed for the human globular tail of myosin Va. The low resolution structure determined by SAXS experiments confirmed the monomeric state and its elongated molecular shape ($D_{max} = 100 \text{ \AA}$). The FERM-f construct, although the purification and expression protocol were standardized, the sample remained polydisperse with a random coil structure, disabling other biophysical experiments. It is supposed that the absence of the MyTH4 domain in the FERM-f domain results in loss of stability, and cloning and expression of fused domains will be necessary to guarantee structural and functional stability.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, myosin V, globular tail, FERM domain.

I- Introdução

1. Miosinas não-convencionais

As miosinas são uma superfamília de proteínas motoras, amplamente distribuídas pelos diferentes tipos celulares, que através da hidrólise de ATP, são capazes de gerar energia para o seu deslocamento sobre filamentos de actina, desempenhando um importante papel na movimentação de organelas, no transporte de proteínas e RNA, na manutenção da arquitetura celular, na transdução de sinais e morfogênese (WHEATLEY *et al.*, 1995; TZOLOVSKY *et al.*, 2002; ROYOU *et al.*, 2004; MERMALL *et al.*, 2005).

As miosinas, em geral, compartilham de três domínios característicos: domínio motor conservado (cabeça) que possui um sítio de ligação para actina e outro para hidrólise de ATP; adjacente a este se encontra o domínio regulatório (pescoço) contendo normalmente até seis motivos IQ, com consenso de sequência IQxxxRGxxxR, o qual possui sítio de ligação para íons Ca^{2+} e cadeias leves de calmodulina; e na porção C-terminal localiza-se o domínio cauda, cuja algumas possíveis funções são (I) a ancoragem e posicionamento do domínio motor, (II) dimerização e (III) interação com os componentes celulares a serem transportados (figura 1) (BONAFÉ e SELLERS, 1998; SELLERS, 2000; ODRONITZ *et al.*, 2007).

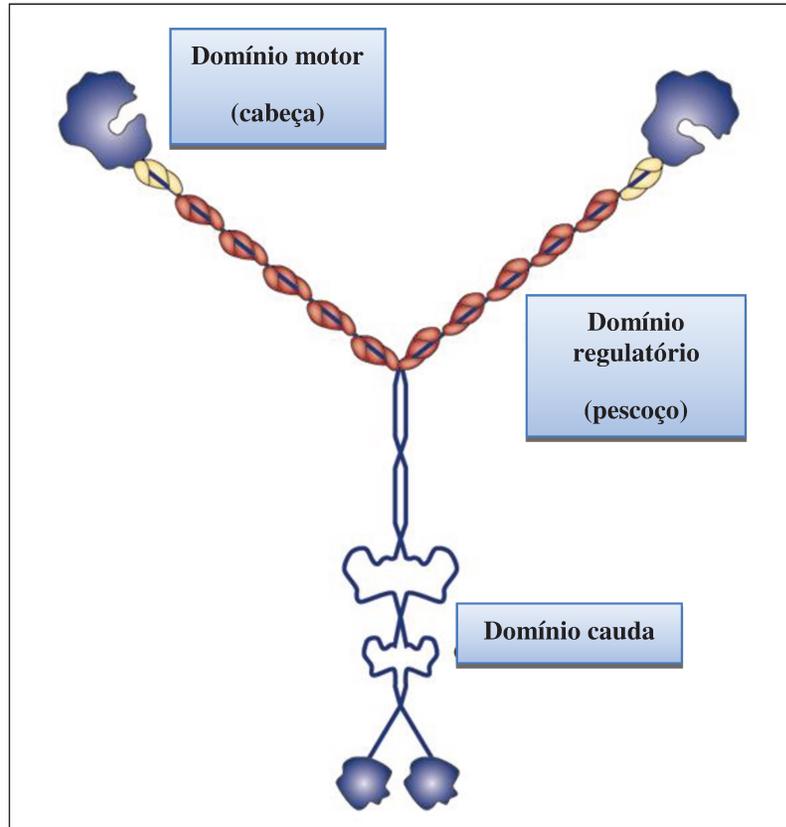


Figura 1. Domínios funcionais característicos das miosinas (miosina V): domínio motor (cabeça) que contém os sítios de ligação para ATP e actina; pescoço, o qual liga cadeias leves de calmodulina, e domínio cauda, responsável pela ligação às cargas moleculares. Adaptado de Spudich (2001).

Inicialmente as miosinas eram divididas em dois grupos (I e II) dependendo de seu arranjo quaternário funcional, onde aquelas pertencentes ao grupo I eram exclusivamente monoméricas e as pertencentes ao grupo II eram diméricas, geralmente estabilizadas por uma região *coiled-coil*. Entretanto, com a crescente descoberta de novas classes, convencionou-se a classificação em miosinas convencionais, constituída pelas miosinas II, e as não-convencionais (nomeadas cronologicamente em algarismos romanos), representando todas as outras classes (CHENEY e MOOSEKER, 1992). A classificação é feita com base na similaridade das sequências dos domínios motores, onde pode haver deleções ou substituições de aminoácidos (TZOLOVSKY *et al.*, 2002). Até o presente momento foram descritas 35 classes de miosinas, além das órfãs de classe, na qual estão proteínas as quais não foram classificadas devido a sua estrutura peculiar e seus padrões distintos de domínios (ODRONITZ *et al.*, 2007).

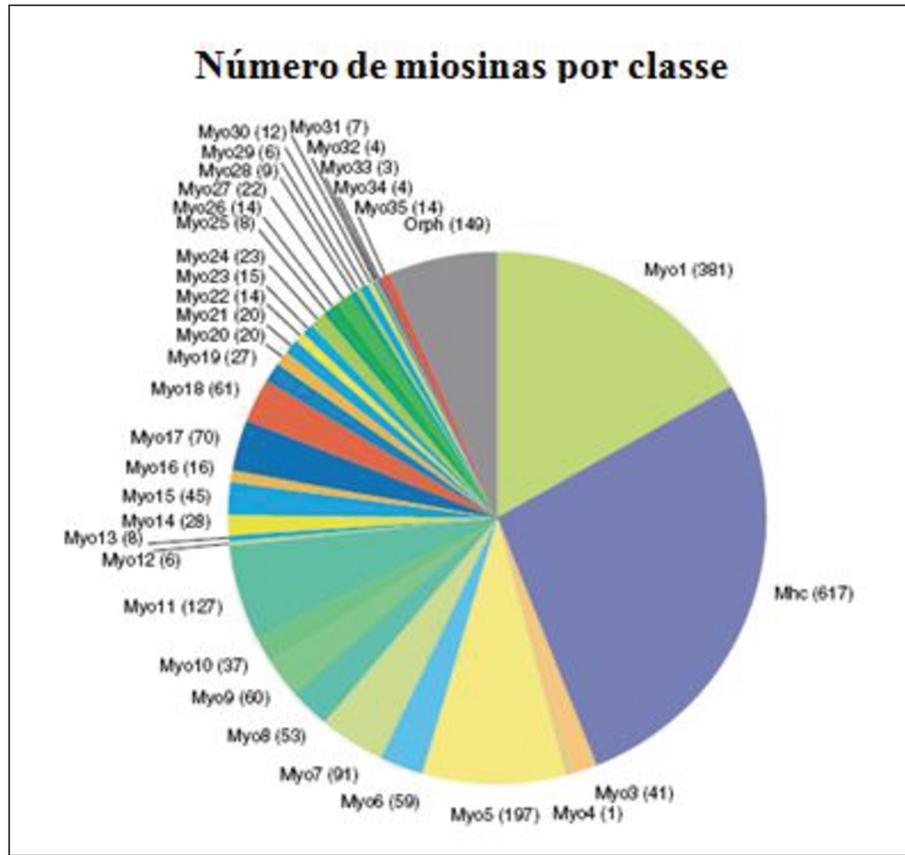


Figura 2. Classes de miosinas. Representação das 35 classes, além das órfãs de classe, já descritas até o momento e o número de proteínas classificadas em cada uma delas. A nomenclatura é feita em algarismos arábicos (Myo1, Myo2, Myo5, Myo21, etc...), com exceção da classe 2 que é representada como Mhc, e a classe órfã é apresentada como Orph. Adaptado de Odronitz e Koolmar (2007).

Organismos multicelulares podem expressar de 10 a 40 genes que codificam em torno de seis classes de miosina, o que mostra a grande importância desta família de proteínas para o funcionamento celular. Diferentes genes podem codificar miosinas de uma mesma classe e cada um desses genes pode ainda sofrer *splicing* alternativo do mRNA, gerando diferentes isoformas e resultando em uma grande variabilidade funcional; fato que torna bastante interessante o estudo dessas proteínas (EMERSON e BERNSTEIN, 1987). Assim, a utilização de organismos modelos é uma ferramenta fundamental para estudos bioquímicos comparativos, a fim de determinar diferentes funcionalidades entre proteínas ortólogas. Nesse trabalho, é utilizado o organismo modelo para insetos, a *Drosophila melanogaster*.

2. Miosinas de *Drosophila melanogaster*

As *Drosophilas* ou moscas das frutas são organismos pertencentes ao filo Arthropoda, classe Insecta e ordem Díptera com cerca de dois mil gêneros já descritos; são bastante conhecidas pelo fato de serem pequenas moscas que habitam os mais diversos tipos de ambientes em que há frutos em decomposição e leveduras. A espécie mais conhecida do gênero *Drosophila* é *melanogaster*, sendo um organismo muito utilizado para modelos de pesquisa em genética já que seu genoma foi completamente mapeado e sua vida diplóide é bastante curta (ciclo de vida de 12 dias) (DANG *et al*, 1998).

Assim como a maioria dos seres eucariotos, as *Drosophilas* apresentam miosinas nos seus diversos tipos celulares, em diferentes fases de sua vida. Um fato interessante é que elas exibem várias classes de miosinas, sendo a maioria ortólogas aquelas encontradas em organismos vertebrados como ratos e humanos. Foram identificadas no inseto miosinas não-convencionais da classe I (com 3 genes), classe III (classificada por Odronitz e colaboradores [2007] como classe XXI), classe V, classe VI, classe VII (2 genes), classe XV, classe XVIII e classe XX (figura 3).

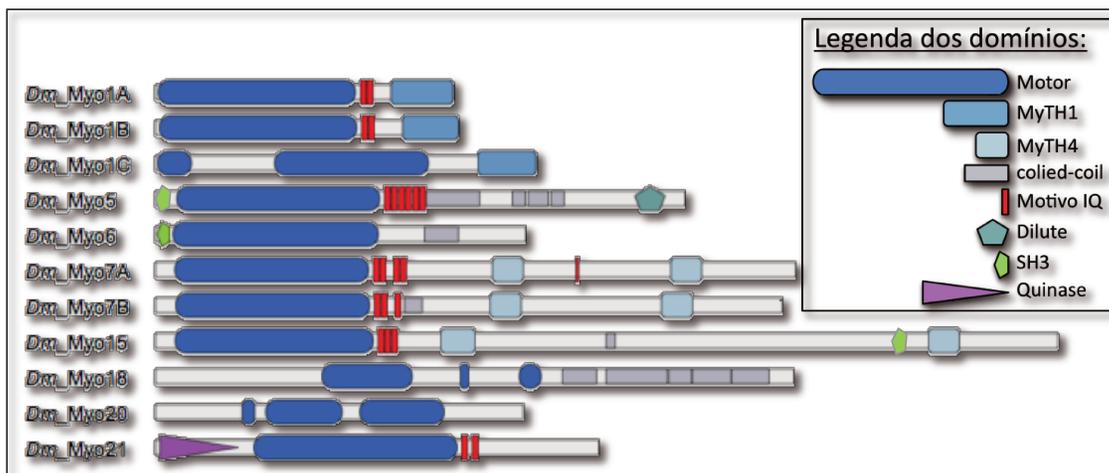


Figura 3. As diferentes classes de miosinas encontradas em *Drosophila melanogaster*. Ilustração dos diferentes domínios (legenda) presentes nas miosinas descritas pelo servidor CyMoBase (ODRONITZ e KOLMAR, 2007).

Cada uma delas apresenta particularidades no domínio motor, bem como variações nos domínios IQ do pescoço e principalmente na composição e no tamanho do domínio cauda, sugerindo que cada uma delas possam desempenhar diferentes funcionalidades ou

mesmo possuir especificidade para diferentes compartimentos/componentes celulares. O domínio cauda é muito variável quanto ao tamanho e funcionalidade, variando de acordo com a classe. Neles ainda estão inseridos muitos domínios ou subdomínios funcionais, (*coiled-coil*, MyTH1, MyTH4, SH3, Dilute e FERM) os quais interagem as cargas moleculares celulares. Há ainda, aqueles domínios que podem estar localizados anteriormente a cabeça reguladora, tais como SH3 e quinase (YAMASHITA *et al.*, 2000; TZOLOVSKY *et al.*, 2002).

Há ainda a classe órfã na qual estão inclusas proteínas que apresentam características peculiares, seja no domínio motor, no pescoço ou na cauda, e, portanto não podem ser enquadradas em nenhuma das classes, até que estudos mais específicos sejam feitos (TZOLOVSKY *et al.*, 2002).

As miosinas de classe I, de modo geral, possuem um domínio motor característico e uma cauda curta, e estão envolvidos em fenômenos como ligação a membrana, associação à vesículas e proteínas (MORGAN *et al.*, 1994). Elas diferem de outras miosinas pelo fato de apresentarem uma pequena cadeia pesada e não formar filamentos grossos (POLLARD e DOBERSTEIN, 1991). Em *D. melanogaster* já foram descritas Myo1a (gene *Myo31DF*), Myo1b (gene *Myo61F*) e Myo1c (gene *Myo95E*), sendo que as duas primeiras foram bastante estudadas do ponto de vista estrutural. Elas diferem principalmente no motivo IQ e no tamanho da cauda (MORGAN *et al.*, 1994). Já a miosina Myo1c contém um domínio cauda característico dessa classe; aparentemente a cauda se liga a fosfolipídios e filamentos de actina (TZOLOVSKY *et al.*, 2002).

As miosinas de classe VI consistem de um domínio motor N-terminal, um curto pescoço com somente um domínio IQ, uma cauda central e um domínio de ligação à cargas moleculares C-terminal (HASSON e MOOSEKER, 1994) (figura3). A classe VI é representada pelo gene *Jaguar*, expresso em células foliculares migratórias de *D. Melanogaster*, bem como também nas células de borda que migram por entre as células enfermeiras e se alojam na região anterior do oócito, desempenhando importante função na oogênese. Insetos deficientes nesse gene apresentam malformações nas patas e asas que podem levar a letalidade, indicando que este gene é essencial na morfogênese do disco imaginal e das células epiteliais foliculares (DENG, 1999; PETRITSCH *et al.*, 2003). Essa classe foi inicialmente descrita em *Drosophila* (KELLERMAN e MILLER, 1992) e

apresenta propriedades celulares únicas devido sua movimentação na direção da extremidade negativa dos filamentos de actina, direção oposta à de miosinas de outras classes conhecidas (NOUGUCHI *et al.*, 2006; WELLS *et al.*, 1999).

As miosinas de classe VII incluem em *Drosophila melanogaster*, Myo7a (gene *crinkled*) e Myo7b (gene *Myo28B*) que apresentam 74% de similaridade entre si. A Myo7a apresenta na região do pescoço cinco motivos IQ e uma região em *coiled-coil* na cauda que permite a sua oligomerização de maneira a formar duas porções distintas. Myo7a possui importante papel no transporte de membrana e função dos estereocílios (TZOLOVSKY *et al.*, 2002), já Myo7b apresenta quatro motivos IQ e exerce sua função na adesão celular e na fagocitose (YANG *et al.*, 2005).

A miosina classe XVIII (*Mhcl*), possui uma estrutura bastante complexa e de alta expressão durante o ciclo de vida de *D. melanogaster*. Das sete isoformas traduzidas, duas são altamente expressas enquanto as outras cinco são expressas em menor quantidade (TZOLOVSKY *et al.*, 2002).

O gene *Myo29D* possui um domínio motor que não apresenta similaridade a nenhuma das classes descritas até o momento e, portanto, recentemente foi classificada como pertencente à classe 20 (exclusiva de insetos). Além disso, esse gene apresenta três exons na porção 5' do gene que sofrem *splicing* alternativo produzindo pelo menos três isoformas, sendo que duas destas estão presentes durante todos os estágios de desenvolvimento de *Drosophila*. A proteína codificada por Myo29D apresentou 45% de similaridade com a miosina das classes V, VII e X de diferentes espécies, suficiente para que seja considerada uma miosina, porém, não para ser classificada como membro de alguma dessas classes. Ela também apresenta um pequeno domínio transmembrana em sua cauda, rico em resíduos de prolina e teve sua função implicada no tráfego de membrana, transdução de sinal e manutenção da arquitetura celular (TZOLOVSKY *et al.*, 2002).

3. Miosinas alvo

Do ponto de vista funcional, as miosinas de classe III, V e XV são bastante interessantes funcionalmente e ainda pouco exploradas do ponto de vista bioquímico e estrutural.

3.1 Classe III

As miosinas de classe III são as mais divergentes, em relação ao tamanho e função, e seus papéis são fundamentais em funções sensoriais. Segundo Morgan e colaboradores (1994), desempenham importante papel no sistema visual, transportando calmodulina, uma proteína regulatória Ca^{2+} -dependente envolvida na transdução de sinais.

Os genes *MYO3A* e *MYO3B*, responsáveis pela transcrição de miosinas III em humanos, encontram-se localizados no cromossomo 10p11. Mutações no gene *MYO3A* pode gerar a síndrome da perda progressiva da audição (DFNB30), enquanto mutações no gene *MYO3B* resultam na síndrome de Bardet-Biedl, caracterizada por obesidade (DOSÉ e BURNSIDE, 2000).

Em *D. melanogaster*, o gene *ninaC*, o qual codifica a miosina III, ao sofrer mutações, resulta em fenótipo de deficiência visual e aberrações eletrofisiológicas, mostrando seu papel fundamental na fototransdução, assim como na degeneração de receptores luz-dependentes. O gene possui duas diferentes isoformas, p174 e p132 (MONTELL e RUBIN, 1988).

As proteínas codificadas por *ninaC* possuem um domínio quinase responsável pelo *feedback* negativo na regulação da foto-resposta. Deleções do domínio quinase de p174 geram, além de defeitos na resposta eletrofisiológica, a degeneração da retina e perda da sua localização nas microvilosidades do rabdômero, já que esse domínio fosforila diversos substratos incluindo a outra isoforma do gene, p132. Ambas as isoformas ligam cadeias leves de calmodulina, porém sugere-se que p174 seja necessária para a localização de calmodulina e de foto-receptores e integridade do rabdômero. Enquanto, p132 tem papel importante no transporte de fotoreceptores de membrana (figura 4) (HICKS *et al.*, 1996; LEE e MONTELL., 2004; LI *et al.*, 1998; NG *et al.*, 1996; PORTER *et al.*, 1992; PORTER *et al.*, 1993; WILLIAMS, 1991).

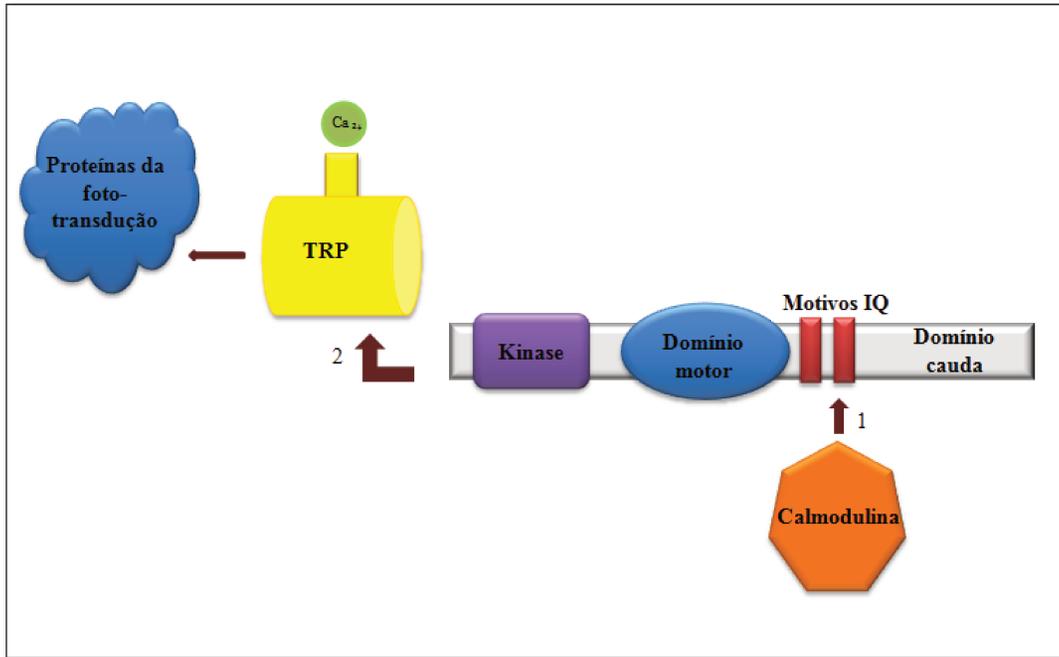


Figura 4. Principais processos que envolvem a miosina III (174p) em *D. melanogaster*. (1) A interação através do pescoço com calmodulina é requerida para a adaptação e terminação da foto-resposta. (2) O domínio quinase fosforila o canal receptor transiente de íons (TRP) que então se liga a proteínas relacionadas a função de foto-transdução (criado a partir de Li *et al.*, 1998).

Apesar da identidade de 49% entre os domínios quinases de miosina humana e de inseto (figura 5), sugere-se que possuam diferentes especificidades de substrato, uma vez que não foram realizados estudos estruturais a fim de caracterizar os domínios quinases de miosinas III (KOMABA *et al.*, 2003).

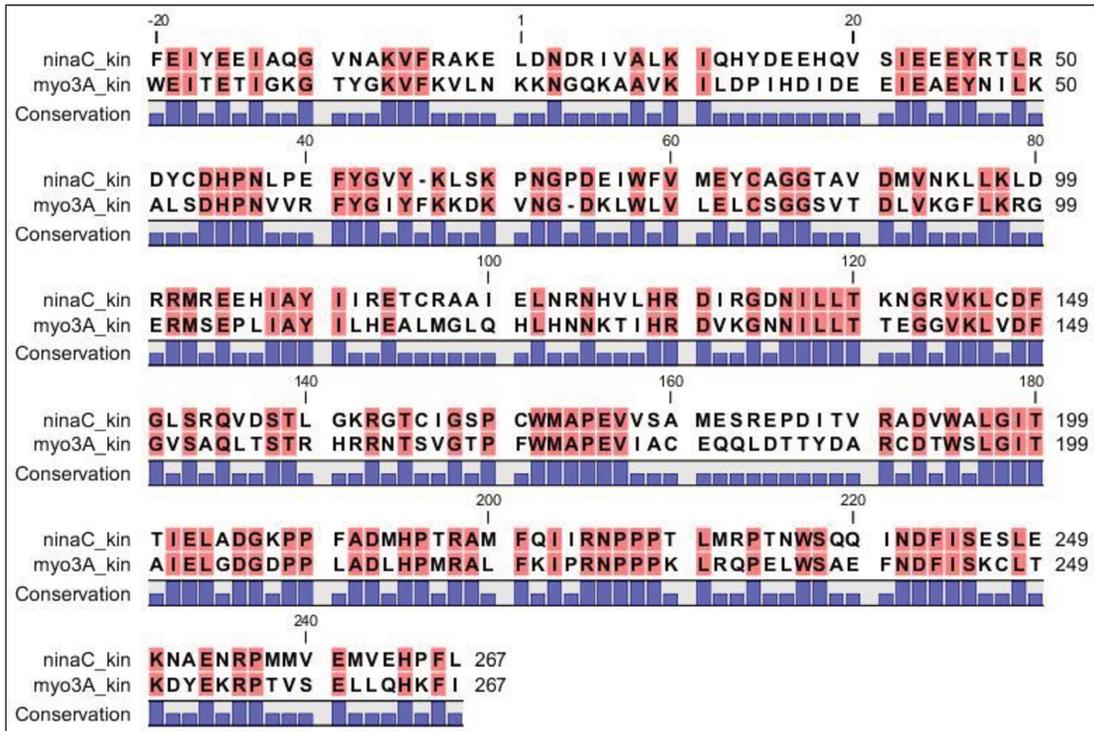


Figura 5. Alinhamento entre os domínios quinase da miosina III de inseto e humano. Ambos possuem 287 resíduos (SMART) de 1 a 287. Os resíduos em vermelho são aqueles conservados entre as sequências havendo 41% de identidade (KOMABA *et al.*, 2003). Alinhamento feito pelo servidor ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e CLC Protein Workbench 5.0.

3.2 Classe V

As miosinas V são uma das classes mais estudadas de motores moleculares, sendo identificadas em uma grande variedade de espécies incluindo artrópodes. Geralmente, as miosinas V são abundantes em tecido neuronal e nas bordas dos enterócitos participando na manutenção da homeostase celular pela mediação do tráfego intracelular (BONAFÉ e SELLERS, 1998; KRENDEL e MOOSEKER, 2005; OLKKONEN e IKONEN, 2006; TRYBUS, 2008).

Camundongos *knockout* para o gene da miosina V possuem coloração aberrante da pele devido à deficiência no tráfego de melanossomos, e algumas semanas, depois morrem devido a danos cerebrais. Em humanos, mutações e deficiência na miosina V ou proteínas adaptadoras, causam a síndrome de Griscelli tipo I ou Elejade caracterizada por falhas na pigmentação e severa deficiência neurológica. A miosina V está envolvida, também no tráfego de receptores de membrana como o ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol

propiónico (AMPA) e receptores de acetilcolina, mostrando a sua importância em processos de sinalização e manutenção das junções sinápticas neuromuscular e neuronais (CORREA *et al.*, 2008; MENASCHE *et al.*, 2003; PASTURAL *et al.*, 1997; RÖDER *et al.*, 2008, RÖDER *et al.*, 2010; RUDOLF *et al.*, 2011; SELLERS AND KNIGHT, 2007; VOLPICELLI *et al.*, 2002).

De maneira geral, as miosinas dessa classe possuem um domínio motor conservado seguido de seis motivos IQ regulatório e uma cauda característica, apresentando trechos de *coiled-coil* intercaladas com regiões *coil*, e um domínio globular. A cauda globular é responsável pela estabilização da forma inibida da miosina V sendo que experimentos de criomicroscopia eletrônica mostraram a inibição do domínio motor, formando uma estrutura *coneflower-like*, (figura 3 e 6B) (BONAFÉ & SELLERS, 1998). Este domínio é, também, responsável pela ligação a carga molecular através de interações diretas ou indiretas com vesículas e organelas. (figura 6). (LI *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2006). A cauda contém ainda sítios de ligação para adaptadores moleculares como pequenas GTPases, PTEN e RILPL2, envolvidos em vias de crescimento, tamanho e forma de células neuronais (KREIS *et al.*, 2010; LISÉ *et al.*, 2009; RÖDER *et al.*, 2010; ROLAND *et al.*, 2009; VAN DIEPEN *et al.*, 2009).

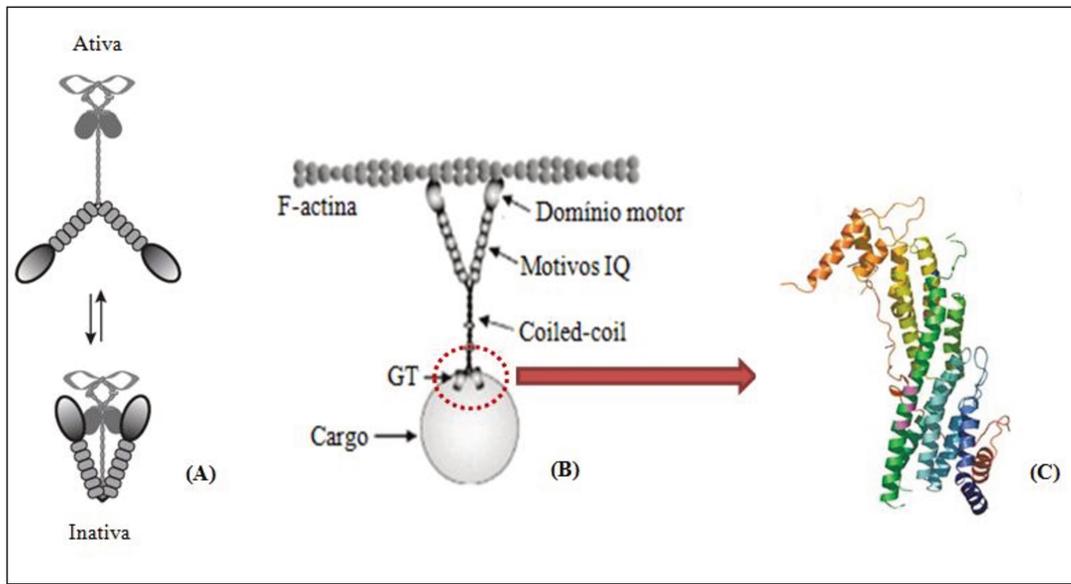


Figura 6. Descrição molecular das miosinas de classe V. (A) Ilustração da forma inativa da miosina, quando a cauda globular (GT) se liga ao domínio motor (estrutura *coneflower-like*) e a forma ativa, quando devido a estímulos celulares e aumento de substrato no ambiente, a cauda globular se desliga do domínio motor que interage com filamentos de actina e a cauda globular se liga a sua carga molecular. (B) Domínios que compõem a estrutura das miosinas V em geral, adaptado de Pashkova e colaboradores (2005). (C) Estrutura resolvida por difração de raios X de *Myo2p* de *S. cerevisiae* a 2,2Å (PASHKOVA *et al.*, 2006). A miosina de levedura é um excelente modelo para a classe V, mostrando possíveis sítios de ligação a carga a ser transportada.

Em *D. melanogaster* foi identificado somente um gene para miosina V (gene *didum* ou *MyoV*), com alta similaridade em nível de estrutura primária a de vertebrados. Ela é responsável por várias funções celulares, tais como tráfego de vesículas, transporte de RNA e acoplamento mecânico-químico da actina ao citoesqueleto de microtúbulos, sendo expressa em muitos tecidos em diferentes fases da vida do inseto. Experimentos de expressão e localização demonstraram a importância da miosina V na espermatogênese larval, especificamente na individualização do espermatozóide para a formação de cones ricos em actina e na cabeça. Experimentos de localização por *northern blot* identificaram o transcrito do gene em células somáticas e germinativas de testículos, ovário, cérebro, olhos e intestino. A deleção ou truncagem do domínio cauda em miosinas V de inseto resulta em alta frequência de letalidade das larvas, principalmente para os indivíduos machos (BONAFÉ e SELLERS, 1998; MACIVER *et al.*, 1998; MERMALL *et al.*, 2005).

Em suma, as propriedades cinéticas e mecânicas e os mecanismos intracelulares das miosinas V têm sido amplamente estudados (CRAIG e LINKE, 2009; DESNOS *et al.*,

2007; OKE *et al.*, 2010; KÖGEL *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2010; RUDOLF *et al.*, 2011; SAKAMOTO *et al.*, 2008; SELLERS e VEIGEL, 2006; SELLERS e VEIGEL, 2010; TEHVER e THIRUMALAI, 2010; WEISMAN, 2006), porém informações estruturais a respeito de regulação e função são escassos, principalmente para insetos, sendo *Myo2p* de *S. cerevisiae* a estrutura de miosina V até hoje resolvida por cristalografia de raios X, possuindo identidade de 24% com a ortóloga humana (figura 7) (HEUCK *et al.*, 2010; PASHKOVA *et al.*, 2006).

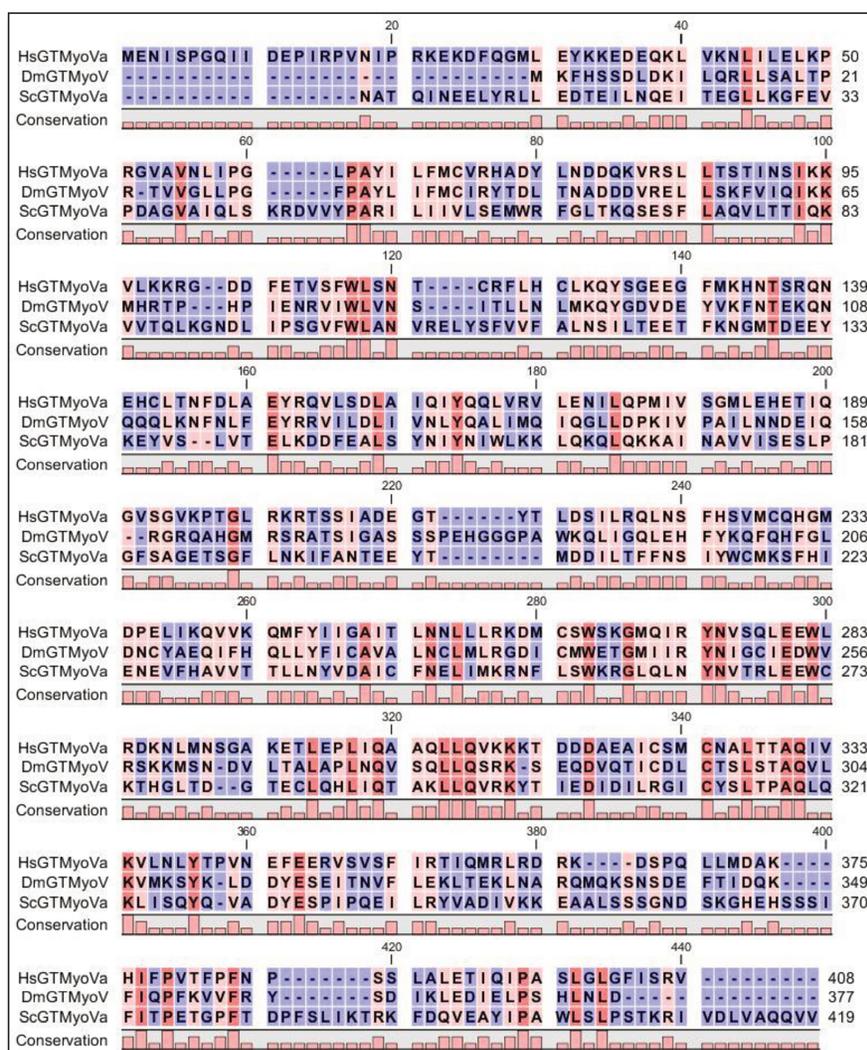


Figura 7. Alinhamento entre as caudas globulares de inseto (DmGTMyoV), levedura (ScGTMyoVa) e humano (HsGTMyoVa). O gradiente de vermelho a azul, mostra os resíduos mais conservados até os sem conservação (ClustalW/CLC Protein Workbench 5.0). A identidade entre elas é baixa, porém a cauda de inseto possui maior identidade com as de mamífero do que as de outros invertebrados (BONAFÉ e SELLERS, 1998).

O domínio cauda de *D. melanogaster* está mais relacionado ao de humano em comparação ao de invertebrados, contendo um número comparável de porção *coiled-coil* e seguido pela cauda globular. Devido à proximidade de estrutura do domínio cauda de inseto ao de mamífero infere-se que podem desempenhar funções próximas, tais como o transporte de vesículas. Por outro lado, divergências na estrutura primária podem indicar outros possíveis alvos moleculares (BONAFÉ e SELLERS, 1998; RUDOLF *et al.*, 2011).

3.3 Classe XV

A classe XV são as miosinas de maiores cadeias já descritas; seu gene possui 66 exons, sendo que o segundo exon codifica um domínio rico em prolina na região N-terminal da miosina tanto de camundongo (gene *shaker*) como humano (gene *Myo10*) não possuindo homologia a qualquer outra proteína. O domínio cauda não possui nenhuma região predita para *coiled-coil*, porém há similaridade com as miosinas de classe VII, pelo fato de possuir os domínios MyTH4, FERM e SH3.

Sisyphus ou *MYO10A* é o gene representante da classe XV em *D. melanogaster* e é expresso na progressão dos estágios larvais. A região N-terminal é curta e o seu pescoço apresenta quatro motivos IQ, sendo que adjacente há uma pequena região *coiled-coil*. A isoforma mais longa possui 5 exons e representa pouco mais de 5% da quantidade total de mRNA para esta miosina, por outro lado, a isoforma mais curta é expressa em grande quantidade e nesta dois exons estão ausentes (TZOLOVSKY *et al.*, 2002). A miosina XV de *D. melanogaster* é necessária no processo de fechamento dorsal, onde há movimentação epitelial e morfogênese embrionária. Durante esse processo as células epiteliais exibem protrusões celulares: lamelopódios e filopódios, responsáveis pelo fechamento dorsal. Dentre esses, as cargas moleculares reconhecidas pelo domínio FERM estão a DE-caderina (proteína de adesão focal) e diversas proteínas reguladoras de microtúbulos que também possuem papel fundamental no fechamento dorsal (BERG e CHENEY, 2002; FAIX E ROTTNER, 2006; JACINTO *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2008; MERMALL *et al.*, 1998).

Os subdomínios FERM (superfamília *F*, *erezin*, *radixin* and *moesin*) interagem com domínios citoplasmáticos de proteínas de membranas integrais como CD44, CD43 e ICAM2 funcionando como conectoras entre a membrana celular e o citoesqueleto de actina. No caso das miosinas, esse domínio foi descrito em diferentes classes, tais como XV e VII,

possuindo importância fundamental nos sistemas auditivo e vestibular (ANDERSON *et al.*, 2000; CHRISHTI *et al.*, 1998; YONEMURA *et al.*, 1998). Zhang e colaboradores (2004), mostraram que o domínio FERM da miosina XV humana se liga a β -integrinas e as transporta para as extremidades filopodiais, sendo necessária para a extensão dos filopódios e aderência ao substrato.

Mutações no gene na região cauda da miosina XV de camundongo estão associadas à surdez, assim como para o ortólogo em humanos. Experimentos de impregnação por imunofluorescência mostraram que a miosina XV está presente no corpo celular e estereocílios de pêlos (LIANG *et al.*, 1999; PROBST *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1998).

Wu e colaboradores (2011) resolveram a estrutura tridimensional do domínio SH3-MyTH4-FERM da miosina VIIa de camundongo (gene *myo7a*) (figura 8), trazendo informações valiosas quanto a variedade de cargas moleculares capazes de se ligarem a proteína, entretanto, nenhum desses domínios foram caracterizados estruturalmente em miosinas de insetos. O complexo MyTH4-FERM da miosina X humana, teve sua estrutura resolvida por cristalografia de raios-X resolvida a 2,55Å, mostrando a composição predominantemente de hélices-alfa, mas também de folhas-beta (HIRANO *et al.*, 2011).

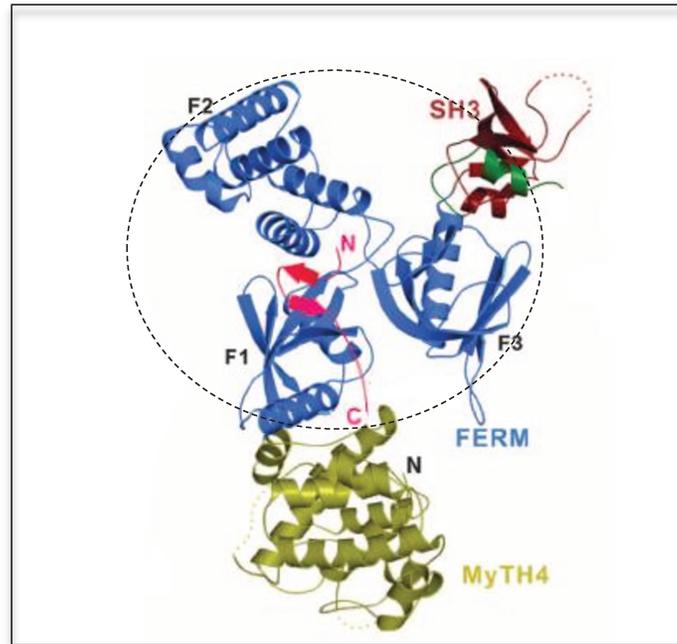


Figura 8. Domínios MyTH4-FERM-SH3 da miosina VIIa (camundongo) resolvidos por difração de raios X a $2,8\text{\AA}$, mostrando a composição de hélices-alfa e folhas-beta do domínio FERM em destaque (WU *et al.*, 2011).

O alinhamento entre os domínios FERM descritos, mostra que a conservação primária entre eles é baixa (figura 9). Tendo em vista a baixa conservação entre os domínios FERM das miosinas VII, X e XV estudos em busca da caracterização estrutural são de grande interesse para a identificação das cargas moleculares dessas proteínas e suas possíveis funções celulares. Além do mais, não foram, ainda, feitos estudos estruturais com domínios FERM pertencente a cauda de miosina XV de nenhum organismo.

II- Objetivos

1. Objetivos gerais

Obtenção de informações estruturais dos domínios funcionais das miosinas não-convencionais de classe III, V e XV, presentes em *Drosophila melanogaster* através de ferramentas cromatográficas, biofísicas e por espalhamento e/ou difração de raios X.

2. Objetivos específicos

2.1. Seleção dos domínios alvos através de análises *in silico*

2.2. Clonagem e expressão em escala analítica para verificação das construções expressas na fração solúvel

2.3. Escolha de, ao menos, um alvo para caracterização estrutural

2.4. Expressão e purificação em larga escala do alvo selecionado

2.5. Caracterização espectroscópica do alvo através de técnicas como dicroísmo circular (CD- *Circular Dichroism*), espalhamento dinâmico de luz (DLS - *Dynamic Light Scattering*) e espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS - *Small Angle X-ray Scattering*)

2.6. Ensaios de cristalização e tentativas de determinação da estrutura tridimensional por cristalografia de raios X.

III- Material e Métodos

1. Análise *in silico* para a seleção de alvos

Foram identificados genes codificadores de miosinas de *D. melanogaster* e seus possíveis *splicings* em bancos de dados como NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), FlyBase (<http://flybase.org/>) e Cymobase (ODRONITZ e KOLLMAR, 2007), os quais originam diferentes isoformas de proteínas a partir de um mesmo gene.

Para cada uma das proteínas traduzidas foram feitas análises em dois níveis estruturais: predição de enovelamento, através dos servidores FoldIndex (PRILUSKY *et al.*, 2000), DISOPRED2 (WARD *et al.*, 2004) e DisEMBL (LINDING *et al.*, 2003a), indicando as possíveis regiões ordenadas e desordenadas, e predição de estrutura tridimensional da molécula, através de modelagem molecular pela utilização do servidor I-TASSER (ZHANG, 2008), o qual consiste na construção de um modelo baseado em proteínas com alto grau de similaridade ou proteína homóloga descrita no *Protein Data Bank* (<http://www.pdb.com>).

Preditores, como DisEMBL e DISOPRED2, calculam, a pontuação referente a cada aminoácido da sequência; pontuações acima de 0,05 para DISOPRED2 e 0,5 para DisEMBL, indicam proteína desordenada. DISOPRED2 utiliza-se da média geométrica em seu algoritmo, o que pode resultar na distribuição errônea da pontuação, uma vez que a faixa de pontuação dos resíduos ordenados é muito estreita, enquanto a faixa dos desordenados, muito ampla. Seu banco de dados compreende 715 proteínas, onde 176550 resíduos são classificados ordenados e 4590, desordenados (PRILUSKY *et al.*, 2005; WARD *et al.*, 2004)

O preditor FoldIndex, por outro lado, implementou um algoritmo capaz de calcular a pontuação total da sequência, gerando somente a pontuação final, sendo abaixo de 0,0, considerada desordenada. O banco de dados de FoldIndex é composto por 39 proteínas e domínios, descritos na literatura como desordenados, e 151 proteínas ordenadas, descritas no *Protein Data Bank* (PRILUSKY *et al.*, 2005).

Os estudos foram direcionados para os domínios cauda das miosinas a fim de determinar possíveis cargas moleculares. Portanto, foram selecionados domínios e desenhadas algumas construções para a da cauda globular da miosina V isoforma C (GLOB_1, GLOB_2 e GT-f), do FERM da miosina XV isoforma C (FERM-f) e quinase da miosina III isoforma B ou p174 (KIN-f) (figura 10).

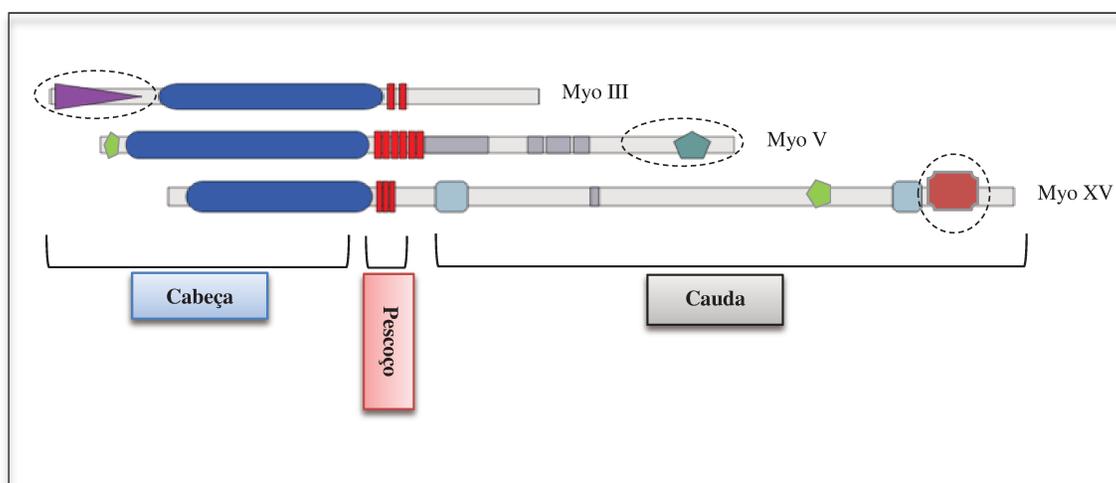


Figura 10. Localização de cada um dos domínios alvos em relação às miosinas inteiras. O domínio quinase da miosina III se localiza na região anterior da cabeça, enquanto os domínios cauda globular (Myo V) e FERM (MyoXV) estão localizados na cauda.

2. Clonagem

2.1 Construção de oligonucleotídeos iniciadores

A partir da seleção dos alvos, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores correspondentes às sequências nucleotídicas de cada fragmento de interesse da proteínas, capazes de hibridizar com a extremidade 5' (do no caso iniciador sense) e 3' (no caso do iniciador antisense) aos genes. As análises de sequência de nucleotídeos pelo servidor Webcutter 4.0 (HEIMAN, 1997), foram imprescindíveis para a verificação das enzimas de restrição as quais não possuíam sítios de clivagem ao longo da sequência do fragmento alvo. Todos os oligonucleotídeos sense foram desenhados com dois sítios de restrição tendo em vista que os fragmentos de genes seriam clonadas em diferentes vetores. Os iniciadores antisense além de conter um sítio de restrição, também possuíam *codon stop*, para a terminação da tradução. A seguir, utilizando a ferramenta Oligo Analyser, foram calculados

tamanho, temperatura de *melting* (Tm) e possíveis *hairpins* baseando-se no conteúdo de citosinas e guaninas das sequências. A tabela 1 mostra os oligonucleotídeos iniciadores desenhados com os respectivos sítios de restrição.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores construídos para cada alvo. Os iniciadores sense possuem sítio de restrição para *Bam*HI (negrito) e *Nde*I (sublinhado) enquanto os anti-sense possuem sítio de *Xho*I (negrito e itálico). O tamanho dos amplicons a serem gerados variam entre 500 e 1200pb. As temperaturas de *melting* (Tm) específica e total está descrita para cada iniciador (°C).

Classe	Protein ID (NCBI)	Domínio	Oligonucleotídeo		Tamanho Amplicon (pb)
			Sense	Anti-sense	
III	DmMyo3 (Isoforma B) NP_523503.2	Kinase (KIN-f)	DM21F101	DM21R282	576
			GGATCC <u>CATATG</u> GCT GCAGATTATCGCCG CCACT	<i>CTCGAG</i> TTAGAGGA ATGGATGCTCCACC ATCTCAAC	
			Tm total= 71,3°C Tm específica= 64,1°C	Tm total= 71,4 Tm específica= 67,5	
V	DmMyo5 (Isoforma C) NP_724569.1	Cauda globular (GT-f)	DM5F1418	DM5R1794	1152
			GGATCC <u>CATATG</u> AT GAAGTTCCACAGCA GCGATCTG	<i>CTCGAG</i> TTATCCAGA TTAAGATGCGACGG TAGT	
					Tm total= 71,8°C Tm específica= 66,1°C
		Cauda globular: N- Terminal (GLOB_1)	DM5F1418	DM5R1572	486
			GGATCC <u>CATATG</u> AT GAAGTTCCACAGCA GCGATCTG	<i>CTCGAG</i> TTAATCATT GTTGAGAATCGCTG GCACTAT	
			Tm total= 71,8°C Tm específica= 66,1°C	Tm total= 69,8°C Tm específica= 66,0°C	
		Cauda globular: C- Terminal (GLOB_2)	DM5F1603	DM5R1754	477
			GGATCC <u>CATATG</u> GC CTGGAAGCAACTGA TCGGG	<i>CTCGAG</i> TTATTGCAT TTGTCCGGCGTTCAG	
			Tm total= 73,4°C Tm específica= 66,4°C	Tm total= 69,5°C Tm específica= 65,2°C	
XV	DmMyo15 (Isoforma C) NP_572669.2	FERM (FERM-f)	DM15F2725	DM15R2941	672
			GGATCC <u>CATATG</u> TC AGCCAGGCGACAGA TCTACCGC	<i>CTCGAG</i> TTAGAAGC TGCTGCCGAAGAG	
			Tm total= 71,5°C Tm específica= 64,6°C	Tm total= 68,6°C Tm específica= 61,8°C	

2.2 Extração de RNA de *Drosophila melanogaster*

Os insetos foram disponibilizados pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP- USP), pelo departamento de Biologia Celular e Molecular, sendo a Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico responsável pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer.

Dez indivíduos de *Drosophila melanogaster* selvagens, sendo 5 machos e 5 fêmeas, e 10 pupas foram coletados. Posteriormente, os indivíduos foram desacordados com gás carbônico (CO₂) e estocados em tubos de centrifuga. Em seguida o tubo foi congelado em nitrogênio líquido. As pupas coletadas estavam em diferentes estágios da fase pupar.

O método TRIzol de extração de RNA, amplamente utilizado, é composto por agentes desnaturantes fortes tais como fenol, isotiocianato de guanidina e outros reagentes que mantêm a integridade do RNA na ruptura de tecidos. Os tubos foram, então, estocados em gelo e a cada um deles foi adicionado *TRIzol® RNA Isolation Reagent* (Invitrogen) e os indivíduos triturados. Seguindo o protocolo do fabricante, o RNA extraído foi armazenado a -80°C; o posterior acréscimo do clorofórmio permite a separação em fase aquosa e orgânica, sendo o RNA presente na fase aquosa e precipitado pela adição de isopropanol.

Após a lavagem com etanol 75% (v/v) tratado com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% (v/v), as amostras para estoque a -80°C foram resuspendidas em etanol 75% (v/v) DEPC, e aquelas para uso imediato, resuspendidas em água tratada com DEPC.

As ribonucleases (RNAses) representam grande preocupação, pois são capazes de degradar e prejudicar a integridade do RNA. Essas enzimas são provenientes de diversas fontes como tecidos (pele), ou, até mesmo, dos materiais utilizados no experimento, portanto, todas as precauções foram tomadas, incluindo o uso de água DEPC para a suspensão dos precipitados, a fim de garantir a inativação de RNAses.

2.3 Síntese da fita complementar de DNA (cDNA)

O processo de separação das fases na extração do RNA, mesmo quando realizada com precaução, pode resultar na contaminação da amostra com DNA total, portanto, para a eliminação de quaisquer traços de DNA total, a amostra foi tratada com a desoxiribonuclease I (DNase I), uma endonuclease capaz de clivar o DNA nas ligações

fosfodiéster, promovendo sua degradação. Na reação de síntese de cDNA, foi utilizado o oligo pd(N)₆, um hexâmero randômico que permite a cópia de mRNA de fragmentos que não possuem a cauda de poli (A); sendo que sua temperatura de extensão é a 37°C.

As concentrações de RNA, tanto de pupa como de adulto, foram determinadas em comprimento de onda de 260 nm no equipamento *NanoDrop* (ThermoScientific) para o cálculo da proporção de DNase I (Invitrogen) a ser adicionada, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, a reação foi inativada pelo aumento da temperatura (65°C) e adição de EDTA, o qual é capaz de quelar os íons essenciais para a atividade DNase.

Após tratamento com DNase I, os RNAs correspondentes a pupa e adulto foram tratados com os reagentes do kit *First Strand cDNA Synthesis® Kit* (GE) nas quantidades recomendadas pelo fabricante e aquecidos em termociclador a 37°C, durante 1h, para a síntese da fita complementar de DNA dos genes de interesse.

2.4 Amplificação dos fragmentos de gene a partir do cDNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase ou PCR, descrita em 1986 por Kary Mullis, permite a produção de grandes quantidades de um determinado fragmento de DNA, *in vitro*, a partir de uma única cópia de cDNA. Os desoxiribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) são os nucleotídeos e a base da reação, compondo os novos fragmentos de DNA gerados.

A. Montagem da reação

A fim de garantir máxima eficiência na amplificação dos genes das construções alvo, utilizou-se a enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen), nas quantidades recomendadas pelo fornecedor.

As condições para que a amplificação dos genes fosse efetiva consistiu de 5 min a 94°C para garantir a desnaturação total do DNA. Para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores a sequência de DNA, foram montados diferentes ciclos levando-se em conta: a temperatura de *melting* (T_m) média da região específica e T_m média de todo o iniciador (incluindo os sítios de restrição) (equação 1)

$$\begin{aligned}
 T_{a1}: T_{m_{\text{especifica}}} - 4^{\circ}\text{C} \\
 T_{a2}: \frac{T_{m_{\text{especifica}}} + T_{m_{\text{total}}}}{2} \\
 T_{a3}: T_{m_{\text{total}}} - 4^{\circ}\text{C}
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

Portanto, a ciclagem foi constituída de 6 ciclos com $T_{a1} = 60^{\circ}\text{C}$, 10 ciclos com $T_{a2} = 64^{\circ}\text{C}$ e 20 ciclos com $T_{a3} = 66^{\circ}\text{C}$. Para a temperatura de extensão, utilizou-se 2 min a 68°C , considerando que esta é a temperatura ótima para atividade da enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems).

B. Confirmação da amplificação e extração dos fragmentos de interesse

Para a análise da reação de amplificação, alíquotas dos produtos da PCR foram aplicadas em gel de 1% agarose, que após a corrida por diferença de potencial, foram expostas por 10 seg em luz ultravioleta, para verificação dos tamanhos dos produtos amplificados.

Com resultados positivos, todo o volume da PCR foi aplicado em gel de 1%, agarose para nova eletroforese, e exposto em luz ultravioleta para recorte das bandas correspondentes aos fragmentos. Para a extração do DNA do gel, utilizou-se o *QIAquick Gel Extraction® Kit* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

2.5 Clonagem em pGEM T-easy

A. Reação de ligação

Os insertos amplificados e purificados foram dosados no equipamento NanoDrop, a 260 nm para o cálculo do volume a ser utilizado para a reação de ligação em vetor do sistema pGEM® T-easy (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante. A reação permaneceu por 16 h a 4°C .

Os vetores de sistema pGEM T-*easy* são linearizados contendo uma timina em sua porção 3' que favorecerá a ligação dos produtos de PCR, os quais por ação da DNA Taq polimerase possuem uma adenina na região 5'. Para a inserção dos fragmentos no vetor, a T4 DNA ligase foi empregada, promovendo a ligação da extremidade 5'fosfato do fragmento a extremidade 3'hidroxil do vetor, nesse caso, de maneira coesiva.

B. Transformação da ligação em pGEM T-*easy* em *E. coli* DH5 α

Sabendo que o fenômeno de incorporação de DNA do meio pela bactéria é um fenômeno raro, as bactérias DH5 α competentes foram preparadas com cloreto de cálcio, cuja finalidade é neutralizar as cargas negativas da membrana bacteriana mantida a baixas temperaturas. Quando submetidas a um choque térmico de 42°C, são formados poros na membrana bacteriana, permitindo que o DNA recombinante seja permeado para o interior da célula bacteriana. Portanto, as reações de ligação foram transformadas em cepa de *E. coli* DH5 α termocompetentes, na qual incubava-se a bactéria por 30 min em banho de gelo, 1 min e 30 seg a 42°C em banho-maria e novamente em banho de gelo por 1 min. Meio Luria-Bertani (LB) foi adicionado as bactérias que, então, permaneceram crescendo a 200rpm por 1h a 37°C. As culturas foram plaqueadas em meio LB com 12g L⁻¹ de ágar, 100 μ g mL⁻¹ ampicilina (antibiótico de seleção do vetor) e 12 mg mL⁻¹ de X-gal

As placas permaneceram na estufa bacteriana a 37°C por cerca de 16 h e posteriormente armazenadas a 4°C.

Após crescimento, o clone recombinante foi identificado em meio seletivo contendo X-gal. O vetor pGEM T-*easy* possui os promotores de T7 e SP6 RNA polimerase que flanqueiam a região do *poly-linker* dentro da região codificadora para a β -galactosidase. Quando o fragmento ou inserto de interesse é ligado, há interrupção na região codificadora da enzima, sendo assim, as bactérias recombinantes não são capazes de degradar o X-gal, um análogo da lactose, e a colônia permanece na coloração branca. As colônias, que por outro lado, que não possuem o inserto, são capazes de degradar o X-gal em galactose e 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol, resultando na coloração azul.

C. Seleção de clones por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram selecionadas 8 colônias brancas resistentes a ampicilina (possíveis clones positivos) da placa de cada uma dos genes e inoculadas em 5mL de meio LB 100 µg mL⁻¹ ampicilina para crescimento a 200 rpm durante 16 h a 37°C.

Uma alíquota de cada cultura foi adicionada a uma reação de PCR com reagentes do kit *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), contendo os oligonucleotídeos iniciadores do sítio de clonagem de pGEM T-*easy*, M13 sense e anti-sense. Os ciclos para a amplificação dos insertos compreenderam a desnaturação do DNA durante 5min a 94°C; 35 ciclos constituídos de: desnaturação durante 30 seg a 94 °C, anelamento durante 30 seg a 55°C e extensão durante 2 min (1seg para cada base) a 72°C; e um *hold* para extensão final de 7 min a 72°C. A reação foi interrompida pelo resfriamento a 4°C. A confirmação dos clones contendo o fragmento de tamanho esperado ocorreu pela aplicação de uma alíquota dos produtos em gel 1% agarose e, posteriormente, visualizados em luz ultravioleta.

As culturas dos clones positivos, contendo os fragmentos de tamanho esperado, foram centrifugados a 6800g durante 3min e os precipitados submetidos às purificações plasmidiais do kit *QIAprep® Quiagen*, para posterior sequenciamento.

D. Confirmação de clones por sequenciamento

Levando em conta os tamanhos de algumas construções, como GT-f e FERM-f, serem superiores a 500 pares de bases, a probabilidade de haver mutações, deleções e inserções são altas, portanto, foram realizados os sequenciamentos dos clones de todas as construções pelo método automatizado adaptado ao de Sanger (1975).

Assim, a fim de verificar possíveis mutações, deleções ou inserções de bases, as reações contendo os clones foram sequenciados em equipamento 3130 XL (Applied Biosystems), utilizando os iniciadores do vetor, nesse caso, M13 sense ou anti-sense.

O método enzimático é baseado na atividade natural de polimerização de nucleotídeos pela DNA polimerase, capaz de estender a cadeia através adição de nucleotídeos complementares a uma fita-molde, a terminação da cadeia consiste pela adição de didesoxirribonucleotídeos (ddNTPs). Os ddNTPs são análogos aos nucleotídeos, pois possuem um hidrogênio (H) na extremidade 3' no lugar da hidroxila (OH), e, assim,

nenhum outro nucleotídeo poderá se ligar através da ligação fosfodiéster. Este processo resulta na terminação da sequência de nucleotídeos (SPEED, 1992).

Para que a reação ocorra, o DNA plasmidial é desnaturado em fitas simples para que os iniciadores do vetor, M13 sense ou anti-sense, possam anelar a fita molde. Tanto os iniciadores como os nucleotídeos são marcados por fluorescência para serem detectados em gel. Após o anelamento do iniciador a fita de DNA são adicionados os quatro dNTPs e os quatro ddNTPs, marcados com diferentes cores em tubos separados; à medida que os ddNTPs são incorporados, diferentes tamanhos de fragmentos são sintetizados, sempre terminados com o mesmo ddNTP. A seguir, o DNA produzido em cada tubo é desnaturado e aplicado em gel de poliacrilamida a fim de separar os fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, podendo ser visualizados em diferentes comprimentos de onda pelo sequenciador. Os resultados são gerados na forma de um cromatograma para cada reação, onde cada nucleotídeo é representado de diferentes cores.

2.6 Clonagem em vetores de expressão pET28a e pET28aSUMO

A. Digestão dos insertos de pGEM T-*easy*

Os clones de cada construção, confirmados por sequenciamento, foram submetidos à reação de digestão do vetor pGEM T-*easy* utilizando as enzimas *FastDigest*® (Fermentas), correspondentes aos sítios de restrição presentes na sequência de cada gene.

Os fragmentos foram desenhados de forma a conter os sítios de restrição de *NdeI* e *XhoI* para clonagem em pET28a, um vetor cuja expressão funciona sob o controle da transcrição da T7 RNA polimerase de bacteriófago e IPTG ou lactose sendo os indutores preferenciais para a indução da proteína alvo. O vetor possui uma fusão de seis histidinas (6xhis) na região N-terminal e C-terminal. Nos experimentos aqui descritos, foram utilizados somente a fusão no N-terminal.

Para a clonagem em pET28aSUMO, os fragmentos continham, o sítio de *BamHI*. Este vetor possui uma fusão SUMO, uma espécie de ubiquitina, envolvida na estabilização de proteínas *in vivo*, e conseqüentemente, na melhora da solubilidade. A fusão do SUMO está localizada na região N-terminal do *polilinker* e, posteriormente, pode ser clivada pela protease ULP.

Diferente do pGEM T-*easy*, os vetores de expressão não são linearizados necessitando de digestão com as mesmas enzimas de restrição utilizadas na digestão dos insertos.

A reação foi preparada a partir do protocolo do fabricante, seguido de incubação durante 2 h a 37°C. Para verificação e extração, os insertos de tamanho esperado foram aplicados em gel de 1% agarose para posterior extração, utilizando o *QIAquick Gel Extraction Kit*® Qiagen.

B. Reação de ligação dos insertos em pET28a e pET28aSUMO

Os insertos e vetores extraídos foram dosados. Para a reação de ligação foi utilizada a enzima *T4 Ligase*® (Fermentas), de acordo com as instruções do fabricante, na proporção de 1:3 (vetor: inserto), permanecendo durante 16 h a 4°C.

C. Transformação da reação de ligação em cepa de *E. coli* DH5α

Todo o volume das reações foi transformado em DH5α competente através de choque térmico, como já descrito anteriormente, plaqueado em LB contendo 12 g L⁻¹ de ágar e 50 µg ml⁻¹ de canamicina e estas incubadas em estufa bacteriana durante 18 h a 37°C, para crescimento.

D. Seleção de clones por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Em teoria, clones contendo vetores cujo inserto foi ligado, são resistentes a canamicina, já que a sequência codificadora da resistência é reconstituída com a entrada do fragmento de interesse, caso contrário, clones sem inserto, não reconstituem o gene de resistência e, portanto, não cresceriam em meio contendo canamicina. Por outro lado, além do inserto, outros fragmentos de DNA, principalmente da própria bactéria, podem ser incorporadas ao vetor e reconstituírem o gene de resistência; conseqüentemente crescem na placa, gerando clones negativos. Por essa razão se faz necessária a confirmação por PCR.

Oito colônias (clones) de cada construção foram selecionados e inoculadas em 5 mL de LB contendo 50 µg mL⁻¹ canamicina, para crescimento a 200 rpm durante 16 h a 37°C. A PCR foi montada, como já descrito anteriormente, utilizando os iniciadores do sítio de clonagem dos vetores em uso, T7 sense e anti-sense, com a finalidade de pré-selecionar os

clones que contém os insertos com tamanho esperado. O produto da reação foi aplicado em gel de 1% agarose para a visualização.

O volume das culturas dos clones positivos foram centrifugados e os precipitados submetidos às purificações plasmidiais do kit *QIAprep® Quiagen*, para envio das amostras ao sequenciamento.

E. Confirmação de clones por sequenciamento

Selecionados os clones positivos, novamente, estes foram submetidos à confirmação da sequência de nucleotídeos, a fim de verificar possíveis deleções, mutações ou inserções de bases, assim como se procedeu na clonagem em pGEM T-*easy*, porém utilizaram-se os iniciadores correspondentes aos sítios de clonagem dos vetores pET28a e pET28aSUMO (T7 sense ou anti-sense).

Os clones de cada construção, após a confirmação por sequenciamento, foram transformados em diferentes cepas de expressão.

3. Expressão de proteínas recombinantes

3.1 Testes de expressão

Com a finalidade de estabelecer um protocolo de expressão para cada construção, de maneira a obter as proteínas na fração solúvel e em quantidades razoáveis, foram realizados testes de expressão, variando condições tais como: cepa bacteriana, meio de cultura, concentração de indutor, tempo e temperatura de expressão.

A. Cepas

A escolha das cepas de *E.coli* utilizadas baseou-se nas possíveis características que a proteína expressa pudesse apresentar, de maneira a melhorar a sua expressão. No laboratório temos as seguintes cepas disponíveis: BL21(DE3) Δ SlyD pRARE (Novagen), SHuffle T7 (BioLabs), Origami 2 (DE3) (Noavegen), Artic Express (DE3) (Agilent Technologies). A maioria das cepas eram eletrocompetentes, portanto foram transformadas

com a adição de plasmídio (~60ng) a bactéria em eletroporador *GenePulser XCell* (BioRad).

A eletroporação é um método bastante eficiente, o qual consiste na preparação das células com solução aquosa, a fim de torná-las competentes e aptas a receberem o DNA. As células são submetidas à alta voltagem, provocando a desestabilização da membrana externa e a formação de poros, possibilitando a entrada do DNA para o interior da célula.

As pré-culturas de cada cepa, para o teste de expressão, foram crescidas a 200rpm, durante 16 h, a 37°C.

B. Meio de cultura

Ao meio Luria-Bertani (LB) foram adicionadas diferentes concentrações de IPTG para a expressão de *E. coli*. Além do LB, o meio complexo ZYP-5052 (0,5% extrato de levedura, 1% N-Z-amina, 50 mM Na₂HPO₄, 50 mM KH₂PO₄, 25 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,2x metais, 0,5% glicerol, 0,05% glicose, 0,2% α -lactose) de auto-indução, descrito por Studier (2005), também foi testado, sendo a lactose utilizada como molécula indutora. O meio de auto-indução com 100 mM de fosfato de sódio, a partir da lactose, induz a expressão da proteína após o consumo da glicose (fase *lag*). As soluções estoque de cada reagente, tais como, fosfato, glicose, sulfato de magnésio e mistura de metais, foram autoclavadas ou filtradas em filtros de 0,22 μ m.

Os testes para ambos os meios de cultura foram realizados em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio, quais eram inoculados 1% (v/v) de pré-cultura. Para o meio complexo de auto-indução, as pré-culturas foram preparadas em LB.

C. Concentração do indutor

O IPTG foi testado em concentrações de 0,1 mM a 0,5 mM. Após a cultura atingir determinada turbidez a 600 nm, o indutor foi adicionado. O IPTG foi utilizado, somente, em meio LB.

Outro indutor testado foi a lactose, em concentração de 0,2% (v/v) e, somente, no meio complexo de auto-indução. A α -lactose é adicionada no preparo do meio, não sendo necessária a verificação da turbidez.

A lactose, por ação da β -galactosidase, é convertida em alolactose; esta leva a liberação do repressor *lac* do sítio de ligação no DNA e induzirá a expressão de T7 RNA polimerase do promotor *lacUV5*, desbloqueando o promotor *T7lac*. Esse mecanismo permitirá a expressão das proteínas alvo pela T7 RNA polimerase. Portanto a utilização do meio de autoindução, muitas vezes, pode resultar em maior rendimento de proteína expressa, uma vez que as células bacterianas passarão a expressar somente após crescimento máximo, quando cessa a glicose (STUDIER, 2005).

D. Tempo e temperaturas

A cada condição testada foram coletados 10 mL de cultura, imediatamente após o inóculo das bactérias, como controle (não induzido). Esse volume foi centrifugado a 3220 xg, durante 20 min a 4°C; o sobrenadante e precipitado foram congelados a -20°C.

Foram realizadas posteriores coletas ao longo da indução em tempos de 2, 4, 6 e 18 h.

Tabela 2. Condições testadas em expressão analítica dos domínios alvo, incluindo cepa, meio, indutor, temperatura e densidade ótica (D.O.) para cada construção.

Vetor	Construção	Cepa	Meio	Indutor	Temperatura (°C)	D.O.
pET28a		BL21 DE3 ΔSlyD pRARE,	LB	IPTG: 0,5 mM	12, 37→20, 37→30,	0,5
	GT-f	BL21 DE3 ΔSlyD pRARE, Origami	LB, auto- indução	IPTG: 0,1; 0,3; 0,5; 1mM Lactose: 0,2%	30→25; 37	0,4
	GLOB_1	BL21 DE3 ΔSlyD pRARE, Origami, Artic Express	LB	IPTG: 0,2; 0,25; 1mM	12, 20, 30, 37	0,6
	GLOB_2	BL21 DE3 ΔSlyD pRARE, Origami, Artic Express	LB	IPTG: 0,2	12, 20, 30, 37	0,6
	FERM-f	BL21 DE3 ΔSlyD pRARE, Origami, Artic Express	LB	IPTG: 0,25; 0,2; 0,5	12, 20, 30, 37	0,6
pET28aSUMO	GLOB-1	-	-	-	-	-
	GLOB-2	Origami, Shuffle	LB, auto- indução	IPTG: 0,3; 0,4 Lactose: 0,2%	12, 20, 30, 37	0,4; 0,6
	FERM-f	Artic Express Shuffle	LB	IPTG: 0,3; 0,5	12, 30	0,4; 0,6

E. Lise celular

Ao término da expressão, todos os precipitados celulares estocados foram suspensos em solução de lise (250µL de 1x PBS, 170µL B-PER [ThermoScientific], 5 mM benzamidina, 1 mM PMSF).

As amostras foram incubadas, sob agitação, durante 10 min, a temperatura ambiente e, posteriormente, submetidas à sonicação. O lisado foi centrifugado a 20817 xg durante 20 min, a 4°C; o sobrenadante foi separado e o precipitado, suspenso em PBS pH 7,4.

F. Verificação por SDS-PAGE

Alíquotas das amostras de precipitados e sobrenadantes foram aplicados em gel desnaturante poliacrilamida SDS-PAGE 13% (LAEMMLI, 1970) em cuba de eletroforese, a fim de verificar a expressão das proteínas alvo na fração solúvel ou insolúvel. O gel foi corado com *Coomassie Blue*.

3.2 Expressão em larga escala

Determinadas as melhores condições para cada construção (descritas no capítulo IV), a expressão foi realizada em volumes de 1 L e, somente, após a confirmação da eficiência do protocolo, em volumes maiores (3 a 4 L). Ao término da expressão, centrifugou-se a cultura a 8230 xg, durante 15 min. O extrato bacteriano foi estocado a -20°C.

3.3 Lise celular

O extrato bacteriano foi submetido à lise celular utilizando, para cada 1 L de expressão, 20 mL de solução de lise para suspensão. As soluções para cada proteína estão descritas nas tabelas 5, 7 e 8, apresentadas no capítulo IV. O extrato permaneceu incubado, sob agitação moderada, durante 30 min, a 4°C.

Após a fragilização da parede bacteriana pelo uso de lisozima, o extrato bacteriano foi lisado por French[®]Press (Thermo Spectronic) a 25000 psi, em célula de 40 K, para rompimento efetivo e liberação do material citoplasmático. Seguiu-se com a centrifugação a 30000 xg, durante 1 h, a 4°C.

4. Cromatografia líquida

4.1 Afinidade a metal imobilizado (IMAC)

A cromatografia por afinidade, em geral, sendo um método seletivo e reversível, é capaz de ligar proteínas em uma matriz, baseando-se em afinidades biológicas conhecidas entre as moléculas; essa interação varia de acordo com as características estruturais das moléculas. Para tanto, o ligante deve ser imobilizado em matriz sólida de maneira a preservar sua estabilidade e atividade. Para este projeto foi utilizada a cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC), sendo níquel o metal divalente. A afinidade pelo metal imobilizado se dá pela cadeia lateral de alguns aminoácidos. O resíduo que possui maior afinidade ao níquel é a histidina, capaz de coordenar interações com o íon metálico, portanto utiliza-se uma fusão com seis histidinas (6xhis), que pode estar localizada na porção N-terminal ou C-terminal da proteína alvo. A presença de uma fusão garante maior afinidade e eficácia na separação. Para que a proteína seja expressa com a fusão 6xhis foi utilizado o vetor pET28a e pET28aSUMO que possuem a sequência de codificação para os resíduos de histidina anterior ao sítio de clonagem com *NdeI*, no *poly-linker*.

Desta maneira, com o extrato bruto livre de suspensões, este foi injetado com fluxo de 1 mL min⁻¹ em coluna *HiTrap Chelating*® 5 mL ou 1 mL (GE), carregada com 50 mM sulfato de níquel e acoplada a um sistema *Fast Performance Liquid Chromatography* (FPLC) *Äkta*® (GE). A coluna foi pré-equilibrada com solução tampão (mesma solução de lise, conferir no capítulo IV, tabelas 5, 7 e 8), seguido da eluição da proteína de interesse com fluxo de 1 mL min⁻¹ em solução tampão com 500 mM imidazol e com monitoramento da absorbância a 280 nm. As frações de toda a purificação (exceto *flowthrough* e lavagem da coluna) foram coletadas.

Alíquotas de cada fração foram aplicadas em gel SDS-PAGE 13% e, após eletroforese, corado com *Coomassie Blue*, a fim de identificar as frações correspondentes à proteína alvo.

4.2 Exclusão molecular (SEC)

Com a finalidade de obter uma amostra pura e livre de moléculas agregadas que possam prejudicar experimentos posteriores, foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular (SEC).

Esta técnica se baseia na separação das moléculas pelo seu tamanho. A matriz de agarose ou dextrana empacotada em coluna permite que as moléculas permeiem por seus poros de tamanhos variáveis. Esses poros permitem que a fase móvel (solução tampão) se desloque tanto pelo interior como exterior da coluna. O tempo de eluição depende da capacidade da proteína de atravessar os poros, e moléculas maiores do que os grânulos passarão exteriormente a matriz, sendo estas eluídas no volume morto da coluna (V_0), o qual geralmente corresponde às proteínas grandes ou agregados de proteínas. A exclusão molecular é usualmente utilizada em passos finais de purificação, a fim de remover impurezas remanescentes de etapas anteriores (CUTLER, 2004).

A amostra proveniente da cromatografia por afinidade foi concentrada para um volume final de 2 mL, centrifugada a 20817 xg e aplicada com fluxo de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, na coluna *HiLoad Superdex 75® 16/60* (GE) acoplada ao sistema FPLC e monitorada a eluição a 280 nm. As soluções utilizadas para cada uma das proteínas estão descritas no capítulo IV - tabelas 5, 7 e 8.

O grau de pureza das proteínas foi verificado por SDS-PAGE 13% e coloração com *Coomassie Blue*.

5. Dosagem das amostras

A amostra concentrada, proveniente da cromatografia de exclusão molecular, foi incubada com guanidina e dosada em pela leitura da absorbância a 280 nm. A partir dos valores dos coeficientes de extinção molar (ϵ) obtidos através do servidor ProtParam (<http://ca.expasy.org>) e dos valores da absorbância a 280 nm, foi possível a determinação da concentração molar das proteínas, pela equação de Beer-Lambert (2):

$$A_{280} = \epsilon \cdot L \cdot C \quad (2)$$

Onde A_{280} corresponde a absorvância medida a 280 nm, L, ao caminho ótico da cubeta em centímetros (cm), C, a concentração molar ($\text{mg mL}^{-1} \text{ Da}^{-1}$) e ϵ , o coeficiente de extinção molar em 280nm ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

6. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Também chamada de espectroscopia de correlação de fótons, o espalhamento dinâmico de luz é uma técnica capaz de medir o coeficiente de difusão translacional do movimento browniano em solução de uma molécula, através do espalhamento de luz monocromática (SCHIMTZ, 1990).

Essa técnica forneceu dados fundamentais para seguir com as etapas posteriores, como a determinação da qualidade da amostra, avaliando a polidispersividade da amostra e raio hidrodinâmico (R_h). Tais parâmetros são extrapolados a partir do coeficiente de difusão translacional, usando a equação de Stokes-Einstein.

Para tanto, as amostras foram centrifugadas a 20000 xg durante 10 min, a 4°C. Foram utilizadas cubetas de safira de 3 mm de caminho ótico em equipamento *DynaPro* 810 DLS (Wyatt Technology Corporation) com controlador de temperatura *peltier*. As medidas foram realizadas em ângulo de 90°C de detecção, a 18°C, onde foram feitas 50 medidas com 5 seg de aquisição e intervalo de 1 seg, utilizando o software DYNAMICS v.6.10.1.2.

7. Dicroísmo Circular (CD)

7.1 Espectro

A obtenção de proteínas recombinantes é de grande valia quando sua função biológica é mantida. Dessa maneira, estudos de dicroísmo circular foram significativos para avaliação da estrutura secundária das proteínas alvo. Sabe-se que o enovelamento correto das proteínas garante a manutenção de sua atividade, mostrando que função e estrutura estão fortemente relacionadas. A luz circular polarizada emitida sobre a amostra pode resultar em diferentes absorções de suas componentes direita e esquerda; a radiação gerada possui uma polarização elíptica, a qual é detectada e convertida em sinal de dicroísmo. Este, por sua vez, será observado quando o cromóforo for um centro quiral (ópticamente

ativo). Os cromóforos de interesse em proteínas incluem ligação peptídica (240 nm) e pontes dissulfeto (260 nm) (KELLY e PRICE, 2000; KELLY *et al.*, 2005).

O experimento de dicroísmo circular (CD) para a determinação do conteúdo de estrutura secundária realizou-se em ultravioleta distante (195-260 nm), em espectropolarímetro *Jasco J-810 Spectropolarimeter* (Jasco International Co.) acoplado ao controlador de temperatura *peltier* e com cubeta de quartzo de 2 mm caminho ótico. Cada uma das amostras, incluindo os padrões, foram diluídos em água, para uma concentração final de 3 μM (em solução descrita nas tabelas 5, 7 e 8, do capítulo IV) e centrifugados a 20000 $\times g$ durante 10 min. A diluição das amostras em água milli-Q teve como finalidade diminuir a concentração de sais da amostra para diminuição do sinal ruído nas leituras. A coleta de dados foi realizada a uma velocidade de varredura de 50 nm min^{-1} , resposta de 4 seg, sensibilidade de 100 mdeg, largura da banda de 1 nm e 20 acumulações. Os resultados foram analisados pelo software *SpectraManagerII*, sendo expressos em elipcidade residual média ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1} \text{residual}^{-1}$).

7.2 Desnaturação térmica

A estabilidade das proteínas está relacionada à energia livre de Gibbs de desenovelamento (ΔG_u), a qual diminui com o aumento da temperatura até tornar-se zero no equilíbrio, quando as concentrações de moléculas enoveladas e desenoveladas são iguais; esta temperatura é a chamada temperatura de transição/*melting* (T_m) (PRIVALOV, 1979; SCHELLMAN, 1997; VEDADI *et al.*, 2006).

Como na sessão anterior, a diluição foi, também, realizada em água, e, posteriormente, centrifugada. A desnaturação foi monitorada a 208 e 222 nm, de 20 a 100°C, com taxa de aquecimento de 1°C min^{-1} . Os mesmos parâmetros foram utilizados para 100 a 20°C, a fim de verificar possível renaturação proteica. Os resultados foram analisados pelo software *SpectraManagerII* e expressos em porcentagem de fração desenovelada.

8. Desnaturação térmica monitorada por fluorescência de sonda extrínseca (DSF)

Ensaio para o monitoramento da fluorescência pela adição de moléculas e ligantes, também conhecido como *thermal shift* ou *differential scanning fluorescence* (DSF), foram realizados para avaliar aumento ou diminuição na estabilidade das proteínas alvo.

A estabilidade de proteínas pela adição de ligantes e moléculas não específicas é muito importante, para auxiliar os experimentos de cristalização (ERICSSON *et al.*, 2006; VEDADI *et al.*, 2006).

Utilizou-se a sonda fluorescente *SYPRO® Orange*, a qual fluoresce ao ligar-se a porções proteicas hidrofóbicas expostas, quando tem início a desnaturação da molécula com o aumento da temperatura. Para tanto, utiliza-se um equipamento de PCR *real-time* (ERICSSON *et al.*, 2006; *et al.*, 2002; POKLAR *et al.*, 1997; VEDADI *et al.*, 2006).

Adicionou-se sais, metais, solventes orgânicos e diferentes pH as proteínas alvo. As amostras utilizadas em experimentos com cloreto de sódio foram diluídas em água, variando a concentração final de 0,005 M a 1 M do sal. Os demais ligantes foram diluídos no tampão da proteína, de modo a permanecer em concentração final de 10 mM. Em todas as reações, a concentração final de proteína e padrão foi de 2 µM e *SYPRO® Orange* (Invitrogen) 1:1000 (v/v). As amostras foram incubadas durante 30 min, a temperatura ambiente e centrifugadas. Os experimentos foram realizados em triplicata, em placas de 96 poços. A estabilidade foi avaliada de 20 a 90°C utilizando o termociclador 7500 *Realtime PCR System*.

O ponto de inflexão da curva de transição (T_m) é calculado utilizando a equação (3).

$$y = I_i + \frac{(I_p - I_i)}{1 + \exp((T_m - x)/a)} \quad (3)$$

Onde, I_i é a intensidade inicial, I_p a intensidade pos-transicional, a é a inclinação da reta na faixa de transição e x a temperatura (adaptado de ERICSSON *et al.*, 2006; NIESEN *et al.*, 2007).

9. Proteólise limitada

9.1 Teste de clivagem

Para a determinação do padrão de digestão de proteínas por digestão trípica, foram necessários testes de temperatura e tempo. Portanto, 1 mg mL^{-1} de amostra foi incubada em solução final de $10\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de tripsina, a temperatura ambiente e a 4°C , com tempos 15 min a 4 h.

A reação foi interrompida pela adição de 5 mM benzamidina a solução, em banho de gelo, durante 10 min. A eficácia da clivagem foi analisada por SDS-PAGE 13%, corado com *Coomassie Blue*.

9.2 Proteólise

Identificadas as condições ideais para clivagem da proteína alvo por tripsina, o volume total da amostra foi incubado em concentração final de $10\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de tripsina, durante 3 h, a 4°C . O bloqueio da reação se deu pela adição de 5 mM benzamidina, em banho de gelo, durante 10 min. A amostra digerida foi aplicada na coluna de cromatografia de exclusão molecular analítica, a fim de verificar a presença de um novo padrão de eluição da proteína digerida em comparação aquela não digerida.

10. Cromatografia analítica de exclusão molecular

A cromatografia por exclusão molecular analítica (aSEC) visou a estimativa do raio hidrodinâmico e o massa molecular de proteínas alvo, pela utilização da coluna *Superdex*® 200 GL 5/150 (GE) acoplada ao sistema Akta® Purifier. Moléculas padrões tais como Blue Dextran ($1\ \text{mg mL}^{-1}$), ferritina ($0,3\ \text{mg mL}^{-1}$), ribonuclease A, catalase, e ovalbumina (3mg mL^{-1}) foram preparados e diluídos no mesmo tampão da proteína para serem aplicados na coluna. A concentração de $0,3\ \text{mg mL}^{-1}$ de amostra foi aplicada com fluxo de $0,2\ \text{mL min}^{-1}$.

Após a corrida os parâmetros hidrodinâmicos foram calculados. Primeiramente, determinou-se o volume morto (V_0) da coluna, o qual equivale ao volume de eluição do Blue Dextran 2000. Devido ao alto massa molecular, o Blue Dextran passará externamente

aos poros da agarose. O volume geométrico (V_c) é um parâmetro que pode ser extraído pela equação (4).

$$V_c = \pi r^2 l \quad (4)$$

Onde r é o raio e l o comprimento da coluna.

A curva de calibração é calculada segundo a equação (5).

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0} \quad (5)$$

Onde, V_0 é o volume morto da coluna, V_e , o volume de eluição de cada um dos picos e V_c , o volume geométrico da coluna. O volume de eluição é calculado pelo volume de eluente do ponto de injeção até o centro do pico eluído. Após aplicar cada uma dos padrões e amostras foram calculados os K_{av} de cada amostra. Uma curva de calibração de K_{av} x log do massa molecular (M.M.) dos padrões é desenhada fornecendo a equação da reta, a partir da qual se extrai o massa molecular das proteínas de interesse.

Outro parâmetro importante a ser extraído para proteínas globulares é o raio hidrodinâmico, através da regressão linear do gráfico de $\sqrt{(-\log K_{av})}$ x raio hidrodinâmico (R_h) conhecidos dos padrões.

11. Espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS)

Os dados de SAXS foram coletados usando o detector *Pilatus* (300k, 84 mm x 107 mm) na linha de luz D01A/SAXS1 instalada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). O comprimento de onda da radiação foi ajustado para 1,55 Å e a distancia entre amostra e detector foi de 1594,6 mm resultando em vetor de espalhamento na faixa de 0,01 nm⁻¹ a 0,23 nm⁻¹ ($q = 4\pi\sin\theta/\lambda$, onde 2θ é o ângulo de espalhamento).

A amostra (solução descrita na tabela 8 do capítulo IV) foi testada nas concentrações de 2,5 e 1,5 mg mL⁻¹ e previamente centrifugadas a 20000 xg durante 30 min, a 4°C, para a remoção de agregados. As medidas foram feitas a temperatura ambiente, com exposição de

30, 60, 120 e 180 seg ao feixe de raios X. O tratamento dos dados foi feito em colaboração com a Dra. Tatiana Brasil, aluna de pós-doutorado do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio). A integração das curvas de SAXS foi feita no software Fit2D (HAMMERSLEY, 1997), o escalonamento feito a partir da concentração da amostra e a análise dos dados foram feitas pelo programa GNOM (SVERGUN, 1992). A construção dos envelopes de baixa resolução foram calculados a partir dos dados experimentais pelo método *ab initio* implementado no programa DAMMIN (SVERGUN, 1999). A média dos modelos foi gerada a partir de 10 envelopes do DAMMIN no programa DAMAVER (VOLKOV e SVERGUN, 2003). Os envelopes gerados por SAXS e os modelos *in silico* foram sobrepostos pelo programa SUBCOMP (KOZIN e SVERGUN, 2001) e para o cálculo da curva teórica de espalhamento dos modelos *in silico* foi utilizado o programa CRY SOL (SVERGUN *et al.*, 1995).

12. Ensaio de Cristalização

Os cristais consistem do arranjo tridimensional bem definido de moléculas; sua formação ocorre a partir de duas etapas principais: a nucleação e o crescimento, quando a supersaturação proteica é capaz de ultrapassar a barreira de energia de ativação. A barreira representa a energia livre requerida para criar pequenos aglomerados de proteínas, chamados de núcleos, e, partir daí, caso haja proteína disponível, poderão crescer de maneira ordenada para formar cristais. Caso a solução proteica não seja supersaturada, a taxa de nucleação será muito lenta e nenhum cristal se formará; por outro lado, uma solução proteica de concentração excessiva levará ao surgimento de estruturas desordenadas, tais como precipitados, óleos, géis e tende-se para a zona de precipitação, desfavorável para a formação de cristais (Figura 10) (ASHERIE, 2004; MCPHERSON, 1999).

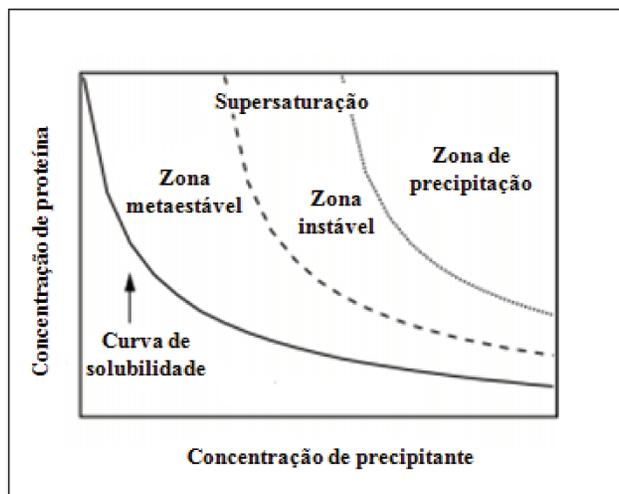


Figura 11. Diagrama de fases para a cristalização de proteínas. A formação de núcleos na zona instável ocorre quando é ultrapassada a barreira de energia da curva de solubilidade, com a amostra supersaturada e, após a nucleação, se desloca para a região metaestável, onde haverá o crescimento de cristais. Amostras muito concentradas ou em condições com alta concentração de precipitantes, levam a zona de precipitação, onde estruturas desordenadas são formadas (adaptado de Asherie, 2004).

Tendo esses conceitos em mente, as amostras foram dosadas e submetidas a gel SDS-PAGE 13% para avaliação do grau de pureza. Após a centrifugação a 20000 xg, durante 10 min, as amostras foram enviadas ao laboratório de cristalização ROBOLAB, nas instalações do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio). As gotas sentadas de 0,5 + 0,5 μ L de amostra/solução foram preparadas em *HoneyBee* 963 e as soluções das condições de cristalização, pelo robô *Matrix Maker*.

A elaboração dos testes iniciais, pelo método da matriz esparsa em gota sentada (*sitting drops*), utilizou os seis kits comerciais disponíveis, em placas de 96 poços:

- Kit 1: *Crystal Screen* e *Crystal Screen 2* (96 condições)- *Hampton Research*;
- Kit 2: *Wizard I* e *II* (96 condições) – *Emerald Biosystems*;
- Kit 3: *PACT* (96 condições) - *Nextal/ Quiagen*;
- Kit 4 *JCSG +* (96 condições) - *Nextal/ Quiagen*;
- Kit 5: *SaltRx* (96 condições) - *Hampton Research*;
- Kit 6: *Precipitant Synergy* (64 condições) – *Emerald Biosystems*.

Todas as placas foram estocadas em sala com temperatura controlada, a 18°C, monitorando a formação de cristais.

IV- Resultados e Discussão

1. Análises *in silico*

Foram encontrados cerca de onze genes pertencentes a oito diferentes classes de miosinas não-convencionais em banco de dados, sendo os alvos selecionados primeiramente com base na identidade a proteínas homólogas ou ortólogas já descritas e estudadas. Os domínios de interesse, consideraram regiões das miosinas de importância funcional e ainda pouco caracterizadas estruturalmente.

Após a sobreposição das predições, foi estabelecido um consenso entre quais regiões poderiam se encontrar desenoveladas, e representando possivelmente instabilidade a região alvo. Assume-se que proteínas com menor grau de desordem apresentem maior estabilidade, sendo essencial para os estudos estruturais.

1.1 Domínio quinase da Miosina III (Isoforma C)

O domínio quinase da miosina III de inseto é composto por cerca de 180 resíduos. Considerando o consenso da predição é determinada somente uma pequena região de desordem (figura 12A). A partir dessa informação, e por análises de sequência, foi construído um modelo atômico ilustrado na figura 10B, o que mostra a predominância de elementos hélices-alfa em sua estrutura secundária, corroborando com outras estruturas quinases descritas e disponíveis no *Protein Data Bank*. Para a modelagem utilizou-se a proteína serina/ treonina quinase humana (PDB ID: 2J7T) como modelo, cuja estrutura foi resolvida por cristalografia de raios X a 2 Å (PIKE *et al.*, 2008).

O alinhamento realizado pela ferramenta BLAST (NCBI) mostrou uma identidade de 40% entre as sequências da quinase humana e de inseto, com *e-value* = 2,3e-43 e *score* = 280,47; a identidade é alta; ambas possuem o conteúdo predominante de hélices-alfa.

Ambas são serina/ treonina quinases. Na quinase da miosina III humana os resíduos Ser177 e Tre183 são descritos como o domínio catalítico. Na sobreposição dessa estrutura ao modelo construído para a quinase de inseto, esses resíduos correspondem a Ser66 e T73, inseridos em uma mesma hélice. Por outro lado, o preditor de possíveis domínios

funcionais SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>), determina que os resíduos catalíticos são Asp130 e Arg132, localizados em um *loop* próximo a hélice descrita anteriormente. Sendo assim ela não poderia ser considerada uma serina/ treonina quinase. Estudos estruturais, portanto, são de grande importância para determinar os resíduos que realmente compõem o sítio ativo e possuem papel catalítico, além da classificação dessa domínio dentro das famílias das proteínas quinases.

As regiões preditas como desordenadas no modelo, para a quinase de inseto, localizam-se em regiões móveis (*loops*) e na extremidade C-terminal da sequência. Embora, somente uma porção móvel (resíduos de 163 a 171) tenha sido predita como desenovelada, a construção possui, também, no mínimo mais 5 regiões móveis, e possivelmente consiste de laços interfaciais do sítio ativo e considerados importantes para sua função quinase.

Considerando as predições de desordem e a modelagem molecular, para este alvo, foi selecionado o domínio quinase inteiro, cuja construção recebeu o nome de KIN-f.

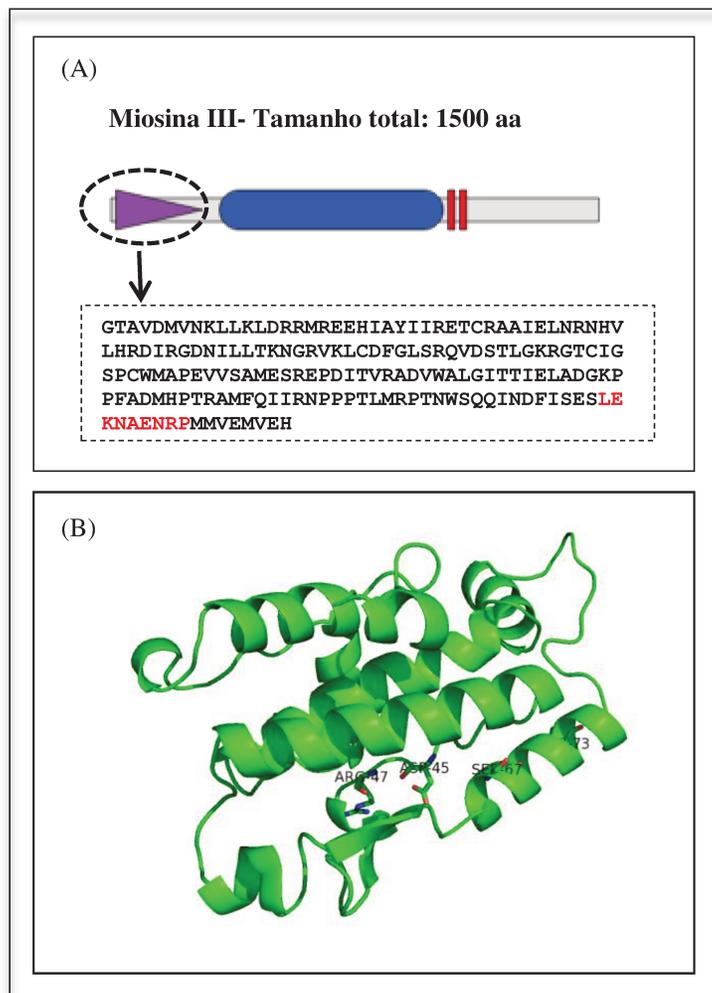


Figura 12. Análises *in silico* do domínio quinase da miosina III (KIN-f) de *D. melanogaster*. (A) localização do domínio na porção N-terminal da proteína, com cerca de 181 resíduos. Os resíduos marcados em vermelho correspondem ao consenso das regiões preditas como desordenadas; (B) modelagem molecular; modelo construído pelo servidor I-TASSER (ZHANG, 2008) a partir da molécula da serina/ treonina quinase humana (PDB 2J7T). As sequências possuem identidade de 40%. O modelo foi visualizado pelo programa PyMOL 1.5. Os resíduos em vermelhos correspondem àqueles desordenados e os resíduos marcados são aqueles correspondentes aos possíveis catalíticos.

1.2 Cauda globular da miosina V (Isoforma C)

A cauda globular possui cerca de 410 (1390-1801) resíduos de aminoácidos, com predominância de regiões ordenadas e algumas desordenadas na porção central do domínio (figura 13). Neste caso foi empregada, também, modelagem molecular para auxiliar na determinação de possíveis construções para o domínio (figura 14). Sua estrutura foi modelada a partir da cauda globular da miosina Va de *Saccharomyces cerevisiae* (Myo2p),

cuja estrutura foi resolvida por cristalografia de raios X a 2,25Å (PDB ID: 2F6H) por Pashkova e colaboradores (2006). Ambas as caudas apresentam estrutura de hélice-alfa, possuindo baixa identidade de 15%, *e-value* = 4e-70 e *score* = 241 (BLAST-NCBI). Apesar disso, todas a hélices do modelo gerado e do domínio da miosina de levedura quando sobrepostas, coincidem, variando somente o tamanho dos *loops*.

Há discrepância entre as regiões preditas desordenadas pelos servidores, e da mesma maneira que para o domínio quinase, há outras regiões móveis que não foram preditas. Portanto, para garantir o sucesso no estudo desse alvo, foram feitas 3 construções, levando em consideração o tamanho de sua sequência. As regiões N-terminal da Met1418 ao Asp1572 (GLOB_1) e C-terminal da Ala1603 a Gln1754 (GLOB_2), além da construção do domínio inteiro, que compreende da Met1418 ao Asp1794 (GT-f) (numeração em relação à miosina inteira) (figura 14).

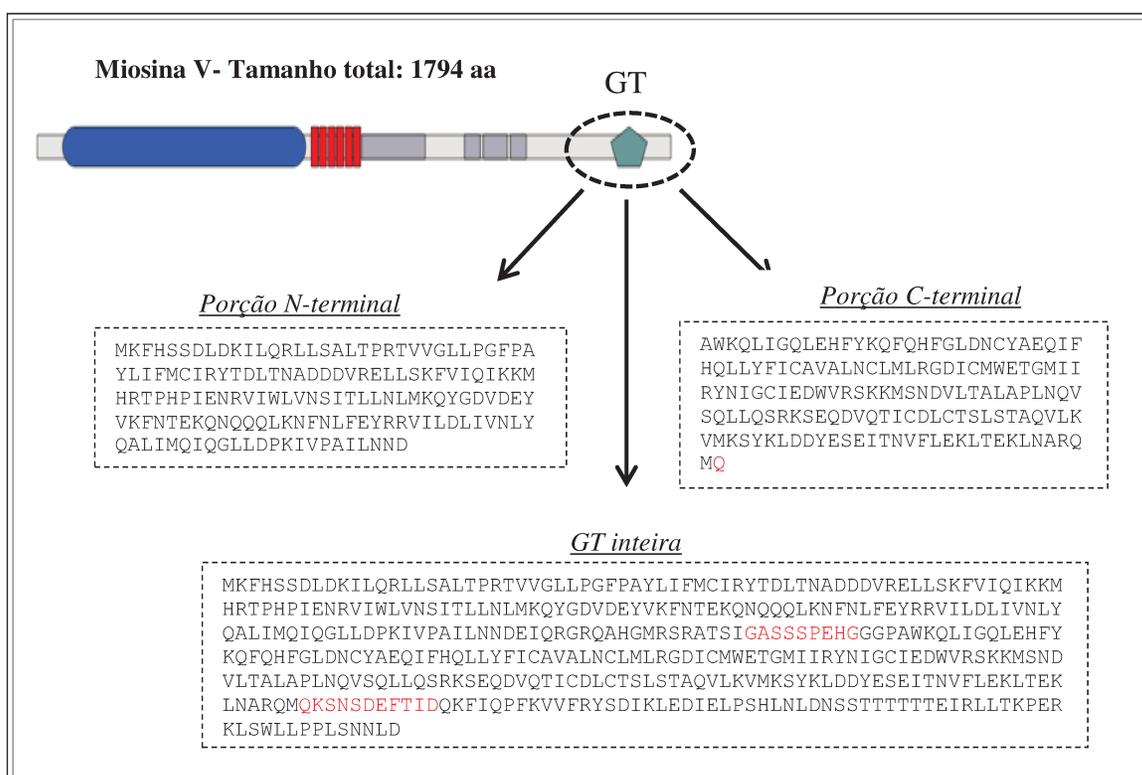


Figura 13. Consenso da predição de ordem/desordem da cauda globular da miosina V de *D. melanogaster*. A maior construção compreende a GT-f (resíduos 1390-1801) e as duas construções menores do GLOB_1 (1418-1572) e GLOB_2 (1603-1754) em relação à miosina inteira.

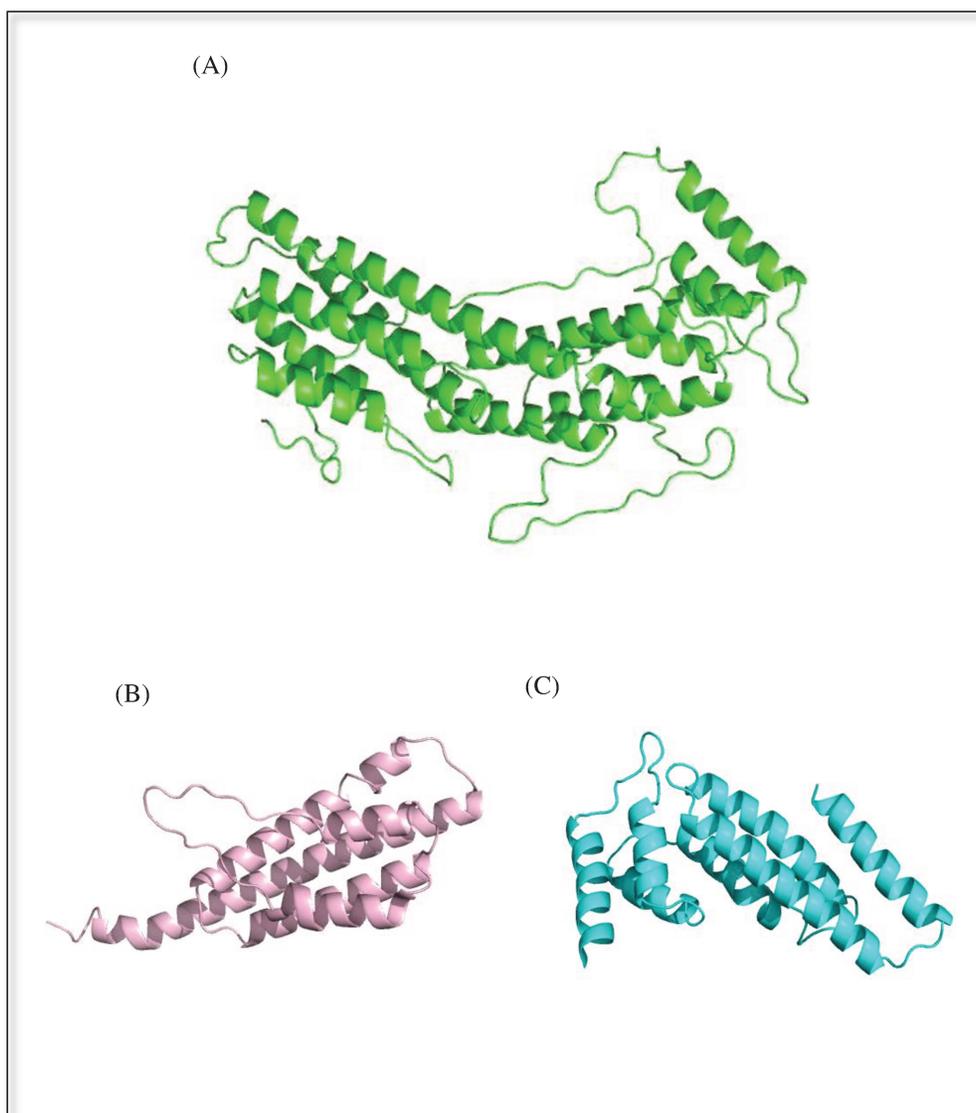


Figura 14. Construções desenhadas para o domínio cauda globular da miosina V de *D. melanogaster*. A modelagem molecular foi construída pelo servidor (ZHANG, 2008) e visualizadas em PyMOL 1.5. (A) GT-f (resíduos 1418-1794), (B) GLOB_1 (resíduos 1418-1572) e (C) porção GLOB_2 (resíduos 1603- 1754) da cauda globular. Os resíduos vermelhos são aqueles correspondentes a regiões preditas desordenadas pelos servidores.

1.3 Domínio FERM da miosina XV (Isoforma C)

O domínio FERM possui cerca de 220 resíduos (2725 - 2942), localizado no domínio cauda da miosina XV. Sua estrutura terciária foi modelada a partir do domínio FERM da cauda de miosina VIIa de camundongo (PDB ID: 3PVL), cuja estrutura foi resolvida por

cristalografia de raios X por Wu e colaboradores (2010), com resolução de 2,8 Å (figura 15B). As sequências possuem 16% de identidade somente, com *e-value* de 2.5e-37 e *score* de 269,69 (BLAST-NCBI), correspondendo a uma baixa identidade.

Há regiões de hélices-alfa e folhas-beta, compondo a estrutura secundária do modelo, que são característicos nos domínios FERM já descritos estruturalmente (PIKE *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2011).

Pelo consenso entre os preditores, não foi identificada nenhuma região de desordem (figura 14A) e, portanto, a construção para o domínio FERM (FERM-f) abrange todo o domínio (Ser2725 a Phe2942).

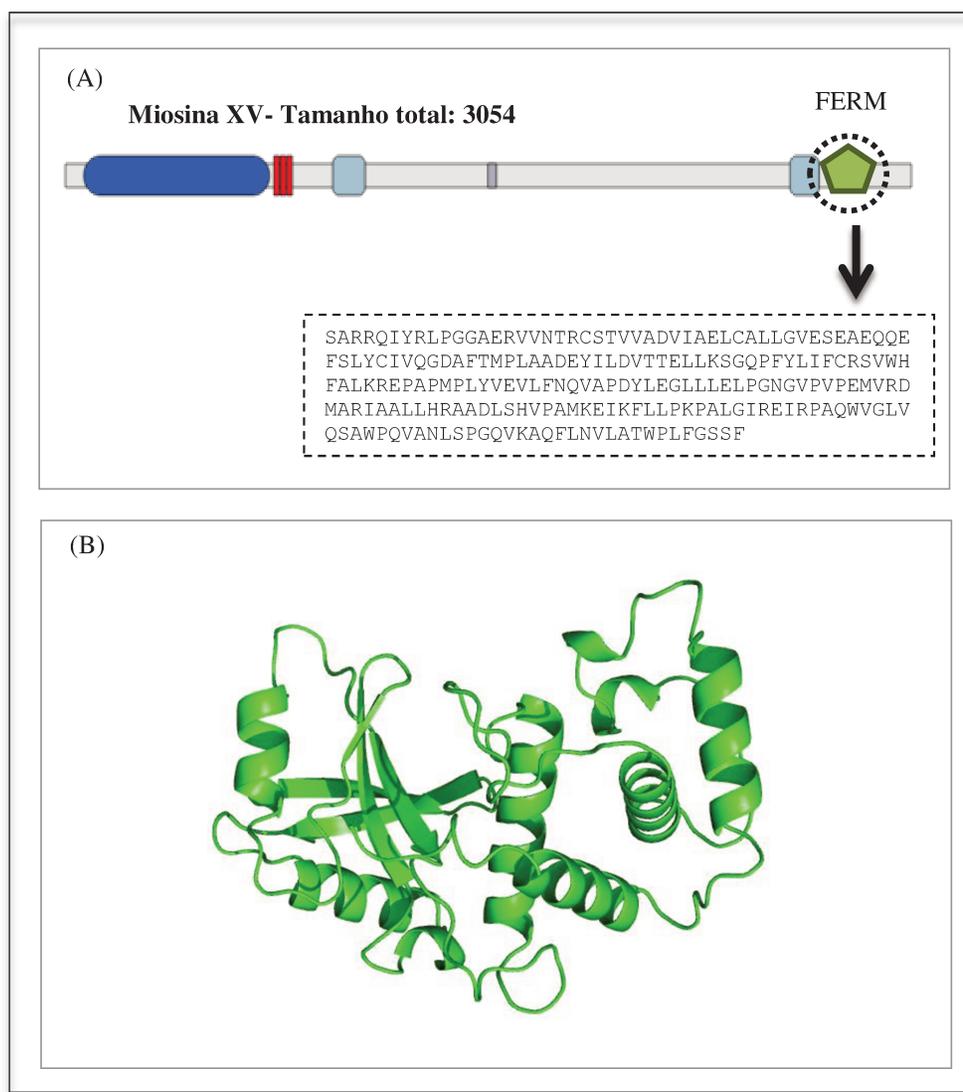


Figura 15. Análises *in silico* do domínio FERM (FERM-f) da miosina XV de *D. melanogaster*. (A) Não há regiões de desordem na estrutura. (B) Este domínio está localizado na porção distal da cauda e é constituído por hélices- alfa e folhas- beta sobrepostas. O I-TASSER utilizou o domínio FERM da miosina VIIa de camundongo (PDB: 3PVL) como modelo; as sequências possuem identidade de 16%. A visualização do modelo foi feita pelo programa PyMOL 1.5. A construção FERM-f abrange a Ser2725 a Phe2942.

2. Clonagem

O RNA extraído de amostras de *D. melanogaster* adulto e pulpa resultaram em 362,2 e 750,8 ng μL^{-1} , respectivamente, que foram suficientes para os experimentos de síntese de cDNA e amplificação dos genes pela PCR (figura 16).

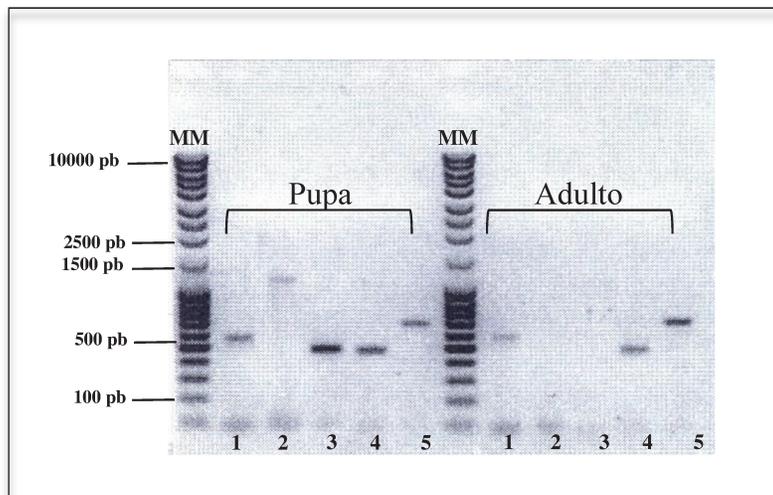


Figura 16. Amplicons de pupa e adulto a partir de cDNA total de *D. melanogaster* em gel de agarose a 1%. Fragmentos: 1- KIN-f; 2- GT-f; 3- GLOB_1; 4- GLOB_2; 5- B41-f. Todos os amplicons são correspondentes ao tamanho esperado em pares de base; MM: marcador molecular.

Após a extração em gel, foram medidas as concentrações de cada produto mostradas na tabela 3. As razões 260/280, não excederam o limite de 2,0 em geral, indicando que possivelmente não há contaminação de proteínas.

Tabela 3. Concentrações dos produtos de PCR extraídos de gel de agarose a 1%. Apesar da concentração razoável, as razões 260/280 não indica contaminação por proteínas.

Construção	PUPA				
	KIN-f	GT-f;	GLOB_1	GLOB_2	FERM
[ng μL^{-1}]	26,3	12,0	29,4	25,0	20,9
260/280	1,9	2,1	1,8	1,9	2,0

Levando em consideração onde houve maior sucesso de amplificação (figura 15), os genes de pupa foram utilizados para posteriores clonagens em vetores de clonagem e expressão. A validação da ligação dos insertos em vetor pGEM T-*easy*, foi verificada pela PCR dos clones, de coloração branca, crescidas em placa.

Com exceção da GT-f, todos os genes referentes às construções foram amplificados em pelo menos um dos clones testados (figura 17). Com GT-f, posteriormente, foi feita

uma nova reação de ligação, transformação em DH5 α e verificação dos clones, sendo que apenas um deles apresentava o inserto.

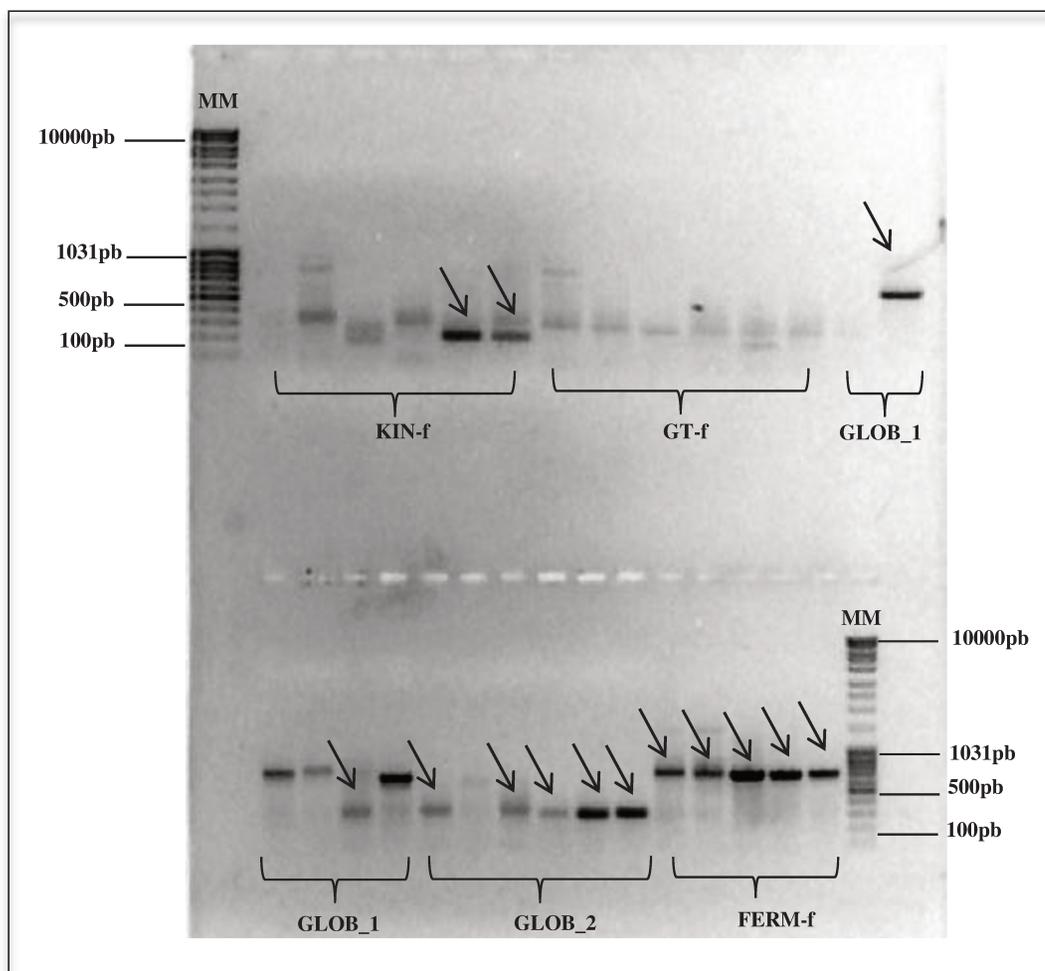


Figura 17. Confirmação dos clones de cada construção por PCR em gel de agarose a 1%. Os clones correspondem às construções KIN-f, GT-f, GLOB_1, GLOB_2 e FERM-f e apenas alguns deles possuem o fragmento com o tamanho esperado (indicados pelas setas), exceto para GT-f onde nenhum dos clones contém o fragmento.

Em torno de 3 clones de cada construção foram submetidos a sequenciamento, sendo que vários apresentaram, mutação ou inserção de nucleotídeos e foram, então, descartados. Todas as construções referentes à construção KIN-f apresentaram mutação. Somente aqueles que não apresentaram nenhum tipo de modificação foram utilizados na clonagem em vetores de expressão.

Após a digestão do vetor de clonagem, os insertos mantiveram, em média, as mesmas concentrações iniciais e foram ligados em vetores de expressão pET28a e pET28aSUMO.

A princípio, a maioria das confirmações dos clones crescidos em placa por PCR obtiveram resultado negativo. Sendo assim, cerca de três clones de cada construção, de cada vetor de expressão, foram submetidos diretamente ao sequenciamento para confirmação de possíveis mutações. Pelo menos um clone de cada construção foi confirmado em pET28a e pET28aSUMO.

3. Teste de expressão de proteínas recombinantes

Após exaustivos testes de expressão, as construções GLOB_2 (pET28aSUMO), GT-f e FERM-f (pET28a) foram obtidas fração solúvel (tabela 4 e figura 18).

Tabela 4. Condições de expressão para obtenção de alvos solúveis. A cepa Origami foi aderida como padrão para estas proteínas, enquanto meio, temperatura, tempo e indutor foram variáveis, resultando em proteínas expressas cujos parâmetros foram calculado pelo ProtParam.

Construção	Cepa	Meio	Temperatura (°C)	IPTG (mM)	Tempo (h)	Massa molecular (M.M.) (kDa)	Ponto isoelétrico (p.I.)
GLOB_2 com fusão de SUMO	Origami	Autoindução	20	-	48h	31,7	6,0
GT-f com fusão de 6xhis	Origami	Autoindução	37	-	6h	45,9	7,2
FERM-f com fusão de 6xhis	Origami	LB	37→20	0,3	16h	26,3	6,3

No gel desnaturante SDS-PAGE 13% foi possível verificar a alta expressão dos alvos, tanto na fração solúvel como insolúvel (figura 18).

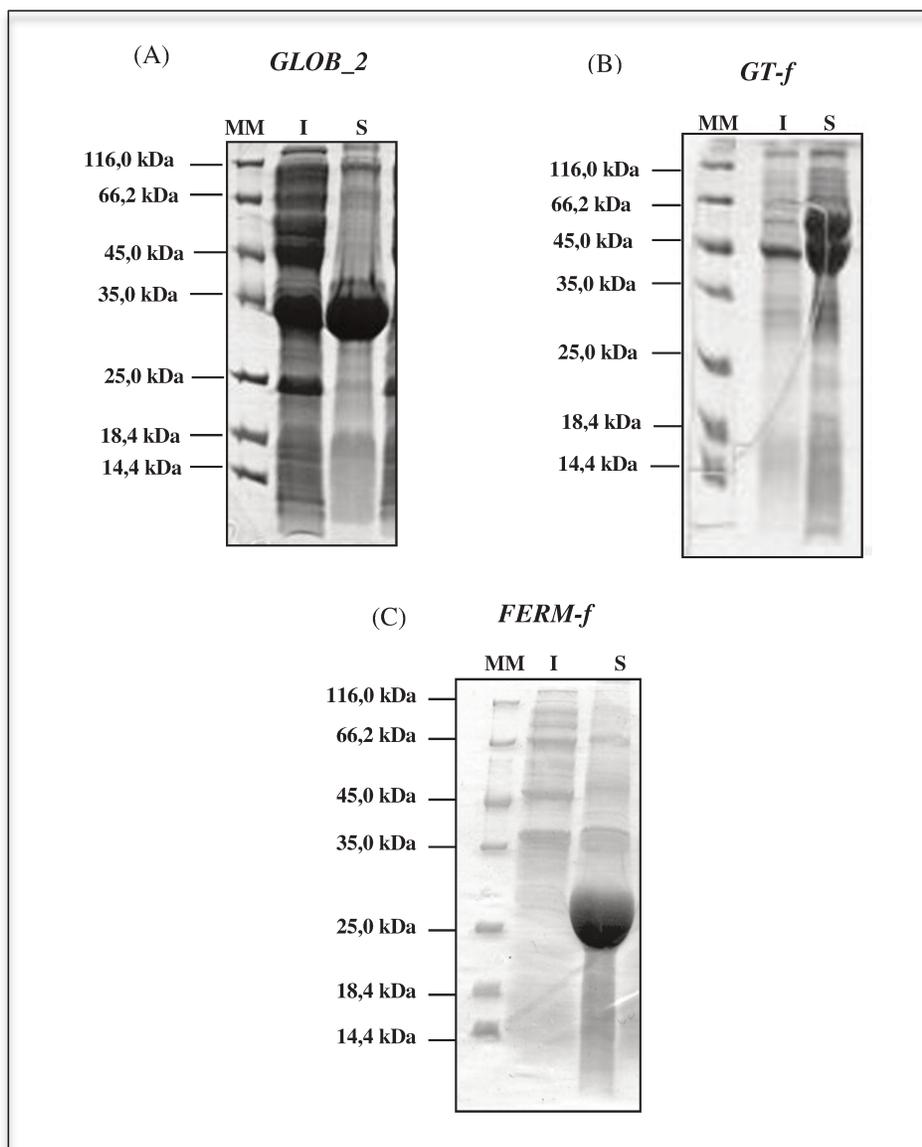


Figura 18. SDS-PAGE a 13% de testes de expressão positivos. S e I correspondem a fração solúvel e insolúvel, respectivamente, das construções (A) *GLOB_2* em pET28aSUMO com cerca de 31 kDa; (B) *GT-f* em pET28a com cerca de 45 kDa ; (C) *FERM-f* em pET28a com cerca de 26 kDa.

Em estudos estruturais prévios, realizados por Pashkova e colaboradores (2006), utiliza-se o sistema de expressão em *E. coli*, assim como foi utilizado no presente trabalho. A cepa BL21 (DE3) pLysS foi capaz de expressar a miosina Va da levedura com fusão a GST; porém BL21 (DE3) pLysS não estava disponível nas instalações do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio- CNPEM) e portanto utilizou-se para *GLOB_2* e *GT-f*, a

cepa Origami, uma vez que outras cepas testadas não foram capazes de expressar a proteína solúvel em nenhuma condição.

A cepa Origami possui os genes da tioredoxina redutase (*TrxB*) e glutathione redutase (*gor*), que favorecem a formação de pontes dissulfeto no citoplasma; é recomendada para proteínas com alto conteúdo de cisteínas. Considerando o fato de que GLOB_2 possui 1% (5) e GT-f, 2% (8) de cisteínas, o citoplasma oxidativo é de grande valia. Caso essas construções formem pontes dissulfeto de maneira incorreta durante a expressão, acarreta-se na agregação da proteína, que passará a ser expressa em corpos de inclusão (fração insolúvel). A fusão de 6xhis, gerou resultados satisfatórios quanto a solubilidade e rendimento de proteínas, como pode ser visto na figura 18.

O mesmo ocorreu para FERM, que possui 5% de cisteínas em sua composição, e, portanto, qualquer outra cepa desprovida de mecanismos para auxiliar o enovelamento proteico apresentaria alta probabilidade de expressão insolúvel; isso foi comprovado pelos testes de expressão. Apesar de não descrever a cepa utilizada, Wu e colaboradores (2011), responsáveis pelos estudos do domínio FERM de miosina VIIa de camundongo, utilizou o sistema de expressão bacteriano.

Tais resultados mostraram adequados para serem levados para larga escala.

4. FERM-f (Miosina XV)

4.1 Expressão em larga escala e lise celular

Tendo em vista a factibilidade da expressão de domínios FERM-MyTH4 de miosinas em *E. coli*, a expressão bacteriana tornou-se uma estratégia bastante atrativa e passível da obtenção de grandes quantidades de proteínas (HIRANO *et al.*, 2011a; HIRANO *et al.*, 2011b; WU *et al.*, 2011). Assim, para a construção FERM-f, clonada com fusão de 6xhis, foi utilizada a cepa Origami, expressa em 500 mL de cultura, em erlenmeyers de 2 L. As células foram solubilizadas em solução de lise (tabela 5) e submetidas à French® press.

Tabela 5. Soluções utilizadas para experimentos com FERM (FERM-f) fusionado a 6xhis. Incluem-se as soluções utilizadas na lise celular, cromatografia por afinidade a metal (IMAC), por exclusão molecular (SEC) e dicroísmo circular (CD).

FERM-f		
	Solução de Lise	50 mM fosfato de sódio, 100 mM NaCl, 5% glicerol, 1 mM PMSF, 0,3 mg mL ⁻¹ lisozima, pH 7,3
IMAC	Solução A	50 mM fosfato de sódio, 100 mM NaCl, 5% glicerol, pH7,3
	Solução B	Tampão A + 500 mM Imidazol
SEC/ DLS	Solução C	50 mM fosfato de sódio, 100 mM NaCl, 5% glicerol, 1 mM DTT, pH7,3
CD	Solução D	2,5 mM fosfato de sódio, 5 mM NaCl, 0,25 mM glicerol, pH7,3

4.2 Cromatografia líquida de Afinidade a metal (IMAC)

Da mesma maneira como foi procedido com as construções anteriores, FERM-f foi submetido à cromatografia por afinidade utilizando as soluções A e B (tabela 5), resultando na purificação de proteína com cerca de 26,3 kDa (ProtParam). Entretanto, de forma anômala a proteína foi eluída em toda a faixa de concentração de imidazol (figura 19 e B). Acredita-se que, a proteína pode apresentar diversas populações conformacionais incluindo aquelas desenoveladas e parcialmente desenoveladas, fato capaz de alterar a afinidade da proteína ao metal da matriz.

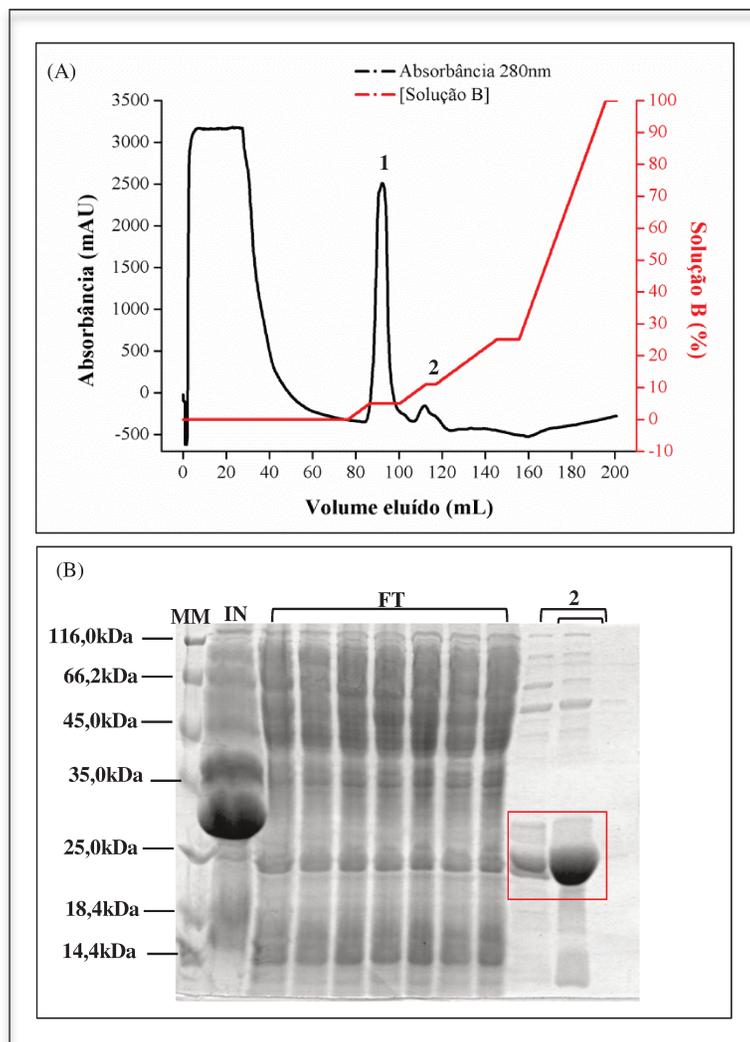


Figura 19. Cromatografia por afinidade a metal do domínio FERM (FERM-f) fusionado a 6xhis. (A) Cromatograma relacionando volume eluído (mL), absorbância (mAU) e solução B (contém imidazol -%) da amostra aplicada em coluna *HiTrap Chelating* 1mL acoplada a FPLC, monitorada a 280nm . O pico 1 corresponde aos contaminantes, e que também contém a proteína alvo, com 50mM de imidazol ; o pico 2 corresponde ao FERM-f, predominantemente, eluído com 125mM de imidazol. (B) SDS-PAGE 13% da corrida, onde (IN) fração insolúvel. A proteína alvo é eluída ao longo de toda a corrida, incluindo *flowthrough* (FT), frações correspondentes a FERM-f, com cerca de 26kDa (2).

4.3 Cromatografia líquida de exclusão molecular (SEC)

A cromatografia por exclusão molecular permitiu a separação de FERM-f de proteínas contaminantes de alto e baixo massa molecular sendo eluída em volume de cerca

de 65 mL de corrida (figura 20A). Com a amostra livre de moléculas contaminantes (figura 20B), foi possível continuar com os estudos de caracterização molecular.

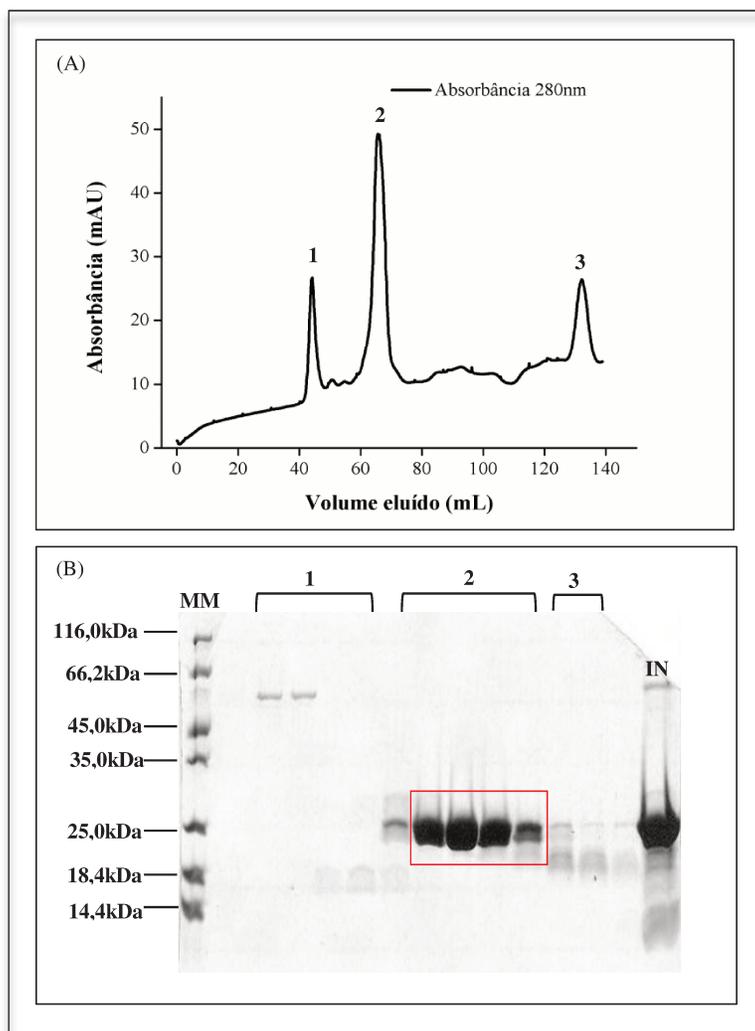


Figura 20. Cromatografia por exclusão molecular do domínio FERM (FERM-f) fusionado a 6xhis. (A) Cromatograma relacionando volume eluído (mL) e absorvância (mAU) da amostra aplicada em *HiLoad Superdex 75 16/60*, monitorada a 280nm por (FPLC); o pico 1 corresponde a amostra que é eluída no volume morto, onde estão proteínas de alto massa molecular e FERM-f na forma agregada, o pico 2 corresponde a FERM-f e pico 3 corresponde a moléculas de baixo massa molecular (B) SDS-PAGE da corrida, onde (IN) amostra injetada, (1) proteínas de de alto massa molecular eluídos no volume morto da coluna (40mL); (2) frações eluídas no volume de 60 a 70 mL de corrida com pico de 50mAU correspondendo a FERM-f; e (3) contaminantes de baixo massa molecular eluídos em 100mL até o final da corrida.

4.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O experimento de espalhamento dinâmico foi realizado com a proteína em concentração de 1mg mL^{-1} , em solução C (tabelas 5 e 6). A amostra de FERM-f, apresentou diversas populações de agregados, com raios de 9,1 e 64,4 nm, muito maiores do que o esperado para esta proteína e alta polidispersidade. Apesar das diversas variações de solução, pH e concentração de sal, essa condição não foi melhorada, permanecendo com agregados solúveis. Mais do que as condições experimentais, acredita-se que FERM-f seja estruturalmente, e talvez, funcionalmente, dependente de outros domínios localizados na porção distal da cauda da miosina XV para manter estabilidade.

Tabela 6. Determinação de raio hidrodinâmico (Rh) e dispersidade do domínio FERM (FERM-f) determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS).

Amostra	Raio hidrodinâmico (nm)	Polidispersividade (%)	Massa (%)
FERM-f	Oligômero	9,1	7,4
	Agregados	64,3	23,5

4.5 Dicroísmo Circular (CD)

Experimentos de CD mostraram que a FERM-f mostra um espectro típico de estrutura desordenada ou *random-coil*, com banda negativa a 204 nm (Figura 21). Essa amostra já apresentava agregados solúveis como verificado por experimentos de espalhamento dinâmico de luz, sendo mais uma indicativa da falta de ordenação estrutural.

O domínio FERM, está geralmente acompanhado de um domínio MyTH4 em miosinas e em estudos estruturais para a caracterização das caudas de miosinas X e VIIa tanto de camundongo como de humano, mostra-se a grande importância a presença de FERM ligado ao domínio MyTH4 para ensaios de cristalização, havendo ganho na estabilidade estrutural de ambos. Tendo isso em mente, acredita-se que a ausência do MyTH4, também presente em fusão a FERM, pode resultar na falta de estabilidade observada e consequente perda da estrutura e função (HIRANO *et al.*, 2011a; HIRANO *et al.*, 2011b; WEI *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2011)

A partir dos resultados obtidos, objetiva-se realizar a clonagem e expressão dos domínios funcionais fusionados, a fim de verificar essa hipótese e determinar a estrutura tridimensional.

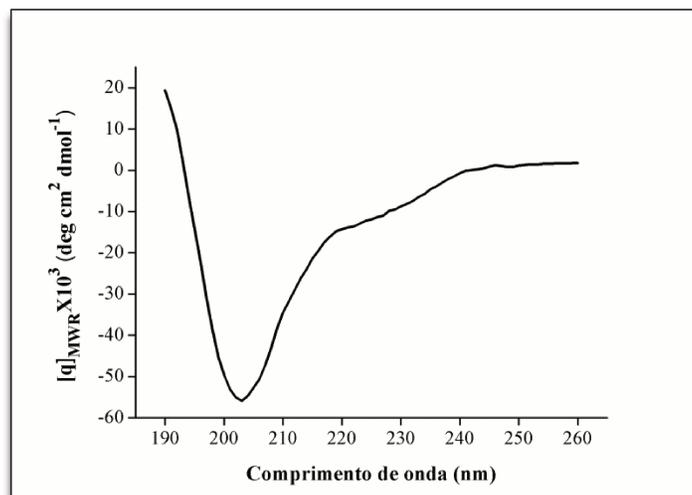


Figura 21. Espectro de dicroísmo circular do domínio FERM (FERM-f) em ultravioleta (UV) visível (195 a 260nm). O pico negativo a 204nm indica a estrutura randômica da proteína.

5. Cauda globular (Miosina V)

5.1 Construção C- terminal da cauda globular (GLOB_2/SUMO)

A. Expressão em larga escala e cromatografia líquida por afinidade a metal (IMAC)

Para a expressão em grandes quantidades adotou-se como volume final de expressão 800 mL de meio em erlenmeyers de 2 L.

A lise celular por sonicação se mostrou eficiente, o que se deve também à solução de lise utilizada, descrita na tabela 7.

Tabela 7. Soluções utilizadas para os experimentos com a construção C-terminal da cauda globular (GLOB_2) fusionada a SUMO. Incluem-se as soluções utilizadas na lise celular, cromatografia por afinidade a metal (IMAC), por exclusão molecular (SEC) e dicroísmo circular (CD).

GLOB_2		
	Solução de Lise	50 mM tris-HCl, 100 mM cloreto de sódio, 5% glicerol, 1 mM PMSF, 0,3 mg mL ⁻¹ lisozima, pH 8,0
IMAC	Solução A	50 mM tris-HCl, 100 mM cloreto de sódio, 5% glicerol, 1mM PMSF, 0,3 mg mL ⁻¹ , pH 8,0
	Solução B	Tampão A + 500 mM Imidazol
SEC / CD	Solução C	50 mM tris-HCl, 100 mM cloreto de sódio, 5% glicerol, 1 mM DTT

O passo seguinte, de cromatografia por afinidade a íon metálico (níquel), permitiu estabelecer um protocolo para a separação da GLOB_2, fusionada a SUMO resultando na eluição da proteína alvo em diferentes concentrações de imidazol que já indica diferentes estados conformacionais ou oligoméricos da amostra (figura 22).

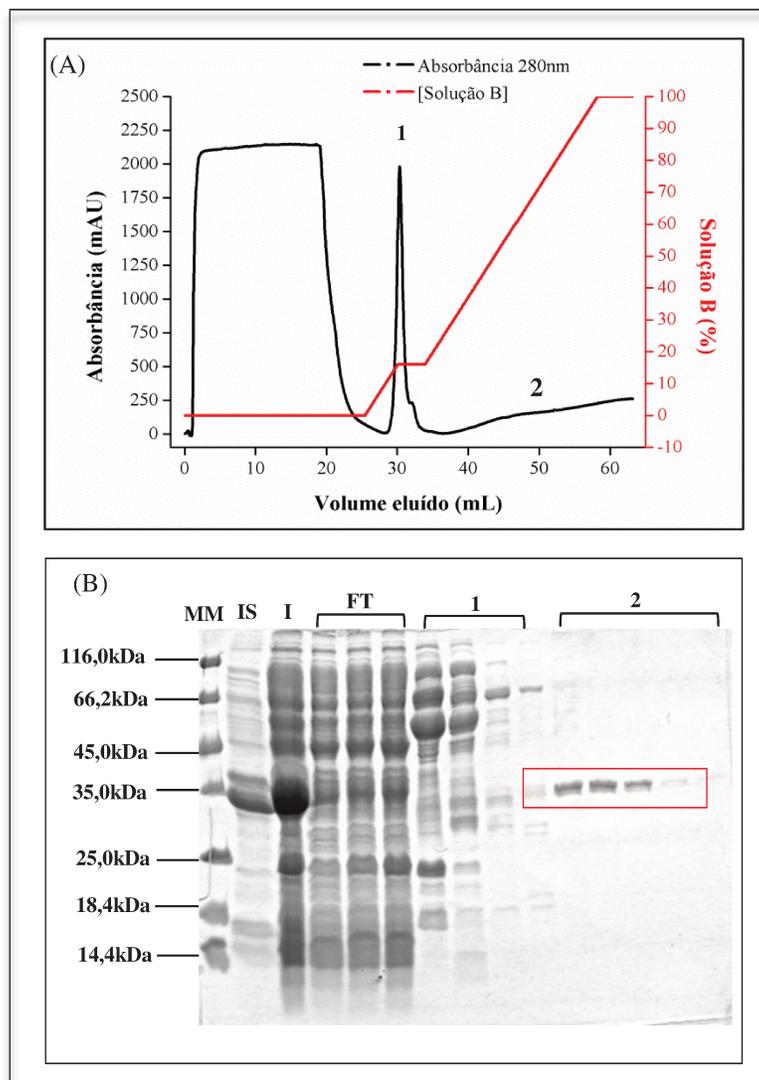


Figura 22. Cromatografia por afinidade a metal da porção C-terminal da cauda globular (GLOB_2) da fusionada a SUMO. (A) Cromatograma relacionando volume eluído (mL), absorbância (280 nm) e concentração da solução B (contendo imidazol- %) para a eluição de proteínas da amostra aplicada em *HiTrap Chleating* 5mL acoplada a FPLC, monitorada a 280 nm em, (1) pico de contaminantes com 7 5mM imidazol; (2) pico contendo proteína alvo eluídas de 100 a 50 0mM de imidazol com 500 mAU. (B) SDS-PAGE 13%. (IS) Fração insolúvel. (IN) Amostra injetada. (FT) *Flowthrough*. (1) Frações correspondentes ao pico de contaminantes. (2) Frações correspondentes a GLOB_2 com cerca de 31 kDa.

Para remover a fusão SUMO, as frações correspondentes a proteína alvo foram concentradas e dialisadas contra tampão sem imidazol. Para cada 50 mg mL⁻¹ de proteína foi utilizado 10 µg de ULP protease. Após teste de clivagem por 30 min, uma, duas e 16 h, não houve aparente clivagem da amostra, o que mostra um possível impedimento estérico devido a fusão ou mesmo a formação de agregados ou *misfolding*.

C. Cromatografia líquida de exclusão molecular (SEC)

Mesmo após a cromatografia de exclusão molecular (SEC), não houve separação total da proteína alvo de seus contaminantes e a proteína também foi eluída em diferentes picos (figura 23), sendo que a maior parte da proteína foi eluída no volume morto (V_0), indicando uma amostra agregada como indicava experimentos anteriores de IMAC e proteólise.

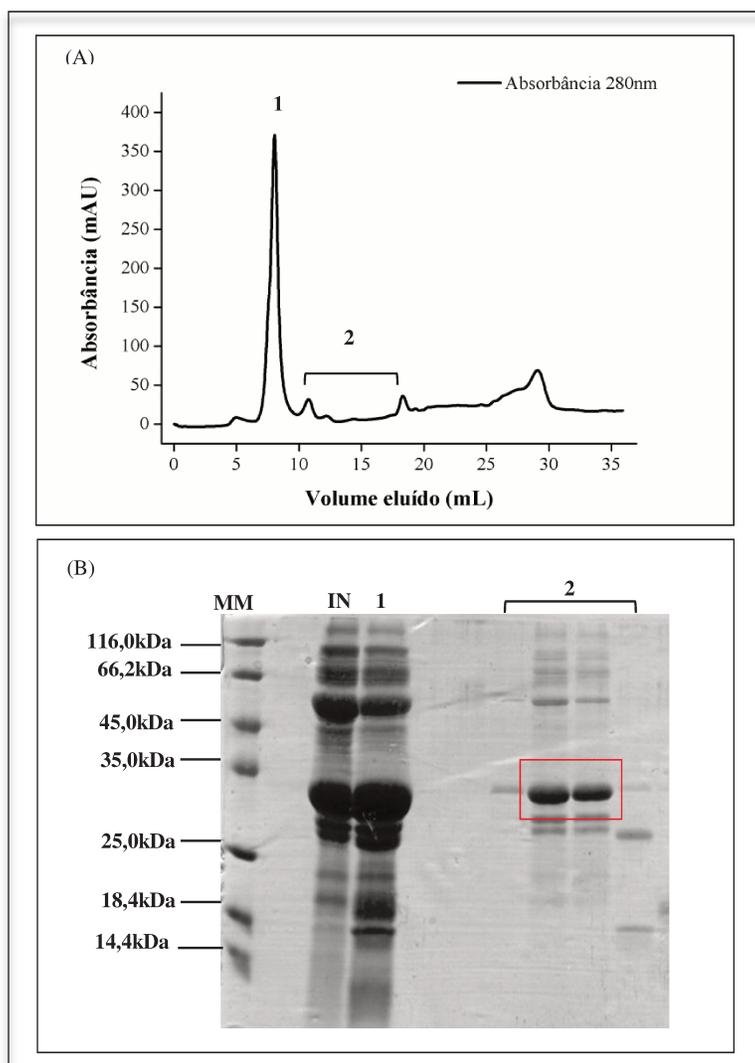


Figura 23. Cromatografia por exclusão molecular da porção C-terminal da cauda globular (GLOB_2) fusionada a SUMO. (A) Cromatograma da proteína aplicada na coluna *Superdex* 200 10/30, acoplada ao FPLC. O pico 1, com cerca de 375 mAU corresponde as proteínas eluídas no volume morto (8 mL); os picos 2 e 3 correspondem a eluição de GLOB_2, com cerca de 40 e 65 mAU, respectivamente. (B) SDS-PAGE 13%, onde: (IN) amostra injetada, (1) fração da amostra eluída no volume morto da coluna (8 mL) e (2) frações correspondentes aos picos contendo GLOB_2. A maior parte da proteína expressa foi eluída no volume morto, devido à formação de agregados.

Experimentos posteriores, tais como espalhamento dinâmico de luz (DLS), foram realizados para esta construção, e verificou-se alta polidispersidade com moléculas de raio hidrodinâmico na ordem de 100 a 1000 nm, indicando diversas populações na amostra. Experimento de dicroísmo circular mostrou que a proteína não apresentava um espectro típico de proteína enovelada. Além disso, dados similares foram obtidos para a proteína ortóloga humana do grupo. Apesar das condições desfavoráveis, a proteína foi submetida a ensaios de cristalização em fusão com SUMO, porém não se observou o aparecimento de cristais.

Esses resultados evidenciam que os subdomínios da cauda globular não possuem estabilidade quando produzidos isoladamente, requerendo a expressão da cauda globular *full-length* (inteira) para garantir conformação correta e estabilidade; além disso, ainda não foram descritos estudos estruturais, os quais utilizam a cauda globular truncada, corroborando aos resultados obtidos. Portanto, passou-se a estudar o domínio inteiro (GT-f).

5.2 Cauda globular inteira (GT-f/6xhis)

A. Expressão em larga escala e cromatografia líquida de afinidade a metal (IMAC)

Diferente da construção anterior, a cauda globular foi expressa em erlenmeyers de 2 L contendo 500 mL de cultura, e para a lise celular, foi utilizada French® press, equipamento que utiliza alta pressão e rápida descompressão, aumentando o rendimento de proteína sem causar danos por aquecimento, por exemplo, como pode ocorrer na sonicação. A solução de lise como os tampões utilizados na purificação da GT-f estão descritos na tabela 8.

Tabela 8. Soluções utilizadas em experimentos com a cauda globular inteira (GT-f) fusionada a 6xhis. Incluem-se as soluções utilizadas na lise celular, cromatografia por afinidade a metal (IMAC), por exclusão molecular (SEC), dicroísmo circular (CD), cristalização e fluorescência (DSF).

GT-f		
Solução de Lise		50 mM fosfato de sódio, 300 mM cloreto de sódio, 5% glicerol, 1 mM PMSF, 0,3 mg mL ⁻¹ lisozima, pH 6,8
IMAC	Solução A	50 mM fosfato de sódio, 300 mM cloreto de sódio, 5% glicerol, 1 mM PMSF, 0,3 mg mL ⁻¹ , pH6,8
	Solução B	Tampão A + 500mM Imidazol
SEC/DLS/ cristalização	Solução C	50 mM fosfato de sódio, 300 mM cloreto de sódio, 5% glicerol, 1 mM DTT, pH6,8
CD/DSF	Solução D	2,5 mM fosfato de sódio, 5 mM cloreto de sódio, 0,25 mM Glicerol, pH6,8
Cristalização	Solução E	50 mM HEPES, 100 mM cloreto de sódio, 5% glicerol, 1mM DTT, pH6,8

Assim como para GLOB_2, o passo de afinidade a íon metálico foi extremamente necessário e eficiente para GT-f resultando em alvo com fusão de 6xhis de aproximadamente 46kDa, na presença de poucos contaminantes destacado na figura 24B).

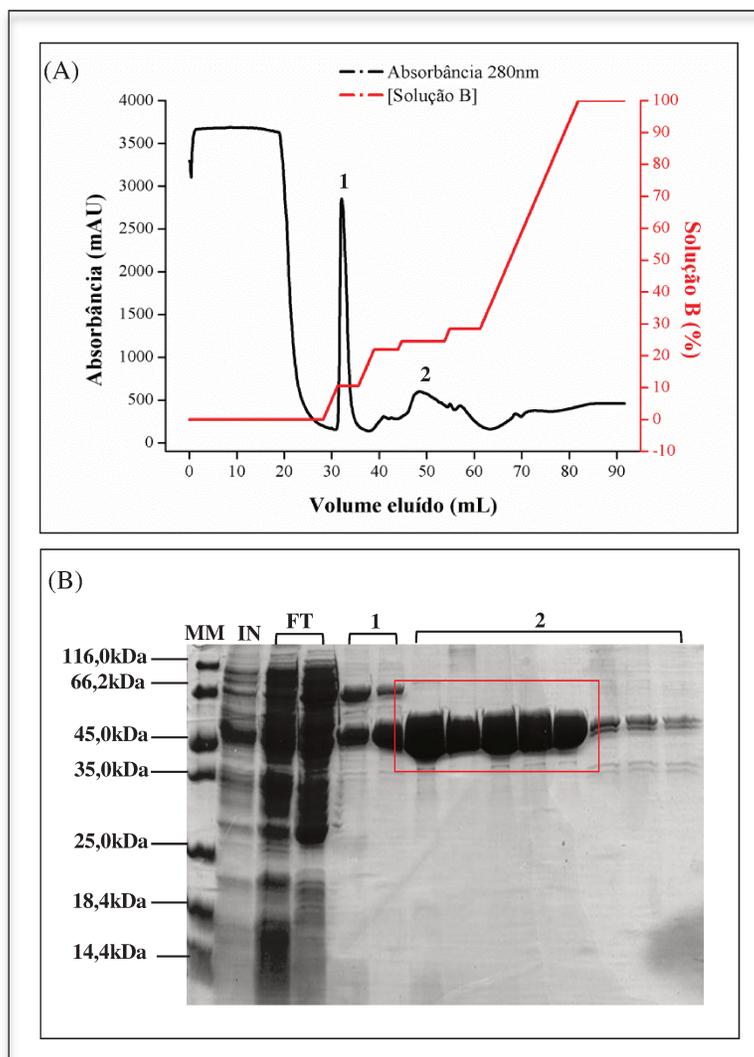


Figura 24. Cromatografia por afinidade a metal da cauda globular inteira (GT-f) fusionada a 6xhis. (A) Cromatograma relacionando volume eluído (mL), absorbância (mAU) e solução B (contém imidazol - %) da amostra aplicada em coluna *HiTrap Chelating* 1 mL, acoplada FPLC e monitoramento a 280 nm; (1) corresponde ao pico de contaminantes, eluído com cerca de 75mM de imidazol, (2) é o pico contendo GT-f e eluído entre 150 e 300 mM de imidazol. (B) SDS-PAGE 13%, onde (IN) amostra injetada; (FT) *flow-through*; (1) frações correspondentes ao pico de contaminante; (2) frações correspondentes a proteína alvo com cerca de 46 kDa.

B. Cromatografia líquida de exclusão molecular (SEC)

A cromatografia de exclusão molecular de GT-f, resultou na eluição da proteína de tamanho esperado com um volume de 55 mL em um pico estreito e bem definido, mostrando a homogeneidade estrutural dessa construção (figura 25A). O gel de

poliacrilamida desnaturante mostra o alto grau de pureza da amostra após purificação por SEC (figura 25B).

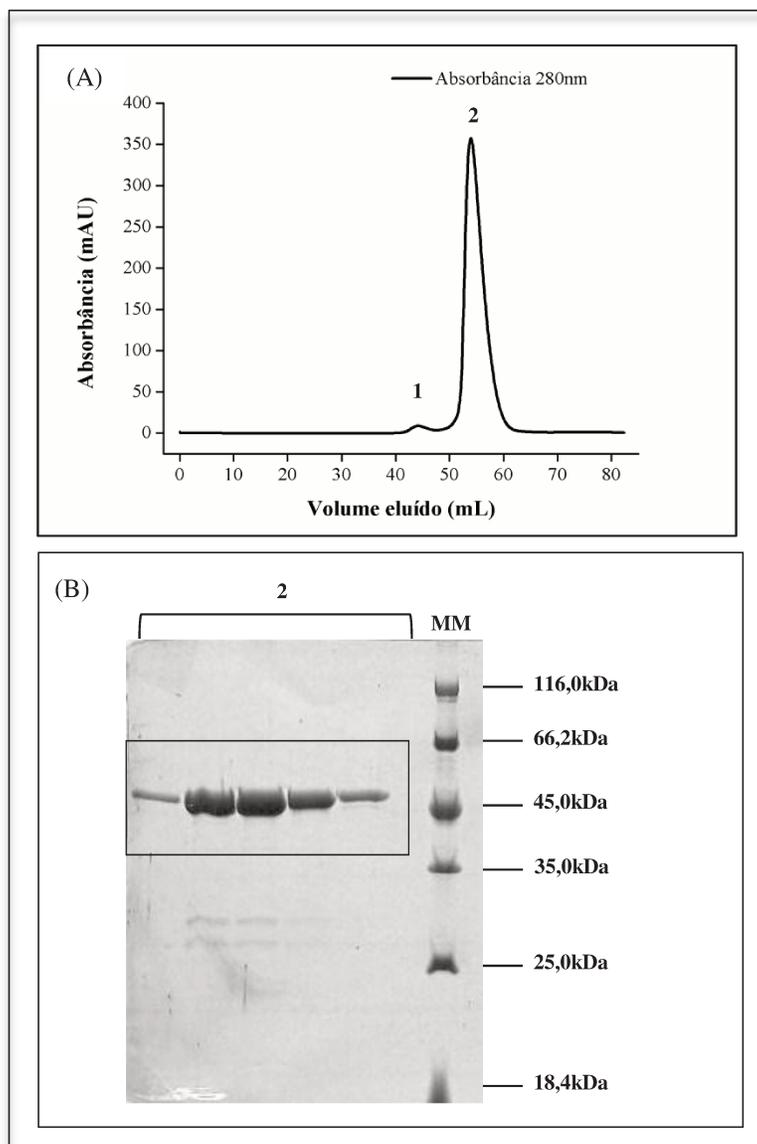


Figura 25. Cromatografia por exclusão molecular da cauda globular inteira (GT-f) fusionada a 6xhis. (A) Cromatograma relacionando volume eluído (mL) e absorbância (mAU) da amostra aplicada em coluna *HiLoad Superdex 75 16/60*, monitorada por UV (280nm) em FPLC, onde : (1) proteínas eluídas no volume morto da coluna, provavelmente proteínas agregadas ou contaminantes de alto massa molecular e (2) eluição de GT- f a partir de de 55mL de corrida. (B) SDS- PAGE 13%, onde: (2) frações correspondentes ao pico de GT-f. Os contaminantes da amostra foram eluídos no volume morto em um pico de agregados (não mostrado).

C. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A proteína na concentração de $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em solução C (tabela 8) foi caracterizada por DLS. Na tabela 8 são mostrados os principais parâmetros determinados por DLS para GT-f.

A partir disso, é possível observar que para GT-f, moléculas de raio hidrodinâmico $5,0 \text{ nm}$ são predominantes na amostra ($99,4\%$ em massa) em relação aos agregados ($0,6\%$) na tabela 9. Portanto, devido ao raio, polidispersidade e porcentagem em massa considerou-se uma amostra monodispersa.

A construção da cauda globular inteira da miosina Va humana, também estudada pelo grupo, mostraram parâmetros semelhantes após os mesmos experimentos. A proteína possui cerca de 50 kDa , e raio hidrodinâmico, determinado por DLS, de $5,6 \text{ nm}$.

Experimentos de espalhamento dinâmico de luz com a miosina Va de levedura, com cerca de 50 kDa , possui um raio hidrodinâmico de $3,6 \text{ nm}$ (PASHKOVA *et al.*, 2005; PASHKOVA *et al.*, 2006). As diferenças no tamanho de raio podem estar relacionada a diferença na estrutura primária, que por fim reflete na estrutura terciária, já que a GT de levedura tem baixa identidade de sequência em relação a GT de inseto e humana.

Tabela 9. Média dos principais parâmetros extraídos do experimento de espalhamento dinâmico de luz (DLS) para a cauda globular inteira (GT-f).

Amostra	Raio hidrodinâmico (nm)	Polidispersividade (%)	Massa (%)
GT-f	Alvo	10,5	99,4
	Agregados	169,4	0,6

D. Dicroísmo Circular (CD)

Espectro da GT-f

A varredura do espectro em ultravioleta distante na faixa de 195 a 260 nm permitiu a caracterização da estrutura secundária da cauda globular (GT-f) (figura 26). As bandas negativas a 208 e 222 nm , mostra um espectro típico de estruturas predominantes de

hélices-alfa, corroborando com os dados de modelagem molecular realizado pelo servidor I-TASSER, a partir da cauda globular da miosina Va de levedura.

A estimativa do conteúdo de estrutura secundária a partir do espectro de CD da proteína GT-f foi obtida utilizando o algoritmo K2D (ANDRADE *et al.*, 1993) do servidor DICHROWEB (LOBLEY *et al.*, 2002). Os dados experimentais realizados com GT-f, ainda que diluída em água, não permitiram atingir sinais menores que 190 nm. Esta foi a razão de não se utilizar outros algoritmos para a deconvolução do espectro que dependem de medidas até 190 nm, no mínimo. A predição da estrutura secundária a partir da sequência primária foi realizada pelo servidor PSIPred (BUCHAN *et al.*, 2010), que demonstra uma precisão de aproximadamente 94,5% (tabela 10). Percebe-se que, ainda que seja uma medida aproximada, a porcentagem de estruturas secundárias calculadas por K2D e preditas pelo servidor PSIPred são bastante semelhantes, principalmente para hélices- alfa.

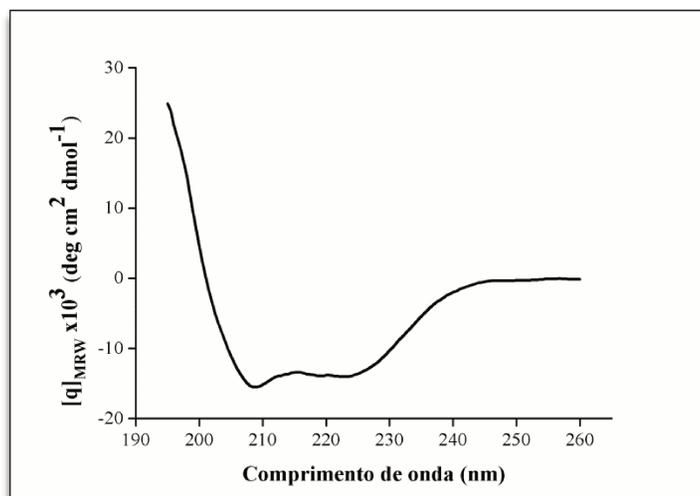


Figura 26. Espectro de dicroísmo circular para a cauda globular inteira (GT-f) na faixa UV-visível (195 a 260 nm). A proteína apresenta picos negativos e bem definidos a 208 e 222 nm, característicos de hélices-alfa, corroborando ao modelo construído a partir da cauda globular da miosina Va de levedura.

Tabela 10. Conteúdo de estrutura secundária da cauda globular inteira (GT-f). Comparação entre os resultados obtidos pela deconvolução dos dados de dicroísmo circular e aqueles obtidos através da predição a partir da sequência pelo servidor PSI-Pred (BUCHAN *et al.*, 2010).

Hélice alfa (deconvolução)	Hélice alfa (predição)	Folha beta (deconvolução)	Folha beta (predição)	Random coil (deconvolução)	Random coil (predição)
0.57	0.56	0.08	0.00	0.34	0.44

Desnaturação Térmica

Experimentos de desnaturação térmica monitorados pela variação de intensidade do sinal de CD em 222 nm foram conduzidos com objetivo de caracterizar a estabilidade da proteína bem como sua reversibilidade (figura 27). O espectro mostra que a cauda globular possui uma transição típica de dois estados bem definida, com uma T_m de $48,12 \pm 0,06^\circ\text{C}$; apesar de predições de estrutura terciária indicarem a existência de dois subdomínios que pudessem resultar em duas transições: a dissociação, seguida do desenovelamento de cada subdomínio. Além disso, o resfriamento da amostra de 100 a 20°C não resultou no reenovelamento da proteína, indicando a irreversibilidade do sistema. A desnaturação térmica, realizada em nosso laboratório, com a GT humana (dados não publicados) mostraram que o domínio possui uma T_m em torno de $46,80^\circ\text{C}$, quando aquecida de 20 a 100°C , monitorada a 222 nm. Assim como verificado para inseto, a GT humana não é renaturada com o decréscimo da temperatura. A proximidade das T_m s de GT de inseto e humano, se deve a similaridade estrutural que apresentam entre si, sendo que o processo de desenovelamento acontece de maneira semelhante para ambas.

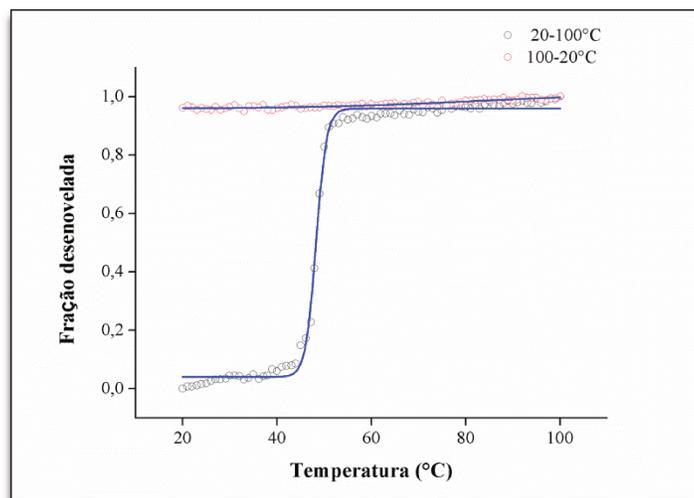


Figura 27. Curva de desnaturação térmica da cauda globular inteira (GT-f) monitorada por dicroísmo circular a 222 nm. Variação de temperatura na faixa de 20 a 100°C (quadrado preto) e de 100 a 20°C (esfera vermelha) expressas em fração desenovelada. A temperatura de transição (T_m) calculada pela regressão sigmoideal (linha azul) foi de $48,12 \pm 0,06^\circ\text{C}$, não sendo reversível.

F. Desnaturação térmica monitorada por fluorescência de sonda extrínseca (DSF)

Com o objetivo de identificar possíveis moléculas capazes de se ligarem e/ou estabilizar a cauda globular, diversas moléculas/ligantes, tais como cloreto de sódio, íons metálicos, soluções de diferentes pHs e outras moléculas orgânicas foram testadas (Figuras 28, 29, 30).

Nas condições mostradas nos gráficos, ocorre que quando o ligante se associa a proteína pode haver um aumento na energia livre de Gibbs (ΔG_u) e da temperatura de transição (T_m) da proteína. O aumento desta é, geralmente, observado em ligações predominantemente entrópicas como nas interações hidrofóbicas; a variação na temperatura de transição (ΔT_m) é considerada experimentalmente relevante quando maior que 2°C (ERICSSON, *et al.*; 2006; MATULIS *et al.*, 2005; SENISTERRA *et al.*, 2006; VEDADI *et al.*, 2006). Experimentos dessa natureza não foram, ainda, explorados para a cauda globular de diferentes espécies, assim como para outros domínios funcionais de miosinas, portanto, as soluções utilizadas neste trabalho se basearam em outros tipos de proteínas, a fim de auxiliar na sua cristalização.

A temperatura de transição/ *melting* (T_m) de GT-f nativa determinada por fluorescência foi de $43,41 \pm 0,12^\circ\text{C}$. Considerando a proteína nativa, há uma diferença na temperatura de transição de $4,8^\circ\text{C}$ entre os experimentos de dicroísmo circular e fluorescência, o que é geralmente esperado para estes tipos de sondas. O monitoramento da estabilidade ocorre por mecanismos diferentes quando se compara a desnaturação térmica monitorada por fluorescência extrínseca ou dicroísmo circular; enquanto a primeira monitora o desenovelamento proteico ao nível de estrutura terciária, através de uma sonda extrínseca, o dicroísmo circular monitora o processo ao nível de estrutura secundária, onde as ligações peptídicas da proteína são sondas intrínsecas.

Dentre as moléculas adicionadas somente brometo de sódio, ácido málico, ácido cítrico e adenosina trifosfato foram capazes de gerar aumento em torno de 3°C na estabilidade de GT-f (figura 28). Ainda que seja uma alteração sutil, são aditivos que devem ser testados em diferentes condições a fim de verificar a relação da concentração do ligante ao aumento da estabilidade da proteína.

As soluções de diferentes pHs não geraram aumentos maiores que $2,5^\circ\text{C}$. Acredita-se que a baixa concentração da solução a ser incubada em relação a solução em que a proteína

está contida possa mascarar o efeito do pH testado, uma vez que, por mais diluída que a amostra esteja, ainda há predominância da solução em que a amostra está contida (figura 29).

A força iônica gerou somente o decréscimo da estabilidade de GT-f (figura 30). De forma distinta a GT-f de inseto, a cauda globular da proteína humana teve um ganho significativo de estabilidade de 6°C com o aumento da força iônica (resultados não publicados), o que pode indicar diferenças nas interfaces dos subdomínios e na superfície da molécula e talvez tenha uma relevância funcional.

Para investigar se a baixa força iônica favorece a estabilidade, todo o sal da amostra pode ser retirado através de uma diálise, caso não haja precipitação da proteína.

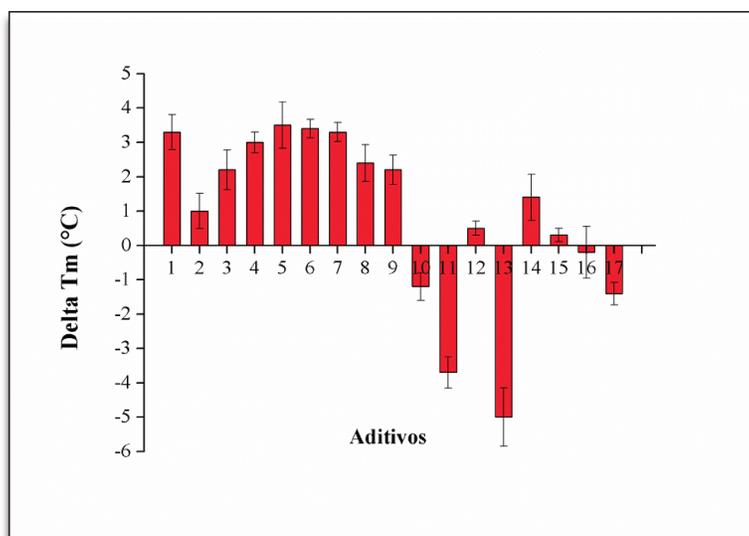


Figura 28. Desnaturação térmica da cauda globular inteira (GT-f) monitorada por fluorescência com aditivos. Variação da temperatura de transição (ΔT_m) em função da adição de moléculas em concentração final de 10 mM. Aditivos: 1-brometo de sódio; 2-cloreto de lítio; 3-iodeto de sódio; 4-tartrato de sódio; 5-ácido málico; 6-ácido cítrico; 7-adenosina trifosfato; 8-ditiotreitol; 9-ácido etilenodiaminotetracético; 10-cloreto de bário; 11-cloreto de cálcio; 12-cloreto de potássio; 13-cloreto de manganês; 14-citrato de sódio; 15-dimetilsulfóxido; 16-metanol; 17-etanol.

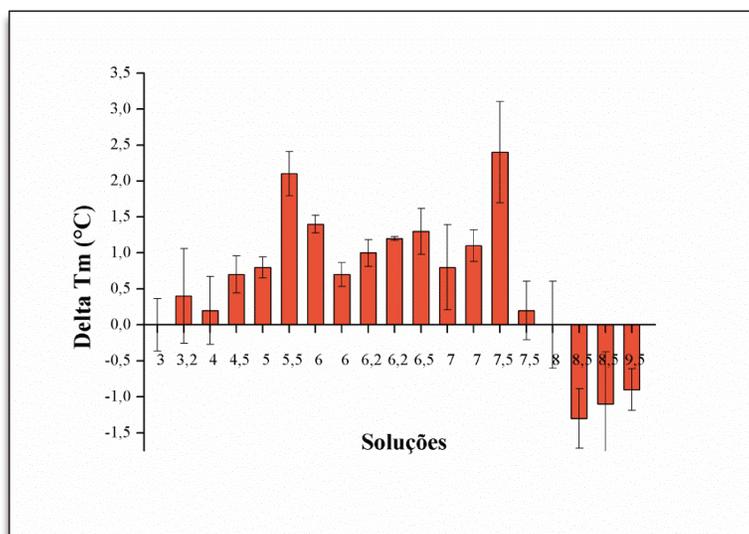


Figura 29. Desnaturação térmica da cauda globular inteira (GT-f), monitorada por fluorescência em diferentes pHs . Variação da temperatura de transição (ΔT_m °C) em função das soluções utilizadas, de diferentes pHs na concentração final de 10mM. Soluções; 1-glicina pH 3,0; 2- ácido cítrico pH 3,2; 3- ácido cítrico pH 4,0; 4- acetato de sódio pH 4,5; 5- fosfato de sódio/potássio pH 5,0; 6- citrato de sódio pH 5,5; 7- fosfato de sódio/ potássio pH 6,0; 8- bis-tris pH 6,0; 9- MES pH 6,2; 10- ADA pH 6,2; 11- bis-tris-propano pH 6,5; 12- acetato de amônio pH 7,0; 13- MOPS pH 7,0; 14- HEPES pH7,5; 15- tris pH 7,5; 16- imidazol pH 8,0; 17- bicina pH 8,5; 18- tris pH 8,5; 19- CHES pH 9,5.

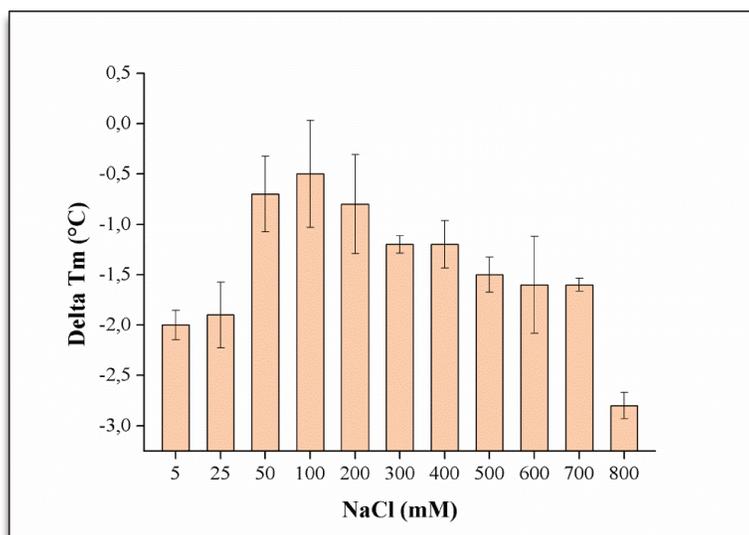


Figura 30. Desnaturação térmica da cauda globular inteira (GT-f) monitorada por fluorescência em diferentes concentrações de cloreto de sódio. Variação da temperatura de transição (ΔT_m °C) em relação ao aumento da concentração de NaCl. Concentrações: 1-controle; 2-5 mM; 3-25 mM; 4-50 mM; 5- 100 mM; 6-200 mM; 7- 300 mM; 8-400 mM; 9-500 mM; 10-600 mM; 11-700 mM, 12-800 mM. Não houve alterações significativas na estabilidade.

G. Proteólise limitada e cromatografia líquida por exclusão molecular analítica (aSEC)

O teste de clivagem da GT-f, utilizando tripsina, resultou na clivagem total da proteína com 3h de incubação a 4°C (figura 27). A proteólise limitada mostrou-se uma excelente estratégia em busca de obter uma molécula estável para se submeter a ensaios de cristalização. No trabalho realizado por Pashkova e colaboradores. (2006) com *Myo2p* de *S. cerevisiae*, foi demonstrado que, após clivagem do domínio cauda, obteve-se fragmentos complementares estáveis que resultaram em cristais adequados para difração e consequente resolução da primeira estrutura de miosina V. O padrão obtido para GT-f é similar ao obtido por Pashkova assim como da miosina V humana que foi recentemente obtido pelo nosso grupo.

Na GT-f de inseto, muitos dos resíduos de lisina e arginina estão localizados em *loops*, regiões móveis, mais expostos, e que podem estar susceptíveis a clivagem pela tripsina. Análise do modelo atômico sugere que os resíduos Arg159, Arg161, Arg 167 e Arg169 (figura 31) sejam os prováveis sítios de clivagem, gerando dois subdomínios principais, cada um possuindo cerca de 18 e 25 kDa, respectivamente. E de fato como observado no gel de poliacrilamida desnaturante, tem-se duas bandas majoritárias (figura 32). A terceira banda acredita-se, que corresponda a degradação do subdomínio maior, assim como foi verificado por espectrometria de massas para a cauda globular da miosina V humana (Andrey *et al.*, dados não publicados).

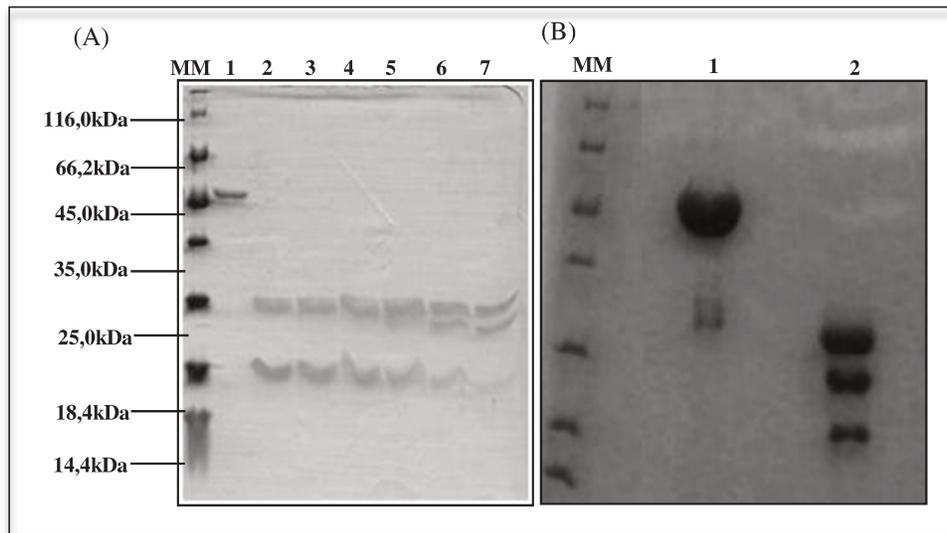


Figura 31. SDS-PAGE 13% da proteólise limitada por tripsina ($10\mu\text{g mL}^{-1}$) da cauda globular inteira (GT-f). (A) Teste de clivagem, onde (1) controle, (2) 15 minutos; (3) 30 minutos; (4) 1 hora, (5) 2 horas, (6) 3 horas, (7) 4 horas. (B) A clivagem total ocorre por 3 horas a 4°C , onde (1) controle e (2) amostra clivada.

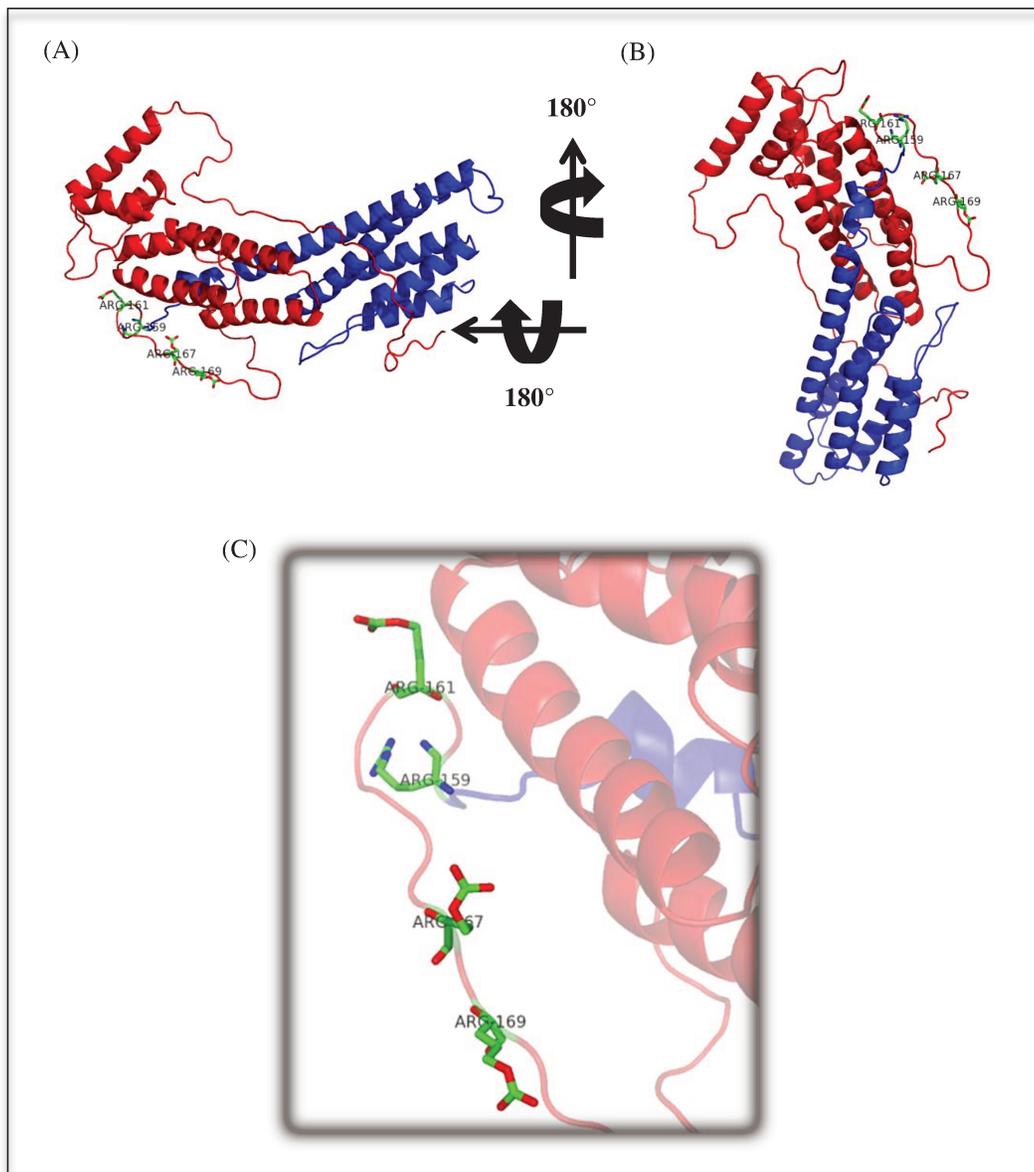


Figura 32. Modelagem molecular da cauda globular inteira (GT-f) destacando possível loop exposto clivado por tripsina. (A) e (B) O loop contém as Arg159, Arg161, Arg167, Arg169, possíveis sítios de clivagem que geram 2 subdomínios principais, de 20 e 25 kDa. (C) Representação com zoom do loop, contendo as argininas alvo. Essa região está bastante exposta ao solvente em relação ao restante da molécula.

A amostra clivada foi concentrada e resubmetida a uma nova cromatografia de exclusão molecular para eliminação da tripsina e verificação se os subdomínios constituíam fragmentos complementares estáveis. Assim como nos resultados obtidos para *Myo2p*, a

cauda globular de inseto clivada (cGT-f) apresentou o mesmo perfil cromatográfico em relação a não clivada (GT-f) (figura 33).

Parâmetros moleculares foram extraídos para as caudas globulares inteira e clivada através da aSEC. Os volumes de eluição (V_e) de proteínas padrões, tais como BlueDextran, ferritina, catalase, ovalbumina e ribonuclease A, junto ao volume da coluna (V_c) (3 mL) e volume morto (V_0) (1 mL), permitiram a determinação do K_{av} das duas proteínas (tabela 11). Relacionando o log dos pesos moleculares de proteínas padrões aos respectivos K_{av} , foi possível, através de regressão linear, determinar a massa molecular da cauda globular inteira (GT-f) e clivada (cGT-f) (Figura 34). A GT-f eluiu com um volume menor em relação a proteína clivada sugerindo uma alteração no raio hidrodinâmico com uma variação de massa molecular de ~75 kDa (GT-f) para ~54 kDa (cGT-f). De fato calculando a regressão para $\sqrt{-\log(K_{av})}$ foi possível determinar o R_h das amostras onde fica evidente a diferença do comportamento hidrodinâmico, tendo a GT-f e cGT-f raios de 3,60 e 3,35 nm, respectivamente (figura 35). Um resumo dos resultados obtidos em solução está descrito na tabela 12.

Para a cauda globular das miosinas de levedura e humano, alterações proporcionais na massa e no raio determinadas para a cauda globular inteira e clivada, também foram encontradas, utilizando o mesmo experimento (ANDREY *et al.*, 2011; PASHKOVA *et al.*, 2006).

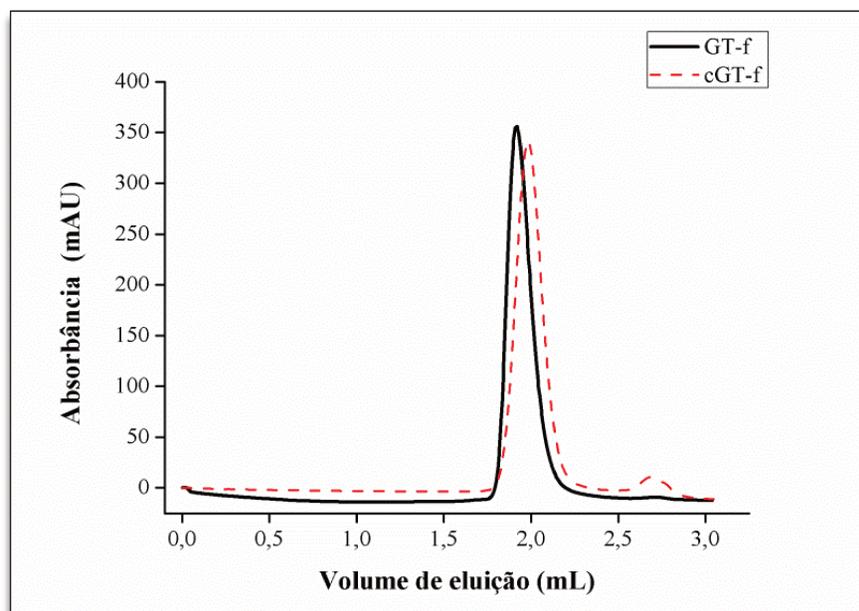


Figura 33. Perfil cromatográfico de exclusão molecular analítica (ASEC) da cauda globular inteira (GT-f) e clivada (cGT-f). As amostras ($0,3 \text{ mg mL}^{-1}$) foram aplicadas em coluna *Superdex 200 GL 5/150*, acoplada a HPLC; a corrida foi monitorada em UV, a 280 nm. Verificou-se que os volumes de eluição da proteína clivada e inteira não sofrem alterações, isso mostra que embora haja remoção de prováveis peptídeos móveis, pela tripsina, aqueles funcionais ainda permanecem interagindo entre si.

Tabela 11. Determinação de parâmetros moleculares da cauda globular inteira (GT-f) e clivada (cGT-f) por cromatografia de exclusão molecular analítica (aSEC). Parâmetros conhecidos de proteínas utilizadas como padrões são utilizados para estimar massa molecular (M.M.), em daltons, e raio hidrodinâmico (Rh), em nanômetros, das proteínas de interesse. A partir do volume de eluição (V_e) dos alvos, determina-se o K_{av} e, pela $\sqrt{-\log(K_{av})}$, pode-se determinar o raio hidrodinâmico. Valores não apresentados na tabela serão determinados pela relação entre os parâmetros na regressão linear.

Proteína	V_e (mL)	M.M. (kDa)	K_{av}	Log M.M.	Rh (nm)	$\sqrt{-\log(K_{av})}$
BlueDextran	1,09					
Ferritina	1,42	440	0,17	5,64	6,10	0,86
Catalase	1,65	232	0,29	4,13	5,22	0,72
Ovalbumina	2,04	43	0,49	4,87	3,05	0,54
Ribonuclease A	2,37	13	0,67	4,77	1,64	0,41
<i>GT-f</i>	1,92	-	0,43	-	-	-
<i>cGT-f</i>	1,98	-	0,46	-	-	-

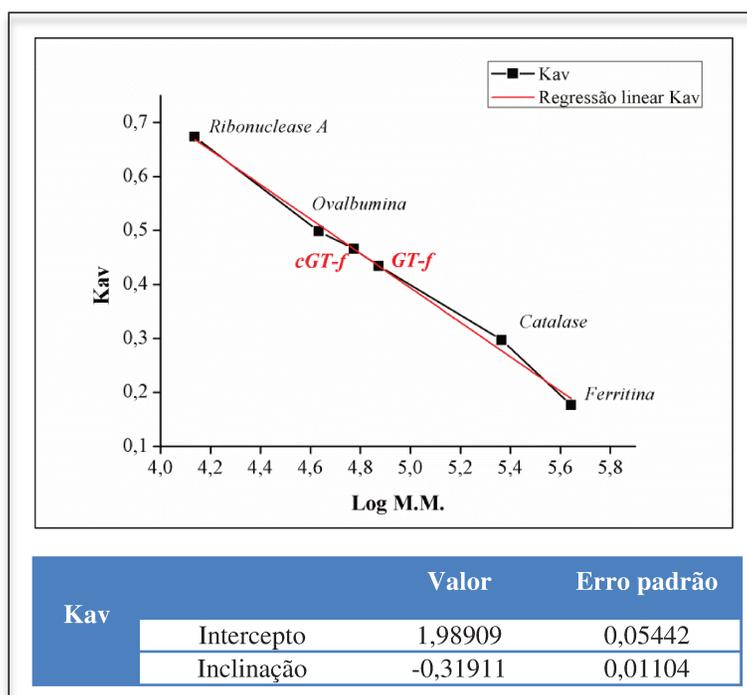


Figura 34. Determinação do massa molecular da cauda globular inteira (GT-f) e clivada (cGT-f). Pela relação de log das massas moleculares (M.M.) de proteínas padrões aplicadas em cromatografia por exclusão molecular e os respectivos Kav é possível, através de regressão linear, determinar os pesos moleculares de interesse. Pela equação da reta, calculou-se que GT-f possui 74,7 kDa e cGT-f, 53,5 kDa. A tabela anexa fornece os parâmetros para construção da equação da reta.

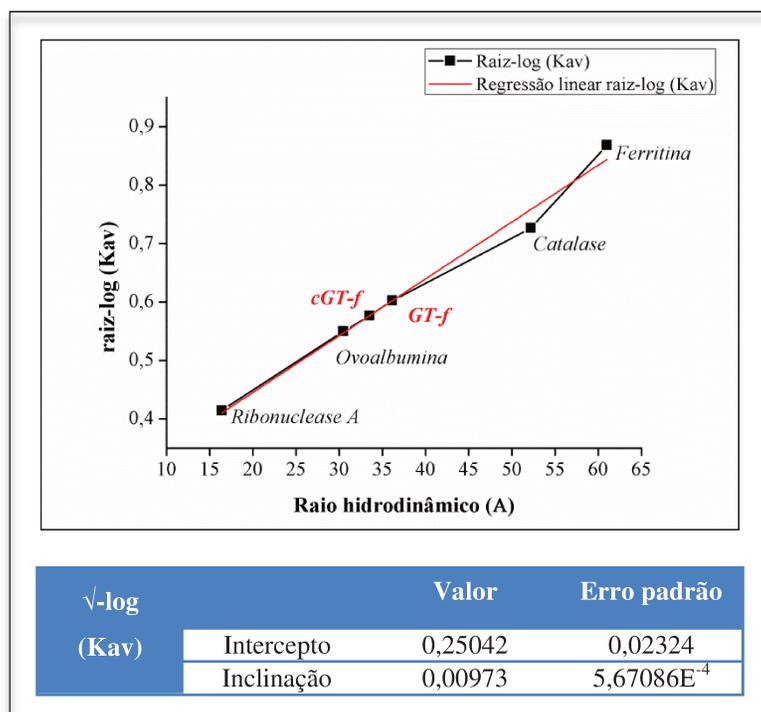


Figura 35. Determinação do raio hidrodinâmico da cauda globular inteira (GT-f) e clivada (cGT-f) por cromatografia de exclusão molecular analítica (aSEC). A relação entre o Kav e o raio hidrodinâmico das proteínas padrões permite a determinação do raio das proteínas de interesse através de regressão linear. Através da equação da reta, calculou-se um raio de 36,15 e 33,50 Å para GT-f e cGT-f, respectivamente.

Tabela 12. Comparação entre parâmetros moleculares para a cauda globular inteira (GT-f) e clivada (cGT-f) determinados por diferentes técnicas. Percebe-se a discrepância nos valores de massa molecular determinadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e cromatografia por exclusão molecular analítica (aSEC). Por outro lado, isso não ocorre com o raio hidrodinâmico (Rh). Pelo fato da não determinação dos peptídeos presentes em GT, não foi possível determinar o massa molecular pelo ProtParam.

Proteína	M.M. (SEC) (kDa)	M.M. (ProtParam) (kDa)	Rh (DLS) (nm)	Rh (aSEC) (nm)
GT-f	74,7	45,9	5,0	3,6
cGT-f	59,5	-	4,6	3,3

H. Espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS)

Devido à dificuldade na cristalização da GT-f de inseto, experimentos de SAXS foram realizados para caracterização estrutural, onde se determinou parâmetros globais e sua estrutura a baixa resolução.

Na figura 36A, tem-se a curva de espalhamento da GT-f em diferentes tempos de exposição indicando que a amostra não sofreu dano a radiação; o decaimento da intensidade (Log [I]) em função do vetor de espalhamento (s) indica que não há agregação.

O programa CRY SOL permitiu sobrepor a curva experimental, onde os 5 primeiros pontos foram retirados, a curva teórica, gerada a partir da modelagem molecular, sendo possível comparar os padrões de decaimento da intensidade (figura 36B), indicando de forma global uma similaridade quanto ao estado oligomérico (região de Guinier), porém as diferenças na região de Porod sugerem uma discrepância no envelope molecular. Isso é plausível já que o modelo atômico construído por modelagem molecular teve como *template* uma estrutura de baixa identidade, o que compromete análises mais precisas ao nível atômico, limitando aos aspectos globais da molécula. Além disso, a amostra submetida aos experimentos de SAXS continha a fusão N-terminal de 6xhis e resíduos adicionais provenientes de artefato de clonagem. O valor de chi da sobreposição resultou em 1,8, sendo que o ideal é próximo de 1,0, portanto, tendo em vista a baixa identidade das moléculas, os valores não são altamente discrepantes.

O cálculo do gráfico de Kratky (figura 37) mostrou que a amostra apresenta um perfil próximo a de proteínas enoveladas, indicando possíveis regiões *random coil*, pois a relação de intensidade e vetor de espalhamento gera uma curva gaussiana, porém, não tende a zero. A região de Guinier, visualizada pelo programa PRIMUS (KONAREV, *et al*, 2003), forneceu o raio de giro de $3,79 \pm 0,081$ nm (figura 38).

Outro programa utilizado, para a determinação das dimensões da molécula, porém, através da distribuição de distâncias (figura 39), foi o programa GNOM (SVERGUN, 1992). Relacionando a $P(r)$ com o raio de giro (R_g), foi possível determinar a dimensão máxima molécula (D_{max}) de 10 nm, com um raio de giro de $3,510 \pm 0,002$ nm, o qual corresponde ao monômero.

Considera-se que o raio hidrodinâmico corresponda, aproximadamente, a 1,3 do raio de giro, o que está de acordo com os parâmetros aqui determinados, considerando a média do raio hidrodinâmico em torno de 4,3 nm, determinado por experimentos anteriores.

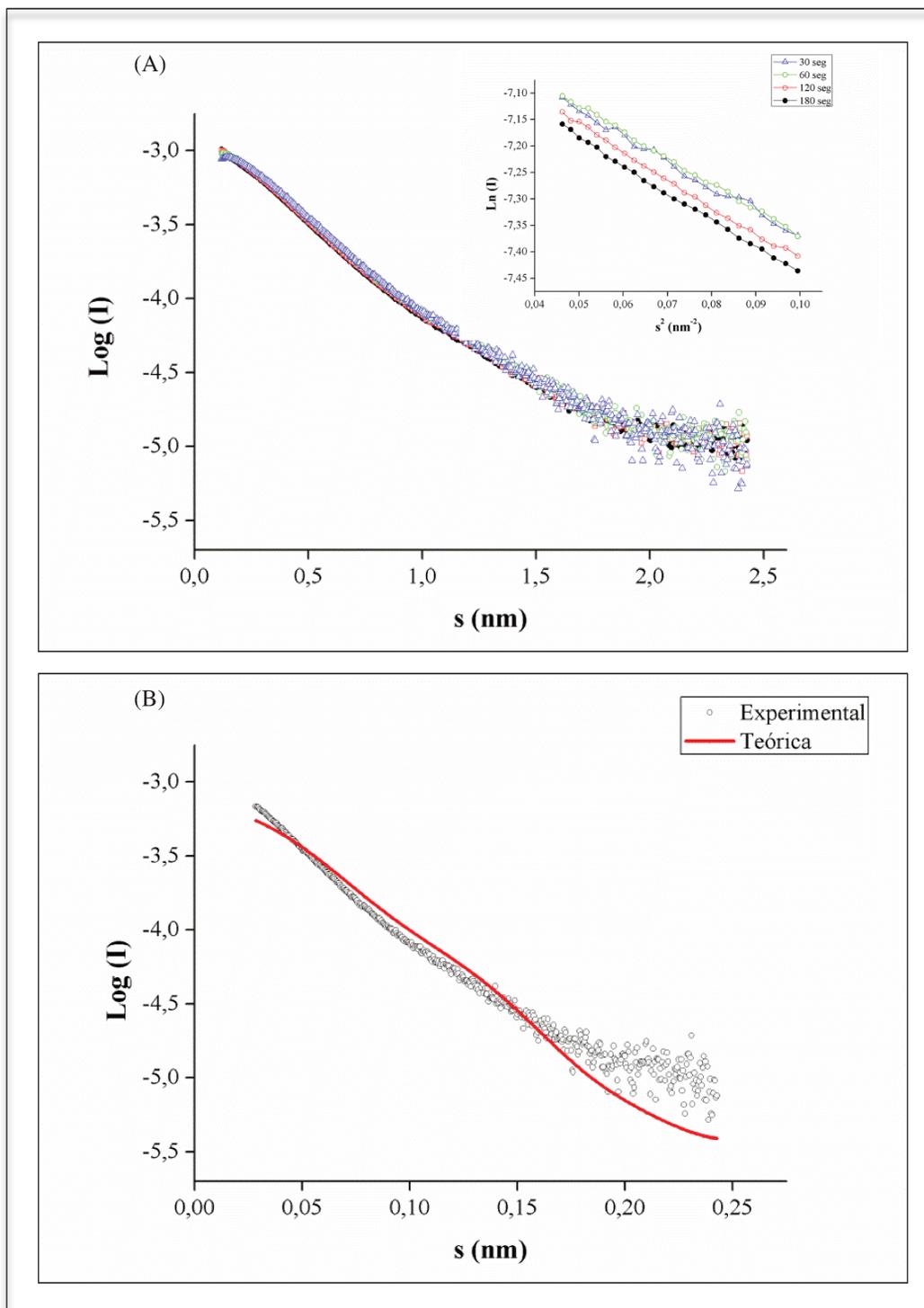


Figura 36. Curva de espalhamento da cauda globular inteira (GT-f). (A) A relação entre log da intensidade ($\log[I]$) com o vetor de espalhamento (s) dos diferentes tempos de exposição. Foram eliminados os 10 primeiros pontos equivalentes à região do *beam stop*. O gráfico acima representa as regiões de Guinier de todas as curvas. (B) Sobreposição da curva experimental de 30 seg de exposição (esfera vazias) com eliminação dos 50 primeiros pontos a curva teórica (linha sólida vermelha) construída a partir do modelo atômico pelo programa CRY SOL.

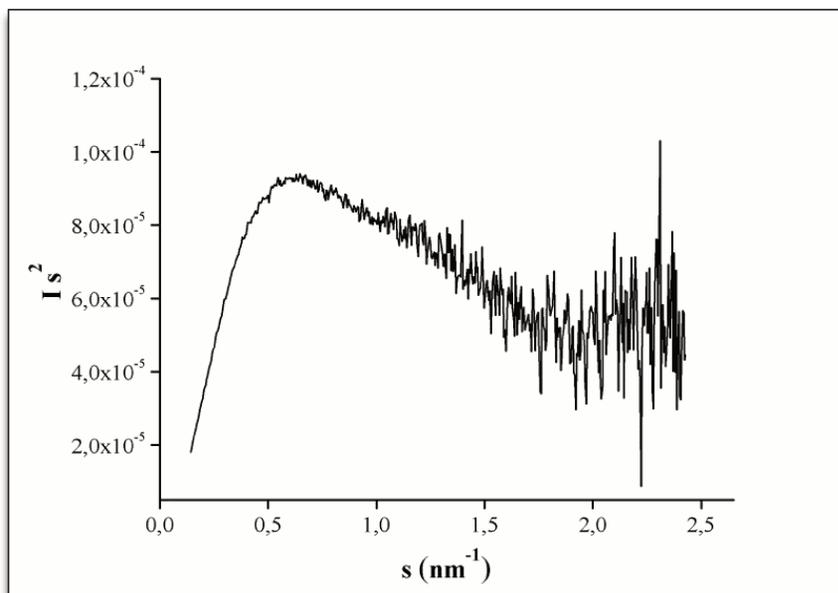


Figura 37. Gráfico de Kratky da curva de espalhamento de SAXS para a cauda globular inteira (GT-f). A relação entre a intensidade vezes o vetor de espalhamento ao quadrado ($I s^2$) e o vetor de espalhamento ($s \text{ nm}^{-1}$) fornece uma avaliação qualitativa da amostra. Pela curva gaussiana a amostra exposta por 30seg ao feixe de raio X não sofreu agregação.

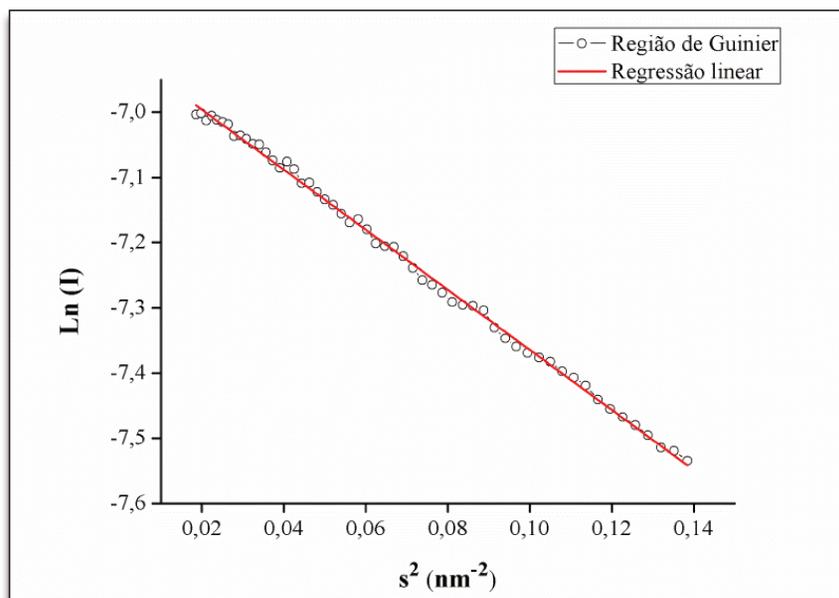


Figura 38. Gráfico de Guinier calculado a partir da curva de espalhamento da cauda globular (GT-f) pelo programa PRIMUS (KONAREV *et al.*, 2003). O raio determinado foi de $3,79 \pm 0,081 \text{ nm}$.

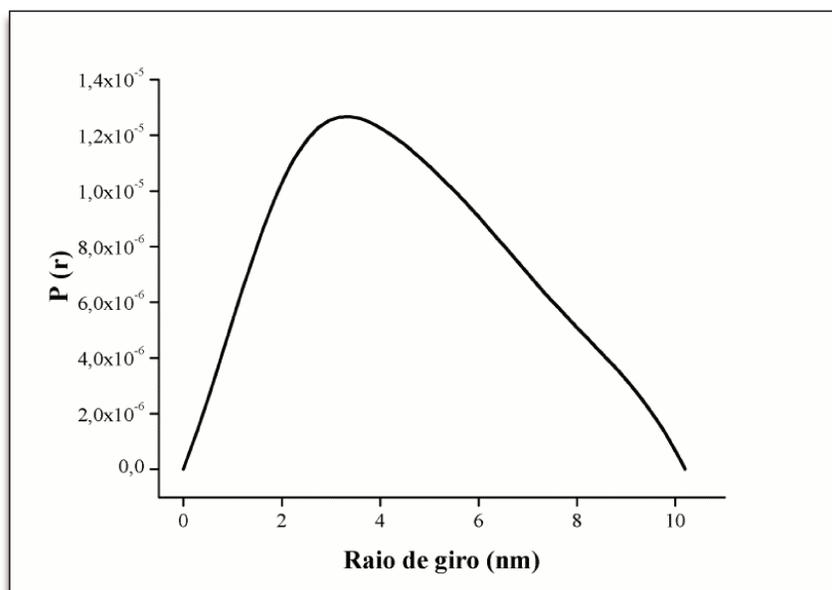


Figura 39. Curva de distribuição de distâncias $P(r)$ calculada pelo programa GNOM a partir dos dados experimentais de SAXS com exposição de 30seg da amostra contendo a cauda globular inteira (GT-f). A dimensão máxima molécula ($D_{\text{máx}}$) calculada foi de 10nm, com um raio de giro de $3,510 \pm 0,002$ nm que corresponde ao monômero.

Tabela 13. Comparação dos raios calculados para a cauda globular inteira (GT-f).

	GNOM	Guinier	DLS	aSEC
Raio				
(nm)	$3,510 \pm 0,002$	$3,79 \pm 0,081$	5,0	3,6

Utilizando os dados tratados com o programa GNOM, foram gerados 10 modelos do envelope molecular de GT-f usando o programa DAMMIN (SVERGUN, 1999), que por um algoritmo *ab initio* calcula ajustes da curva teórica referente a uma esfera inicial com o dado experimental. Os modelos independentes gerados apresentaram grande convergência (valores de *normalized spatial discrepancy* [NSD] < 1), resultando em uma forma alongada compatível com o modelo atômico com qui quadrado em torno de 0,75. De fato, como mostrado na figura 40, o modelo atômico teve um bom ajuste no envelope molecular médio destacando a complementaridade entre os dados *in silico* e SAXS. Como esperado, os dados de SAXS indicam que a GT-f comporta-se como um monômero em solução, já que a construção da cauda utilizada nesse trabalho, não foi desenhada para conter *coiled-coil*, região que confere a dimerização da miosina.

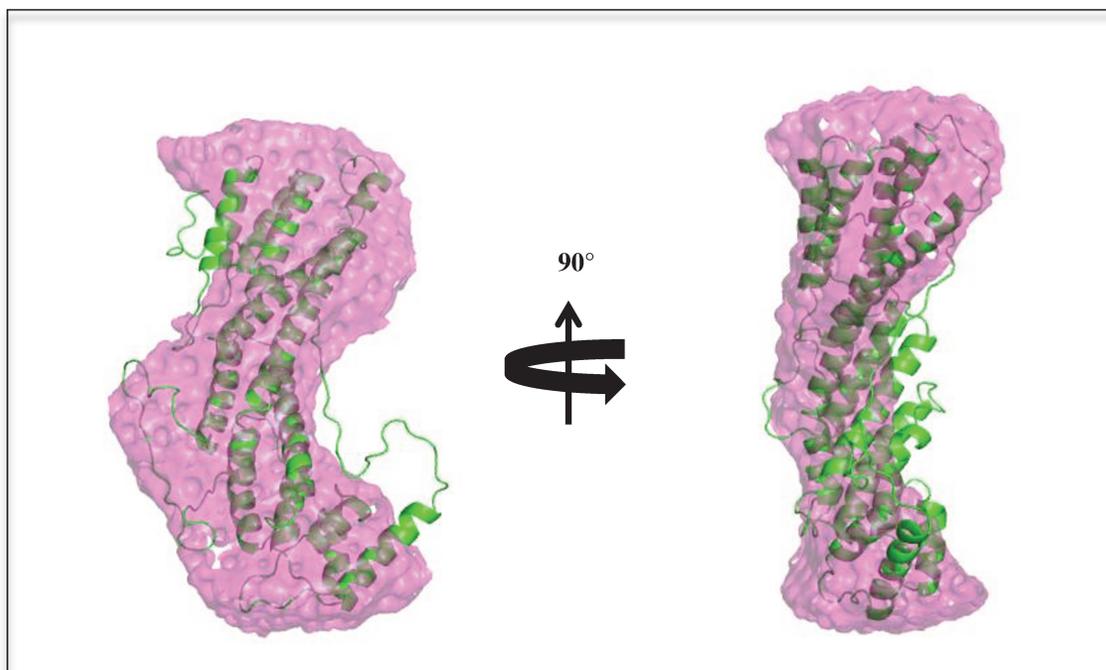


Figura 40. Sobreposição do modelo atômico da cauda globular inteira (GT-f) calculado pelo servidor I-TASSER ao envelope a baixa resolução calculado a partir dos dados de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS). Os 10 modelos foram gerados pelo método *ab initio* implementados no DAMMIN (SVERGUN, 1999). Posteriormente foi determinado o consenso de melhor modelo pelo programa DAMAVER (VOLKOV e SVERGUN, 2003) e alinhamento do modelo do envelope pelos programas do pacote SUPCOMB (KOZIN e SVERGUN, 2000). A visualização da sobreposição foi visualizada pelo programa PyMOL 5.0.

I. Experimentos de cristalização

As amostras a 5 mg mL^{-1} da cauda globular inteira (GT-f) e clivada (cGT-f) foram submetidas aos ensaios de cristalização em diferentes condições iniciais disponíveis no RoboLab (LNBio), utilizando o método de difusão de vapor em gota sentada. Após uma semana, cristais de diferentes formas haviam crescido. Os cristais, quando difratados na linha de luz de cristalografia de macromoléculas MX2, nas instalações do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) não exibiram padrão de difração de proteínas, mas de sais, provavelmente correspondentes àqueles presentes na solução cristalizante. Novos experimentos foram realizados com uma concentração proteica maior (10 mg mL^{-1}), porém novamente não resultaram na aparição de cristais de proteínas como monitorado por UV no sistema Rock Imager do RoboLab (LNBio).

5.3 Conclusões parciais

A construção da cauda globular truncada (GLOB_2/ SUMO) se mostrou instável para a continuidade da caracterização molecular. Acredita-se que esse resultado tenha sido obtido devido à clivagem da fusão de SUMO, que pode ter desestabilizado a molécula ou a instabilidade do domínio devido a truncagem, mostrando a necessidade da expressão do domínio inteiro para obter um domínio estável.

Sendo assim a cauda globular inteira (GT-f/6xhis), resultou em uma amostra monodispersa, a partir dos experimentos de expressão e cromatografia, permitindo prosseguir com a caracterização molecular.

Foi possível determinar a temperatura de estabilidade através do monitoramento do desenovelamento a nível estrutural secundário e terciário, resultando em uma temperatura de transição de cerca de 46°C. Algumas moléculas, tais como adenosina trifosfato e ácido málico, foram capazes de aumentar a estabilidade de GT-f em torno de 3°C, mostrando que novas condições com esses mesmos aditivos devem ser testados para verificar a relação da concentração do ligante a estabilidade conferida. Para os ensaios com soluções de diferentes pHs e força iônica não foram verificados aumentos de estabilidade, diferente da cauda globular da miosina Va humana, onde a força iônica tem um papel muito importante na estabilização da molécula.

A cromatografia analítica verificou que as amostras clivada e não clivada possuem o mesmo padrão de eluição, mostrando a complementariedade dos fragmentos que compõem a cauda globular, assim como foi visto para os domínios das miosinas ortólogas.

Os diferentes experimentos permitiram, também, a determinação do estado oligomérico e as dimensões da molécula cujo envelope é bastante alongado, de acordo com as caudas globulares já descritas e estudadas no grupo.

A ausência da porção de *coiled-coil* na molécula pode ter acarretado a instabilidade nos ensaios de cristalização, uma vez que essa região distal da cauda permite a dimerização da miosina.

V- Conclusão

A determinação de um protocolo de clonagem, expressão, purificação e ensaios biofísicos para miosinas não convencionais de insetos, em particular, da cauda globular de miosina V, foi de grande importância para esse trabalho, levando-se em conta a escassez de informações funcionais e, principalmente, estruturais a respeito das proteínas de inseto.

Das cinco construções desenhadas a partir das análises *in silico* e clonadas em vetores de clonagem e expressão, somente três foram expressas na fração solúvel em testes de expressão e, a partir daí, foi estabelecido um protocolo de expressão e purificação para o domínio C-terminal da cauda globular (GLOB_2) e a cauda globular inteira (GT-f) da miosina V e o domínio FERM (FERM-f) da miosina XV. Tendo em vista que esses domínios de outras miosinas já foram expressos em sistema bacteriano de *E. coli*, se estabeleceu um protocolo em larga escala, nas melhores condições de expressão.

Para a construção FERM, apesar do sucesso de expressão, resultando em proteína na fração solúvel, a proteína resultante foi caracterizada polidispersa e experimentos de dicroísmo circular (CD) mostraram espectro de uma molécula não estruturada, o que se acredita que se deve ao fato de não estar em fusão com o domínio MyTH4, da cauda da miosina, uma vez que juntas desempenham importante papel funcional. Além disso, as estruturas cristalográficas desses domínios em outras miosinas, somente foram determinadas quando os domínios estavam fusionados.

Apesar do sucesso na expressão de GLOB_2 fusionada a SUMO, após a clivagem da fusão, há aparente desestabilização da molécula; pelos experimentos de espalhamento dinâmico de luz verificam-se grandes raios e alta polidispersividade. O estado agregado da amostra e sua grande instabilidade com formação de precipitados impossibilitaram prosseguir com outros experimentos.

Partindo para a construção da cauda globular inteira (GT-f), obteve-se sucesso em seu protocolo, resultando em proteína solúvel, em grande quantidade, pura e monodispersa, permitindo análises biofísicas de dicroísmo circular (CD) a fim de avaliar a estrutura secundária e termoestabilidade, calculada em torno de 48°C. O experimento de fluorescência (DSF) mostrou que a adição de alguns ligantes gerou aumento significativo

na estabilidade, porém ainda devem ser testados em maiores concentrações. Os experimentos de soluções de diferentes pHs e sais permitiu avaliar que não houve aumento significativo na temperatura de transição. Ao contrário do que foi visto para a cauda globular da miosina Va humana, onde a força iônica gerou aumento na estabilidade.

A clivagem da cauda globular mostrou um padrão semelhante daquela de miosina V de levedura, já que possuem 2 subdomínios principais funcionais.

A caracterização realizada a partir de experimentos de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS), cromatografia por exclusão molecular analítica (aSEC) e espalhamento dinâmico de luz (DLS) permitiram a determinação do comportamento hidrodinâmico da proteína, e também caracterizá-la como monomérica em solução. As características descritas para a cauda globular de inseto são muito semelhantes às descritas para miosinas V de outros organismos, apesar da baixa identidade (~35%), sugerindo que desempenham funções muito parecidas nas células em que estão localizadas.

Novas condições ainda podem ser testadas a fim de obter cristais e determinação da estrutura a alta resolução por cristalografia de raios X. Acredita-se que a porção *coiled-coil* N-terminal removida na atual construção desempenha um papel importante na estabilização da molécula, permitindo a dimerização da cauda globular.

VI- Perspectivas

Ainda visando à caracterização estrutural a alta resolução, pretende-se realizar a construção da cauda globular da miosina V com a porção N-terminal, que contém *coiled-coil*, para garantir a estabilização da molécula através da dimerização, como foi descrito para a cauda globular da miosina V de levedura, cuja estrutura foi resolvida.

Ensaio de duplo-híbrido também serão realizados com as novas construções, a fim de identificar parceiros moleculares e compará-los aos parceiros das miosinas ortólogas.

Quanto ao domínio FERM, pretende-se realizar a construção do domínio fusionado a MyTH4 e visando obter a proteína estruturada e adequada para estudos cristalográficos e funcionais.

VII- Referências Bibliográficas

- ANDRADE, M.A.; CHACÓN P.; MERELO J.J.; MORÁN F. (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network. **Prot. Eng.**, v. 6, pág. 383-390.
- ANDERSON, D. W.; PROBST, F. J.; BELYANTSEVA, I. A.; FRIDELL, R. A.; BEYER, L.; MARTIN, D. M.; WU, D.; KACHAR, B.; FRIEDMAN, T. B.; RAPHAEL, Y. (2000). The motor and tail regions of myosin XV are critical for normal structure and function of auditory and vestibular hair cells. **Hum. Mol. Genet.**, v. 9, pág. 1729-1738.
- ASHERIE, N. (2004) Protein crystallization and phase diagrams. **Methods**, v.34, pág. 266-272.
- BERG, J. S.; CHENEY, R. E. (2002). Myosin-X is an unconventional myosin that undergoes intrafilopodial motility. **Nat. Cell Biol.**, v. 4, pág. 246-250.
- BONAFÉ, N.; SELLERS J.Mc1998). Molecular characterization of myosin V from *Drosophila melanogaster*. **J. Mus. Res. Cell Mot.**, v.19, pág. 129-141.
- BORNHORST, J.A.; FALKE, J.J. (2000) Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. **Meth. Enzym.**, v. 326, pág. 245-254.
- BUCHAN, D.W.; WARD, S.M.; LOBLEY, A.E.; NUGENT, T.C.; BRYSON, K.; JONES, D.T. (2010) Protein annotation and modeling servers at University College London. **Nucl. Acids Res.**, 38 Suppl, W563-W568.
- CHENEY R.E., MOOSEKER M.S. (1992). Unconventional myosins. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 4 (1), pág. 27-35.
- CORREIA, S.S.; BASSANI, S.; BROWN, T.C.; LISE, M.F.; BACKOS, D.S. (2008) Motor protein-dependent transport of AMPA receptors into spines during long-term potentiation. **Nat. Neurosci.**, v.11, pág. 457-466.
- CRAIG, E.M.; LINKE, H. (2009) Mechanochemical model for myosin V. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 106, pág. 18261-18266.
- CUTLER, P. (2004) Protein purification protocols. Segunda edição, **Ed. Humana Press**, 484 pp.
- DESNOS, C.; HUET, S., DARCHEN, F. (2007) 'Should I stay or should I go?': myosin V function in organelle trafficking. **Biol. Cell**. v. 99, pág. 411-423.
- DANG, K.D; DUTT, P.B; FORSDYKE, D.R. (1998) Chargaff difference analysis of the bithorax complex of *Drosophila melanogaster*. **Biochem. Cell Biol.**, v. 76 , pág. 129-137.
- DENG, W.; LEAPER, K.; BOWNES, M. (1999). A targeted gene silencing technique shows that *Drosophila* myosin VI is required for egg chamber and imaginal disc morphogenesis. **J. Cell Sc.**, v. 112, pág. 3677-3690.
- DOSE, A.C.; BURNSIDE, B. (2000). Cloning and Chromosomal Localization of a Human Class III Myosin. **Genomics**, v.67 (3), pág. 333-342.

- EMERSON, P.C.; BERNSTEIN, S.I. (1987). Molecular genetics of myosin. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 56, pág. 695-726.
- ERICSSON, B.U.; HALLBER, B. M.; DETITTA, G.T.; DEKKER, N.; NORDLUND, P. (2006) Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. **Analytic. Biochem.**, v. 357, pág. 289–298.
- FAIX, J.; ROTTNER, K. (2006). The making of filopodia. **Curr. Opin. Cell Biol.** v.18, PÁG.18-25.
- HAMMERSLEY A.P.; BROWN, K., BURMEISTER, W.; CLAUSTRE, L.; GONZALEZ ,A. (1997) Calibration and application of an X-ray image intensifier/ charge-coupled device detector for monochromatic macromolecular crystallography. **J. Synchr. Radiat.**, v. 4, pág. 67-77.
- HASSON, T.; MOOSEKER, M. S. (1996) Vertebrate Unconventional Myosins. **Am. S. Biochem. Mol. Biol. Inc.** v. 271 (28), pág. 16431-16434.
- HEIMAN, M. (1997). Webcutter 2.0. (<http://www.ccsi.com/Prstmarket/cutter/cut2.html>).
- HEUCK, A.; FETKA, I.; BREWER, D.N.; HULS, D.; MUNSON, M.; JANSEN, R.P.; NIESSING, D. (2010). The structure of the Myo4p globular tail and its function inASH1 mRNA localization. **J. Cell Biol.**, v. 189(3), pág. 497-510.
- HICKS, J. L.; LIU, X.; Willians, D. S. (1996). Role of the *ninaC* proteins in photoreceptor cell structure: Ultrastructure of *ninaC* deletion mutants and binding to actin filaments. **Cell Mot. Cyt.**, v.35 (4), pág.367-379.
- HIRANO, Y. HATANO, T.; TAKAHASHI, A.; TORYAMA, M.; INAGAKI, N. HAKOSHIMA, T. (2011). Structure of the human myosin-X MyTH4-FERM cassette bound to its specific cargo, DCC. **EMBO J.**, v.30 (13), pág. 2734-2747.
- JACINTO, A.; WOOLNER, S.; MARTIN, P. (2002). Dynamic analysis of dorsal closure in *Drosophila*: from genetics to cell biology. **Dev. Cell** v.3, pág. 9-19.
- KELLERMAN, K. A.; K. G. MILLER. (1992). An unconventional myosin heavy chain gene from *Drosophila melanogaster*. **J. Cell Biol.**, v.119, pág. 823-834.
- KELLY, S.M.; PRICE, N.C. (2000) The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. **J. Cell Biol**, v. 119, pág. 823-834
- KELLY, S.M.; JESS, T.M.; PRICE, C.N. (2005) How to study proteins by circular dichroism. **Biochem. Biophys.**, v. 1751, pág. 119-139.
- KOMABA, S.; INOUE, A.; MARUTA, S.; HOSOYA, H.; IKEBE, M. (2003). Determination of Human Myosin III as a Motor Protein Having a Protein Kinase Activity. **J. Biol. Chem.**, v.278(24), pág. 21352-21360.
- KREIS, P.; VAN DIEPEN, M.T.; EICKHOLT, B.J. (2010) Regulation of PTEN in neurons by myosin-based transport mechanisms. **Adv. Enz. Regul.** v. 50, pág. 119-124.
- KRENDEL, M.; MOOSEKER, M.S. (2005) Myosins: Tails (and Heads) of Functional Diversity. **Physiology.**, v. 20 (4), pág. 239-251

- KONAREV, P.V.; VOLKOV, V.V.; SOKOLOVA, A.V.; KOCH, M.H.J.; SVERGUN, D.I. (2003) PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. **J. Appl. Cryst.**, v.36, pág.1277-1282.
- KOZIN, M.B.; SVERGUN, D.I. (2001) Automated matching of high- and low-resolution structural models. **J. Appl. Cryst.**, v.34, pág. 33-41.
- LEE, S. J.; MONTELL, C. (2004) Light-Dependent Translocation of Visual Arrestin Regulated by the NINAC Myosin III. **Neuron**, v.43(1), pág. 95-103.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, pág. 680–685.
- LI, H.; PORTER, J.A.; MONTELL, C. (1998) Requirement for the NINAC kinase/myosin for stable termination of the visual cascade. **J. Neuro.**, v.18, n.23, pág. 9601-9606.
- LIANG, Y.; WANG, A.; BELYANTSEVA, I. A.; ANDERSON, D. W.; PROBST, F. J.; BARBER, T. D.; MILLER, W.; TOUCHMAN, J. W.; JIN, L.; SULLIVAN, S. L. (1999). Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker 2. **Genomics**, v. 61, pág. 243-258.
- LINDING, R.; JENSEN, L.J.; DIELLA, F.; BORK, P.; GIBSON, T.J.; RUSSEL, R.B. (2003). Protein Disorder Prediction: Implications for Structural Proteomics. **Structure.**, v. 11, pág. 1453–1459.
- LIU, R.; WOOLNER, S.; JOHNDROW, J.E.; METZGER, D.; FLORES, A. PARKHUST, S.M.(2008) Sisyphus, the *Drosophila* myosin XV homolog, traffics within filopodia transporting key sensory and adhesion cargos. **Development**, v.135, pág. 53-63.
- LISE, M.F.; SRIVASTAVA, D.P.; ARSTIKAITIS, P.; LETT, R.L; SHETA, R. (2009) Myosin-Va-interacting protein, RILPL2, controls cell shape and neuronal morphogenesis via Rac signaling. **J. Cell Sci.** v. 122, pág. 3810-3821.
- LOBLEY, A.; WHITMORE, L.; WALLACE, B.A. (2002) DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. **Bioinformatics**, v.18, pág. 211-212.
- LU, H.; KENNEDY, G.G.; WARSHAW, D.M.; TRYBUS, K.M. (2010) Simultaneous observation of tail and head movements of myosin V during processive motion. **J. Biol. Chem.** v. 285, pág. 42068-42074.
- MACIVER, B.; MCCORMACK, A.; SLEE, R.; BOWNES, M. (1998) Identification of an essential gene encoding a class-V unconventional myosin in *Drosophila melanogaster*. **Eur. J. Biochem.** v. 257, pág. 529-537.
- MATULIS, D.; FRANZ, J.K.; SALEMME, F.R.; TODD, M.T. (2005). Thermodynamic Stability of Carbonic Anhydrase: Measurements of Binding. **Biochemistry**, v. 44, pág. 5258-5266.
- MCPHERSON, A. (1999) A bit advice on crystallizing proteins. Em: BERGFORS, T. **Prot. Cryst.**, 1°ed. La Jolla, California: International University Line, pág. 1-6.
- MENASCHE, G.; HO, C.H.; SANAL, O.; FELDMANN, J.; TEZCAN, I. (2003) Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (GS3) or a MYO5A F-exon deletion (GS1). **J. Clin. Invest.**, v.112, pág. 450-456.

- MERMALL, V.; BONAFÉ, N.; JONES, L.; SELLERS, J.R.; COOLEY, L. MOOSEKER, M.S. (2005). *Drosophila* myosin V is required for larval development and spermatid individualization. **Dev. Biol.**, v. 286, pág. 238-255.
- MERMALL, V.; POST, P. L.; MOOSEKER, M. S. (1998). Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. **Science**, v. 279, pág. 527-533.
- MONTELL, C.; RUBIN, G. M. (1988).The *Drosophila* ninaC locus encodes two photoreceptor cell specific proteins with domains homologous to protein kinases and the myosin heavy chain head. **Cell**, v.54 (6), pág.723-733.
- MORGAN, N. S.; SKOVROSKY, D. M.; ARTAVANIS-TSAKONAS, S.; MOOSEKER, M.S. (1994). The molecular cloning and characterization of *Drosophila melanogaster* Myosin-IA and Myosin-IB. **J. Mol. Biol.**, v.239, pág.347-356.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol.**, v.51(1), pág. 263-273.
- NG, K.P.; KAMBARA, T.; MATSUURA, M.; BURKE, M.; IKEBE, M. (1996). Identification of Myosin III as a Protein Kinase. **Biochemistry**, v. 35(29), pág. 9392-9399.
- NIESEN, F.H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nat. Protoc.**, v.2 (9), pág. 2212-2221.
- NOGUCHI, T.; LENARTOWSKA, M.; MILLER K. G. (2006). Myosin VI Stabilizes an Actin Network during *Drosophila* Spermatid Individualization, **Mol. Biol. Cell**, v. 17 (6), pág. 2559-2571.
- ODRONITZ, F.; KOLLMAR, M.(2007). Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. **Gen. Biol.**, v.8 n.9, pág. 1-23.
- OKE, O.A.; BURGESS, S.A.; FORGACS, E.; KNIGHT, P.J.; SAKAMOTO, T. (2010) Influence of lever structure on myosin 5a walking. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 107, pág. 25;09-2514.
- OLKKONEN V.M.; IKONEN, E. (2006) When intracellular logistics fails--genetic defects in membrane trafficking. **J. Cell Sci.**, v.119, pág. 5031-5045.
- PASHKOVA, N.; CATLETT, N.L.; NOVAK, J.L.; WU, G.; LU, R. (2005) Myosin V attachment to cargo requires the tight association of two functional subdomains. **J. Cell Biol.** v. 168, pág. 359-364.
- PASHKOVA, N.; JIN, Y.; RAMASWAMY, S.; WEISMAN, L.S. (2006) Structural basis for myosin V discrimination between distinct cargoes. **EMBO J.**, v. 25, pág. 693-700.
- PASTURAL, E.; BARRAT, F.J.; DUFOURCQ-LAGELOUSE, R.; CERTAIN, S.; SANAL, O. (1997) Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. **Nat. Genet.**, v.16, pág. 289-292.
- PETRITSCH, C.; TAVOSANIS, G.; TURK, C.; JAN, L.Y.; JAN, Y.N. (2003). The *Drosophila* myosin VI jaguar is required for basal protein targeting and correct spindle orientation in mitotic neuroblasts. **Dev. Cell**, v. 4, pág. 273-281.

- PIKE, A.C.W.; RELLOS, P.; NIESSEN, F.H; TURNBULL, A.; OLIEVR, A.W.; PARKER, A. P.; TURK, B.E. PEARL; L.H; KNAPP, S. Activation segment dimerization: a mechanism for kinase autophosphorylation of non-consensus site. **EMBO**, v. 27(4), pág. 704-714.
- POKLAR, N.; LAH, J.; SALOBIR, M.; MACEK, P. (1997) pH and Temperature-Induced Molten Globule-Like Denatured States of Equinatoxin II: A Study by UV-Melting, DSC, Far- and Near-UV CD Spectroscopy, and ANS Fluorescence. **Biochemistry**, v.36, pág. 14345-14352.
- POLLARD, D.T.; DOBERSTEIN, S.K. (1991). Myosin I. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 53, pág. 653- 581.
- PORTER, J.A.; HICKS, J.L.; WILLIAMS, D.S.; MONTELL, C. (1992). Differential Localizations of and Requirements for the Two *Drosophila* ninaC Kinase/Myosins in Photoreceptor Cells. **J. Cell Biol.**, v.116, pág. 683-693.
- PORTER, J.A.; YU M.; DOBERSTEIN, S.K.; POLLARD, T.; MONTELL, C.(1993) Dependence of Calmodulin in the Retina on the NINAC Unconventional Myosin. **Science**, v.262, pág.1038-1042.
- PRILUSKY, J.; ZEEV-BEN-MORDEHAI, T.; RYDBERG, E.; FELDER, C.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L. (2000) Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? **Proteins**, v.41, pág. 415-427.
- PRIVALOV, P.L. (1979) Stability of proteins. v.35, **Acad. Press Inc.**- New York. 489pp.
- PROBST, F.J.; FRIDELL, R.A.; RAPHAEL, Y.; SAUNDERS, T.L.; WANG, A.; LIANG, Y.; MORELL, R.J.; TOUCHMAN, J.W.; LYONS, R.H.; NOBEN-TRAUTH, K.; FRIEDMAN, T.B.; CAMPER, S.A.(1998) Correction of deafness in shaker-2 mice by an unconventional myosin in a BAC transgene. **Science**, v. 280 (5368), pág. 1444-1447.
- RODER, I.V.; PETERSEN, Y.; CHOI, K.R.; WITZEMANN, V.; HAMMER, J.A.; (2008) Role of Myosin Va in the plasticity of the vertebrate neuromuscular junction in vivo. **PLoS One**, v.3, e3871.
- RODER, I.V.; CHOI, K.R.; REISCHL, M.; PETERSEN, Y.; DIEFENBACHER, M.E. (2010) Myosin Va cooperates with PKA RIalpha to mediate maintenance of the endplate in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v.107, pág. 2031-2036.
- ROLAND, J.T.; LAPIERRE, L.A.; GOLDENRING, J.R. (2009) Alternative splicing in class V myosins determines association with Rab10. **J. Biol. Chem.** v. 284, pág. 1213-1223.
- ROYOU, A.; FIELD, C.; SISSON J.C.; SULLIVAN W.; KARESS, R. (2004). Reassessing the role and dynamics of nonmuscle myosin II during furrow formation in early *Drosophila* embryos. **Mol. Biol. Cell**, v. 15, pág. 838-850.
- RUDOLF, R.; BITTINS, C.M.; GERDES, H.H. (2011) The role of myosin V in exocytosis and synaptic plasticity. **J. Neurochem.** v.116, pág. 177-191.
- SAKAMOTO, T.; WEBB, M.R.; FORGACS, E.; WHITE, H.D.; SELLERS, J.R. (2008) Direct observation of the mechanochemical coupling in myosin Va during processive movement. **Nature**, v. 455, pág.128-132.
- SANGER, F. (2001). The early days of DNA sequences. **Nat Med.**, v. 7(3), pág. 267-268.
- SHELLMAN, J.A. (1997) Thermodynamics, molecules and the Gibbs conference. **Biophys. Chem.**, v.64(1-3), pág. 7-13.

- SCHMITZ, K.S.(1990) An introduction to dynamic light scattering of macromolecules. **Acad. Press Inc.** 472pp.
- SELLERS, J.R. (2000). Myosins: a diverse superfamily. **Bioch. Bioph. Acta**, v.1496, pág. 3-22.
- SELLERS, J.R.; VEIGEL, C. (2006) Walking with myosin V. **Curr. Opin. Cell Biol**, v. 18, pág. 68-73.
- SELLERS, J.R.; KNIGHT, P.J. (2007) Folding and regulation in myosins II and V. **J. Muscle Res. Cell Motil.** V.28, pág. 363-370.
- SELLERS, J.R.; VEIGEL, C. (2010) Direct observation of the myosin-Va power stroke and its reversal. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 17, pág. 590-595.
- SENISTERRA, G.A.; MARKIN, E.; YAMAZAKI, K.; HUI, R.; VEDADI, M. AWREY, D.E. (2006) Screening for Ligands Using a Generic and High-Throughput Light-Scattering-Based Assay. **J. Biomol. Screen**, v. 11 (8), pág. 940-948.
- SPUDICH, J.A. (2001). The myosin swinging cross-bridge model. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, v.2, pág. 387-392.
- STUDIER, F.W. (2005). Protein production by auto- induction in high-density shaking cultures. **Prot. Expres. Purif.**, v. 41, pág. 207-234.
- SVERGUN, D. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **J. Appl. Cryst.**, v. 25, pág. 495-503.
- SVERGUN, D.; BARBERATO, C.; KOCH, M.H.J. (1995) CRY SOL - a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. **J. Appl. Cryst.**, v. 28, pág. 768-773.
- SVERGUN, D.I. (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophys. J.**, v.76, pág. 2879-2886.
- TEHVER, R.; THIRUMALAI, D. (2010) Rigor to post-rigor transition in myosin V: link between the dynamics and the supporting architecture. **Structure**, v. 18, pág. 471-481.
- TRYBUS, K.M. (2008) Myosin V from head to tail. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 65, pág. 1378-1389.
- TZOLOVSKY, G.; MILLO, H.; PATHIRANA, S.; WOOD, T.; BOWNES, M. (2002). Identification and phylogenetic analysis of *Drosophila melanogaster*. **Mol. Biol. Evol.**, v.19 (7), pág. 1041-1052.
- VOLPICELLI, L.A.; LAH, J.J.; FANG, G.; GOLDENRING, J.R.; LEVEY, A.I. (2002) Rab11a and myosin Vb regulate recycling of the M4 muscarinic acetylcholine receptor. **J. Neurosci.** V.22, pág. 9776-9784.
- VAN DIEPEN, M.T.; PARSONS, M.; DOWNES, C.P.; LESLIE, N.R.; HINDGES, R. (2009) MyosinV controls PTEN function and neuronal cell size. **Nat. Cell Biol** .v. 11, pág. 1191-1196.
- VEDADI, M.; NIESEN, F.H.; ALLALI-HASSANI, A.; FEDOROV, O.Y.; WASNEY, G.A.; YEUNG, R.; ARROWSMITH, C.; BALL, L.J.; BERLUND, H.; HUI, R.; MARSDEN, B.D.; NORDLUND, P.; SUNDSTROM, M.; WEIGELT, J.; EDWARDS, A.M. Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.103(46), pág. 15835–1584.

- VOLKOV, V.V.; SVERGUN, D.I. (2003) Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. **J. Appl. Cryst.**, v. 36: 860-864.
- WANG, Y. E.; ESBENSEN, P.; BENTLEY, D.(1998) Arginine kinase expression and localization in growth cone migration. **J.Bioscienc.** v.18(3), pág. 987-998.
- WARD, J.J.; SODHI, J.S.; MCGUFFIN, L.J. BUXTON, B.F.; JONES, D.T. (2004) Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life. **J. Molec. Biol.**, v.. 337, pág. 635–645.
- WEATHLEY, S.; KULKARNI, S.; KARESS, R. (1995). *Drosophila* nonmuscle myosin II is required for rapid cytoplasmic transport during oogenesis and for axial nuclear migration in early embryos. **Development**, v. 121, pág.1937-1946.
- WEI, Z.; YAN, J.; PAN, L.; ZHANG, M. (2011) Cargo recognition mechanism of myosin X revealed by structure of its tail MyTH4-FERM tandem in complex with the DCC P3 domain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.108(9), pág. 3572-3577.
- WEISMAN, L.S. (2006) Organelles on the move: insights from yeast vacuole inheritance. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 7, pág. 243-252.
- WELLS, A.L.; LIN, A.W.; CHEN, L.I.; SAFER, D.; CAIN, S.M.; HASSON, T.; CARRAGHER, B.O.; MILLIGAN, R.A.; SWEENEY, H.L. (1999). Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. **Nature**, v. 401, pág. 505-508
- WILLIAMS, D.S. (1991) Actin filaments and photoreceptor membrane turnover. **BioAssays**, v.13(4), pp171-178.
- WU, L.; LIFENG, P.; WEI, Z.; ZHANG, M. (2011) Structure of MyTH4-FERM Domains in Myosin VIIa Tail Bound to Cargo. **Science**, v. 331,pág. 757 -760.
- YAMASHITA, R.A.; SELLERS, J. R.; ANDERSON, J.B. (2000). Identification and analysis of the myosin superfamily in *Drosophila*: a database approach. **J. Mus. Res. Cell Mot.**, v.21 (6), pág.491-505.
- YANG,Y; KOVÁCS,M.; XU, Q.; ANDERSEN, J.B.; SELLERS, J.R. (2005). Myosin VIIB from *Drosophila* is a high duty motor. **J. Biol. Chem.**, v. 280 (37), pág. 32061–32068.
- YONEMURA, S.; YAMADA, Y.; HAYASHI, N.; ARIMA, K.; YANAGAWA, M.; KAWAMURA, J. (1998) A case of metastatic ureteral tumor from rectal cancer. **Hinyokika Kiyo**, v.44(1), pág. 41-43.
- ZHANG, H.; BERG, J. S.; LI, Z.; WANG, Y.; LANG, P.; SOUSA, A. D.; BHASKAR, A.; CHENEY, R. E.; STROMBLAD, S. (2004). Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton. **Nat. Cell Biol.** v. 6, pág. 523-531.
- ZHANG, Y.; ROY, A.; KURKURAL, A. (2008). I-TASSER: an unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nat. Prot.** V. 5, pág 725-738.